

Ana Cláudia Maritan

Identificação e Caracterização de um
Potyvirus Isolado de *Zinnia elegans*



1910001104



ANA CLÁUDIA MARITAN

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
POTYVIRUS ISOLADO DE *Zinnia elegans***

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Genética.

São José do Rio Preto - SP

2002

ANA CLÁUDIA MARITAN

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
POTYVIRUS ISOLADO DE *Zinnia elegans***



Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Genética.

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

São José do Rio Preto - SP

2002

t 581.2

M342i

Maritan, Ana Cláudia.

Identificação e caracterização de um potyvirus isolado de *Zinnia elegans* / Ana Cláudia Maritan. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2002
72 f. ; 30 cm.

Orientador: José Osmar Gaspar

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

I. Fitopatologia. 2. Fitovirologia. 3. Potyvirus. 4. Caracterização molecular. 5. *Zinnia elegans*. 6. Sequenciamento. I. Gaspar, José Osmar. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 581.2

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

ANA CLÁUDIA MARTIN

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
POLYVIRUS ISOLADO DE *Zaenopsis elegans*

COMISSÃO JULGADORA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fitovirologia, departamento de Zoologia-Botânica, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), com auxílio-bolsa CAPES

São José do Rio Preto

ANA CLÁUDIA MARITAN

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
POTYVIRUS ISOLADO DE *Zinnia elegans***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador

2º Examinador

3º Examinador

São José do Rio Preto, ____/____/____.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Terezinha e Waldemar e

Meus irmãos Andréia e Junior

Alicerces da minha existência

Ao meu amado Ricardo e

Minha querida Camila

Presentes do destino

Agradeco a Deus

Ao meu orientador Prof. Dr. José Osmar Gaspar

Pelas oportunidades que surgiram

Que me abriu as portas da pesquisa, apresentando novos horizontes

Pelas dificuldades que *Dando-me opções, mas deixando livre a escolha*

Seguindo meu caminhar de perto, sempre pronto à amparar nas quedas

Os amigos que *Corrigindo minhas falhas e aplaudindo meus acertos*

Os familiares que me ampararam

A vitória de mais uma batalha

Essa vitória é nossa!

E pelas próximas que virão

Enfim...

Agradeço por tudo

Agradeço a Deus

*Pelas oportunidades que surgiram
As portas que se abriram
As dificuldades que me fizeram crescer
Os erros que me fizeram aprender
Os amigos que me acompanharam
Os familiares que me ampararam
A vitória de mais uma batalha*

E pelas próximas que virão

Enfim...

Agradeço por tudo

AGRADECIMENTOS

*"Momentos são partes de nossas vidas
partes ruins, partes boas
partes lembradas e até esquecidas
Se sua alma não é pequena,
Vai adiante, tenta
que vale a pena.
Momentos difíceis, fáceis
de tristeza e de alegria
que nos trazem depressão
paixão, amor, euforia.
Momentos que são como rosas
que apesar da beleza e do perfume, tem espinhos.
E cada momento junto, faz uma sinergia
dá vida pra vida
por isso é que não posso me privar deles
porque senão, a vida passa despercebida
então, guardo os bons pra mim
e os compartilho com os que amo
os ruins, ah os ruins não procuro esquecer
porque cada um traz uma lição, um ensinamento
algo pra se aprender e não errar de novo."*

(ALBUQUERQUE, Fabrício Bazé)

AGRADECIMENTOS

As pessoas entram na nossa vida, sempre por alguma razão, algum propósito. Cada uma delas é especial e mesmo que o momento seja breve, com certeza nos deixam alguma coisa. Por isso serei eternamente grata a todos que de alguma forma estiveram presentes neste tempo de aprendizado.

Agradeço principalmente ao professor Dr. José Osmar Gaspar pela oportunidade, imensa paciência e exemplo de profissionalismo.

Ao professor Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pela facilidade de acesso ao laboratório de Biologia Molecular (ESALQ/USP) e uso do sequenciador e também pela disponibilidade em participar como membro da banca, contribuindo para o aprimoramento deste trabalho.

À professora Dra. Paula Hahal por participar como membro da banca e colaborar para o aperfeiçoamento desta dissertação.

Ao professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima (ESALQ/USP) pelo anti-soro para o *Bidens mosaic virus*.

Ao professor Dr. Carlos Daghljan, do Depto de Letras deste Instituto, por sua colaboração na correção do "Summary".

À direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-SP, pelo fornecimento de recursos materiais.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

À coordenadora do Curso de Pós-graduação, Profª. Dra. Ana Elizabete Silva pelo auxílio quanto aos problemas burocráticos.

Aos professores dos cursos de Pós-graduação em Genética e de Graduação em Ciências Biológicas, pelos ensinamentos que muito contribuíram para meu crescimento acadêmico, também pela amizade e incentivo. Em especial à Carlos Roberto Ceron, Gustavo Orlando Bonilla Rodrigues, Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Ieda Aparecida Pastre Fertonani, Marlene Kiyoni Hosaki Kobayashi, Mary Massumi Itoyama, Arif Cais, Joseli Maria Piranha Brighetti, Maria Tercília Vilela de Azevedo Oliveira e Neuza Taroda Ranga

Às chefias e professores dos Departamentos de Zoologia-Botânica, Biologia e Física pela facilidade de acesso aos laboratórios e uso dos equipamentos.

À todos os funcionários e técnicos dos departamentos de Zoologia-Botânica, Biologia e Física, Biblioteca, Pólo Computacional, Seção de Pós Graduação e Ambulatório pelos préstimos e simpatia, principalmente à Maria Helena Carabolante, Izabelino Fávaro, Josué Rodrigues dos Santos, Kikue Kamoi de Oliveira, Maria do Carmo Junqueira, Nanci Queiroz de A. Pereira, Oscar José Marques, Rosana Miguel Gomes Ferro, Rosana Silistino de Souza e Regiane Peres.

À Daniela Truffi e Giovana Camarotte, técnicas do laboratório de Biologia Molecular (ESALQ/USP), que auxiliaram nos sequenciamentos.

À Juliana Polachini de Castro pelo auxílio nas análises filogenéticas e, também pela amizade.

Àqueles sem os quais nada seria possível.

Às amigas de graduação Alessandra Pereira Majer, Carla Cristina Biazzi Lorenzi, Elisa Helena Sérgio Bauab, Juliane Ribeiro Cavalcante e Dannie Eiko Maeda Hallal por mostrar que verdadeiras amizades não se abalam nem mesmo com o tempo e distância, são eternas.

Às amigas do laboratório: Ana Cecília Bergamim Pereira, Andréia Estela Moreira, Luciana Márcia Espinha de Santana e Priscila Belintani com quem dividi grande parte do meu tempo nestes anos, minhas alegrias, meus problemas profissionais e pessoais. Poucos têm a sorte de ter amigas como vocês

Aos colegas de Pós graduação que trilharam ao meu lado este árduo caminho: Ana Paula Peres Freski, Cláudia Aparecida Pacheco, Fernanda da Silva Manoel, Sandra Regina de Carvalho Marchesin, Sylvia Sanches Cortezzi, Paula Juliana Antoniazzi Zamaro, Jucimara Colombo, Marcos de Lucca Júnior, Luis Gustavo da Conceição Galego, Luciane Madureira de Almeida, Hamilton Cabral, Fábio Renato Zombardi, Renato César Caetano.

Aos meus amigos Cássia e Maltaroldo, Luciana e Carlos, Rosângela, João que ficaram o tempo todo torcendo para que eu conquistasse meu objetivo.

À minha família, onde busco forças para todas as minhas realizações.

À minha filha Camila, cujo nascimento inesperado me trouxe muitas alegrias, mudou o curso da minha história e, de certa forma, me conduziu a este caminho.

Ao meu querido Ricardo, que aprendeu a "me dividir" com a pesquisa, muitas vezes contrariado, mas nunca impediu que eu realizasse meu sonho.

Aos meus pais Waldemar e Terezinha que, mesmo sem entender direito meu trabalho, sempre me incentivaram.

Ao meu irmão Junior pelo seu inesgotável senso de humor que foi fonte de ânimo em muitos momentos.

À minha irmã por me fazer lembrar que devemos aceitar os desafios que a vida nos impõem sempre com sorrisos.

Aos meus sogros João e Lúcia e meu sobrinho Luis Fernando pelo imenso apoio.

Muito Obrigado!

*Ainda corro, não paro
o mundo me faz correr sem descansar
para quem sabe, alcançar
algo maior, a luz no fim do túnel,
a recompensa máxima,
ser alguém, ser feliz."*

ALBUQUERQUE, Fabrício Bazé

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	16
II. REVISÃO DE LITERATURA	20
II.1. Gênero Papovirus, características gerais	20
II.2. Alguns papovirus com ocorrência no Brasil	25
III. MATERIAL E MÉTODOS	27
III.1. Vírus/Host	27
III.2. Purificação das partículas virais	28
III.3. Espectrofotometria	28
III.4. Microscopia eletrônica ("velocidade")	29
III.5. Microscopia eletrônica do vírus purificado	29
<i>De tudo ficaram três coisas:</i>	
<i>a certeza de que estava sempre começando,</i>	30
<i>a certeza de que era preciso continuar</i>	30
<i>e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.</i>	30
<i>Fazer da interrupção um caminho novo,</i>	
<i>fazer da queda, um passo de dança,</i>	
<i>do medo, uma escada,</i>	
<i>do sonho, uma ponte,</i>	
<i>da procura, uma descoberta.</i>	
III.6. Inoculação	31
III.7. Produção de vírus em células de cultura	31
III.8. Purificação do vírus	32
III.9. Hibridização	32
III.10. Detecção dos híbridos RNA-cDNA	33
III.11. Hibridização	33
III.12. Detecção dos híbridos RNA-cDNA	34
III.13. Hibridização	34
III.14. Detecção dos híbridos RNA-cDNA	35
III.15. Hibridização	35
III.16. Detecção dos híbridos RNA-cDNA	36

Fernando Pessoa

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	16
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
II.1. Gênero Potyvirus: características gerais.....	20
II.2. Alguns potyvirus com ocorrência no Brasil.....	25
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
III.1. Vírus/Planta.....	27
III.2. Purificação das partículas virais.....	28
III.3. Espectrofotometria.....	28
III.4. Microscopia eletrônica ("leaf-dip").....	29
III.5. Microscopia eletrônica do vírus purificado.....	29
III.6. Extração de proteínas totais de folhas.....	30
III.7. Eletroforese.....	30
III.8. "Western blot".....	30
III.9. Imunolocalização da proteína capsidial (Teste Sorológico)	31
III.10. Extração do RNA viral.....	31
III.11. Extração de RNAs totais de folhas.....	32
III.12. Gel nativo de agarose.....	32
III.13. Produção de sonda (cDNA) não radioativa.....	33
III.14. Determinação da especificidade da sonda por "Dot-blot"	34
III.15. Hibridização.....	34
III.16. Detecção dos híbridos RNA-cDNA.....	34
III.17. Gel desnaturante de agarose-formaldeído.....	35
III.18. Determinação do tamanho molecular do RNA viral.....	36

III.19. Síntese do DNA complementar (cDNA).....	36
III.20. Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	37
III.21. Clonagem do produto da reação de PCR.....	37
III.22. Transformação em células bacterianas competentes.....	38
III.23. Sequenciamento do fragmento clonado.....	39
III.24. Análise da sequência.....	39
IV. RESULTADOS.....	41
IV.1. Hospedeiras e sintomatologia.....	41
IV.2. Obtenção do vírus purificado.....	41
IV.3. Massa molecular da proteína capsidial.....	41
IV.4. "Western-blot" da proteína capsidial.....	41
IV.5. RNA viral.....	42
IV.6. Sonda não radioativa.....	42
IV.7. Amplificação por RT/PCR, clonagem e sequenciamento.....	42
V. DISCUSSÃO.....	54
VI. CONCLUSÕES.....	59
VII. RESUMO.....	60
VIII. SUMMARY.....	62
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE VÍRUS CITADOS NO TEXTO

SuCMoV	<i>"Sunflower chlorotic mottle virus"</i>	(Potyvirus)
PVY-T	<i>"Potato virus Y"</i> est. necrótica(Japão)	(Potyvirus)
PVY-H	<i>"Potato virus Y"</i> est. necrótica (Holanda)	(Potyvirus)
PVY-Fr	<i>"Potato virus Y"</i> est. necrótica (França)	(Potyvirus)
PVY-Nus	<i>"Potato virus Y"</i> est. necrótica (EUA)	(Potyvirus)
PVY-Eur	<i>"Potato virus Y"</i> est. necrótica (Europa)	(Potyvirus)
PVY-N-Rus	<i>"Potato virus Y"</i> est. necrótica (Rússia)	(Potyvirus)
PVY(Chil.)	<i>"Potato virus Y"</i> est. necrótica (Chile)	(Potyvirus)
PVY-NBr	<i>"Potato virus Y"</i> est. necrótica (Brasil)	(Potyvirus)
PVY (0')	<i>"Potato virus Y"</i> est. comum (EUA)	(Potyvirus)
PVY (0 ₄)	<i>"Potato virus Y"</i> est. comum (Japão)	(Potyvirus)
PVY (0 ₁)	<i>"Potato virus Y"</i> est. comum (Argentina)	(Potyvirus)
PVY-NsNr	<i>"Potato virus Y"</i> est. necrótica (EUA)	(Potyvirus)
PepMoV	<i>"Pepper mottle virus"</i>	(Potyvirus)
LMV	<i>"Lettuce mosaic virus"</i>	(Potyvirus)
BCMV	<i>"Bean commom mosaic virus"</i>	(Potyvirus)
TuMV	<i>"Turnip mosaic virus"</i>	(Potyvirus)
TEV	<i>"Tobacco etch virus"</i>	(Potyvirus)
MDMV	<i>"Maize dwarf mosaic virus"</i>	(Potyvirus)
SCMV	<i>"Sugarcane mosaic virus"</i>	(Potyvirus)
TVMV	<i>"Tobacco vein mottling virus"</i>	(Potyvirus)
PRSV-P	<i>"Papaya ringspot virus"</i> est. mamoeiro	(Potyvirus)
PRSV-W	<i>"Papaya ringspot virus"</i> est. melancia	(Potyvirus)
ZYMV	<i>"Zucchini yellow mosaic virus"</i>	(Potyvirus)
WMV-2	<i>"Watermelon mosaic virus - 2"</i>	(Potyvirus)
PWV	<i>"Passion woodiness virus"</i>	(Potyvirus)
BYMV	<i>"Bean yellow mosaic virus"</i>	(Potyvirus)

BiMV	<i>"Bidens mosaic virus"</i>	(Potyvirus)
BiMoV	<i>"Bidens mottle virus"</i>	(Potyvirus)
PSbMV	<i>"Pea seed-borne mosaic virus"</i>	(Potyvirus)
PVMV	<i>"Pepper veinal mottle virus"</i>	(Potyvirus)
PPV	<i>"Plum pox virus"</i>	(Potyvirus)
CAMV	<i>"Cowpea aphid-borne mosaic virus"</i>	(Potyvirus)
PeMoV	<i>"Peanut mottle virus"</i>	(Potyvirus)
PStV	<i>"Peanut strip virus"</i>	(Potyvirus)

ABREVIACÕES DE SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

- 2-ME : 2 β -mercaptoetanol
- anti-dig: anti-soro anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina
- BCIP/NBT: 5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato/nitro-blue tetrazolio
- BSA: soroalbumina bovina
- CDP-STAR: solução aquosa de <1,5% (p/v) disodium 2-cloro-5-(4metoxispiro[1,2-dioxitano-3,2'-(5'-cloro)-tríciclo[3,3,1,1,^{3,7}]decan]-4yl)fenil fosfato
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP: deoxinucleotídeos (ATP: adenina trifosfato; CTP: citosina trifosfato; GTP: guanidina trifosfato; TTP: timina trifosfato; UTP: uracila trifosfato)
- DEPC: dietil pirocarbonato de sódio
- dig-dUTP: dUTP marcado com digoxigenina
- DTT: ditiotreitól
- EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
- IPTG: isopropil - β -D-galactosidase
- KCl: cloreto de potássio
- LB: meio Luria-Bertani
- MgCl₂: cloreto de magnésio
- DH₂PO₄: fosfato de potássio
- MOPS: ácido morfolinopropanesulfônico
- NaCl: cloreto de sódio
- NaOH: hidróxido de sódio
- PBS: solução salina tamponada com fosfato
- PBS-T: PBS contendo Tween 20 0,3%
- PEG 8000: polietilenoglicol
- SDS: lauril sulfato de sódio ou dodecil sulfato de sódio
- Tris-HCl: tampão Tris-Base com pH ajustado com HCl
- X-gal: substrato cromogênico 5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactosidase

INTRODUÇÃO

As estatísticas sobre o setor de flores e plantas ornamentais no Brasil são muitas vezes desorganizadas e contraditórias. Apesar da inexistência de levantamento sistemático sobre o assunto, estima-se que o comércio de flores movimente no varejo entre R\$ 1,36 e 1,53 bilhão (Aki, 2001). O Estado de São Paulo destaca-se entre os estados produtores de flores no panorama nacional, participando com 71,3% da área cultivada e 74,5% do valor da produção no País (Aki, 2001).

Zinnia elegans Jacq, popularmente conhecida como capitão, moça-e-velha, canela-de-velho ou zínia, é uma Angiosperma da família das Compostas (*Asteraceae*) originária do México. É uma planta herbácea anual de caule ereto, folhagem áspera, flores pequenas reunidas em capítulos grandes de várias cores e de formas diferentes (Gemtchújnicov, 1976). É uma ornamental (Figura 1A) cultivada para a produção de flor de corte devido a sua longa durabilidade, sendo adequada também para a utilização em bordaduras e maciços a pleno sol, tanto para regiões de temperatura amena como para áreas tropicais, formando maravilhosos canteiros. Multiplica-se por sementes, semeadas durante o ano todo, principalmente na primavera e verão (Lorenzi e Souza, 1999).

Em várias partes do mundo, *Zinnia elegans* foi descrita como hospedeira natural ou experimental de espécies virais pertencentes a diversos gêneros, citando-se o *Alfamovirus*, *Nepovirus*, *Potexvirus*, *Carlavirus*, *Potyvirus*, *Ilarvirus*, *Luteovirus*, *Tospovirus*, *Tobamovirus*,



Closterovirus, *Tombusvirus* e *Nucleorhabdovirus* (Brunt et al., 1996). Em relação ao gênero *Potyvirus*, zínia foi infectada, entre outras, pelas espécies *Bean yellow mosaic virus*, *Bidens mosaic virus*, *Bidens mottle virus*, *Lettuce mosaic virus*, *Papaya ringspot virus "W"*, *Pea seed-borne mosaic virus*, *Pepper veinal mottle virus*, *Plum pox virus*, *Tobacco etch virus* e *Turnip mosaic virus* (Brunt et al., 1996).

No Brasil (Viçosa, MG), *Zinnia elegans* foi descrita como naturalmente infectada pelo *Bidens mosaic virus* (Kitajima e Lima, 1991), um *Potyvirus* que, nos anos 60, foi responsável por grandes prejuízos para a cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.) (Costa e Kitajima, 1966).

Recentemente foram encontradas, em um canteiro experimental da UNESP de São José do Rio Preto, plantas de capitão exibindo mosqueado, deformação foliar (Figura 1B) e flores com alterações no padrão de coloração (Figura 1C). Observações ao microscópio eletrônico de extratos de folhas dessas plantas evidenciaram a presença de partículas com aproximadamente 750 nm de comprimento e com morfologia típica de espécies do gênero *Potyvirus* (Figura 1D). Entretanto, experimentos preliminares indicaram que o vírus possuía propriedades que o diferenciava do *Bidens mosaic virus*, indicando tratar-se de uma espécie distinta.

O objetivo principal do presente trabalho foi identificar e caracterizar o *Potyvirus* encontrado em *Zinnia elegans* na região Norte



do Estado de São Paulo, preliminarmente designado, neste trabalho, como vírus do mosaico de zínia (ZiMV).

Para isso foram alcançados os seguintes objetivos específicos:

- Determinação da gama de hospedeiras e sintomatologia do ZiMV.
- Purificação das partículas virais.
- Determinação da massa molecular da proteína capsidial do vírus.
- Teste sorológico utilizando o anti-soro para o BiMV.
- Extração e análise do RNA viral.
- Produção de uma sonda não radioativa utilizando o RNA viral.
- Amplificação por RT/PCR, clonagem e sequenciamento do gene da proteína capsidial do ZiMV.

Figura 1: (A) Capiteiro de capifão (*Zinnia elegans*); (B) Capifão com sintomas de mosaico; (C) Descoloração apresentada por uma flor de capifão infectada pelo ZiMV (direita) comparada com uma flor de planta sã (esquerda); (D) "Leaf dip" a partir de folha de capifão infectada demonstrando a presença de partículas de morfologia típica do gênero *Poliovirus*. Aumento: 66.500x.

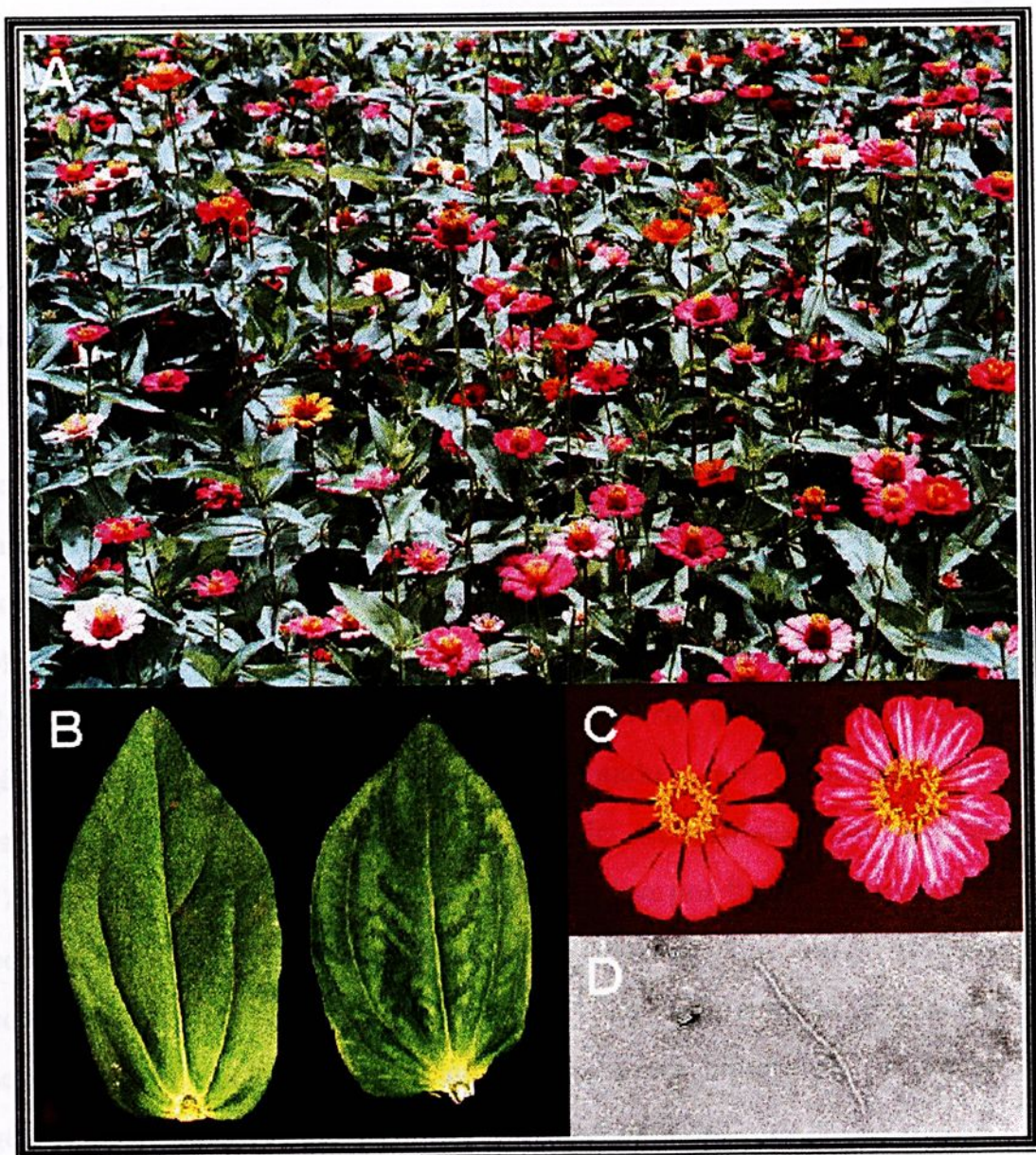


Figura 1: (A) Canteiro de capitão (*Zinnia elegans*); (B) Capitão com sintoma de mosaico; (C) Descoloração apresentada por uma flor de capitão infectada pelo ZiMV (direita) comparada com uma flor de planta sadia (esquerda); (D) “Leaf dip” a partir de folha de capitão infectado demonstrando a presença de partículas de morfologia típica do gênero *Potyvirus*. Aumento: 66.800x.

REVISÃO DE LITERATURA

Gênero *Potyvirus*: características gerais

O gênero *Potyvirus*, cuja espécie tipo é o *Potato virus Y* (PVY), pertence a família *Potyviridae* e atualmente é o gênero que possui o maior número de espécies dentre os vírus de plantas; cerca de 30% das doenças de plantas de etiologia viral são causadas por *Potyvirus* (López-Moya e García, 1999). A família *Potyviridae* inclui cinco outros gêneros: *Rymovirus*, *Macluravirus*, *Ipomovirus*, *Bymovirus* e *Tritimovirus*. Cada gênero dentro da família parece ser adaptado a um organismo vetor específico: *Potyvirus* e *Macluravirus* são transmitidos por afídeos, *Tritimovirus* e *Rymovirus* por ácaros, *Bymovirus* por fungos e *Ipomovirus* por mosca branca. Com exceção dos *Bymovirus*, que tem o genoma composto por duas moléculas de RNA de fita simples envolvidas separadamente pela proteína capsidial (genoma bipartido), os demais gêneros têm genoma monopartido (Barnett *et al.*, 1995).

Os vírus da família *Potyviridae* encontram-se amplamente distribuídos por todo mundo, alguns possuindo uma restrita gama de hospedeiras, outros infectando um número considerável de espécies em várias famílias de angiospermas. Em geral, os *Potyvirus* têm grande importância econômica pois infectam culturas agrícolas como grãos, legumes, forragens, verduras, frutas e ornamentais causando sérios prejuízos (Hollings e Brunt, 1981; Riechmann *et al.*, 1992). A transmissão dos potyvirus ocorre de maneira não persistente por afídeos,



ou seja, o vírus adquirido pelo vetor não permanece no em seu organismo por muito tempo (Barnett, *et al.* 1995; Brunt, 1992).

Os *Potyvirus* possuem partículas alongadas e flexíveis com 680-900 nm de comprimento e 11-15nm de diâmetro (Hollings e Brunt, 1981), contendo uma única molécula de RNA envolta por cerca de 2000 capsômeros de uma única proteína (proteína capsidial) com massa molecular de 28 a 47 kDa (Allinson *et al.*, 1985; Hollings e Brunt, 1981).

O ácido nucleico dos *Potyvirus* é uma molécula de RNA de fita única de 9,4-10,3 Kb e polaridade positiva (atua como um RNA mensageiro), com uma proteína covalentemente ligada ao terminal 5' ("Proteína viral ligada ao genoma", VPg, 24 Da) e uma cauda poliadenilada no terminal 3' (Brunt, 1992). O RNA compreende uma única "open reading frame" (ORF) que codifica para uma poliproteína (340-370 kDa) que, depois de sofrer um processo de autoproteólise em cascata, gera produtos funcionais (Riechmann *et al.*, 1992). A organização do genoma dos *Potyvirus* encontra-se ilustrada na Figura 2 e as propriedades e massas moleculares das diferentes proteínas na Tabela 1.



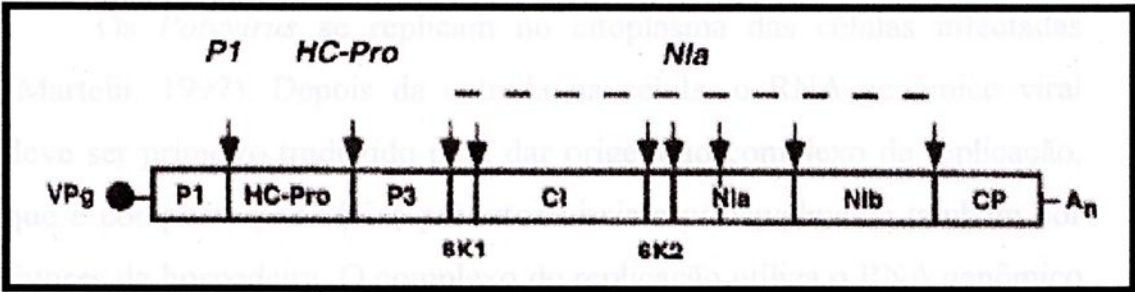


Figura 2. Organização do genoma dos Potyvirus. A linha horizontal é o RNA genômico com a VPg na região terminal 5' e a cauda poli-A na região terminal 3'. A poliproteína inicia em P1 e termina em CP. As proteínases virais estão indicadas na parte superior e as posições onde ocorrem clivagens estão indicadas por linhas verticais. NIa cliva todos os sítios exceto aqueles clivados por P1 e HC-Pro. (Adaptado de Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Tabela 1*. Propriedades das diferentes proteínas codificadas pelos Potyvirus

Proteínas (massa molecular)	Propriedades
P1 (32-64 kDa)	Serina-proteinase similar à tripsina, autoclivagem C-terminal, sintomatologia
HC-Pro (56-58 kDa)	Cisteína-proteinase similar à papaína, autoclivagem C-terminal, transmissão por afídeos em associação com a CP, movimento sistêmico, supressão do silenciamento de genes, desenvolvimento de sintomas e sinergismo
P3 (37 kDa)	Patogenicidade
6K1	Função desconhecida
CI (70 kDa)	ATPase/RNA helicase, movimento célula-a-célula
6K2	Ligação de complexos de replicação viral a membranas
NIa (49 kDa)	Serina-proteinase semilar à tripsina, clivagem dos sítios não clivados por P1 e HC-Pro, localização celular, VPg envolvida na replicação do genoma, interação proteína-proteína
NIB (58 kDa)	RNA polimerase dependente de RNA (RdRp)
CP (28-40 kDa)	Transmissão por afídeos, movimento célula-a-célula e movimento sistêmico, montagem da partícula viral

(*) Adaptado de Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001

Os *Potyvirus* se replicam no citoplasma das células infectadas (Martelli, 1997). Depois da entrada na célula, o RNA genômico viral deve ser primeiro traduzido para dar origem ao complexo de replicação, que é composto por vários produtos virais e provavelmente também por fatores da hospedeira. O complexo de replicação utiliza o RNA genômico (polaridade positiva) como um molde para gerar uma fita complementar (polaridade negativa), a qual serve como molde para a síntese de numerosos RNA genômicos. A tradução destes RNA genômicos resulta no acúmulo de proteínas virais, inclusive a proteína capsidial, que envolve os RNA genômicos gerando novas partículas virais. O movimento para células adjacentes na planta ocorre através da passagem do RNA através dos plasmodesmos, em uma forma ainda não totalmente identificada, com o envolvimento de muitas proteínas virais, tais como HC, CI, VPg e CP. Na célula recentemente infectada, o ciclo de replicação se repete (López-Moya e Garcia, 1999).

Algumas das proteínas virais produzidas durante o ciclo de multiplicação acumulam-se formando corpos de inclusão em diversos compartimentos celulares, enquanto outras podem ser degradadas ou permanecer na célula em muito baixas concentrações (López-Moya e Garcia, 1999). Todas as espécies do gênero *Potyvirus* induzem a formação de inclusões citoplasmáticas cilíndricas (constituídas de CI) sendo que algumas delas induzem também a formação de inclusões amorfas (constituídas de HC) ou inclusões nucleares (constituídas de NIa e NIb) (Edwardson *et al.*, 1993).



Com base nos diferentes tipos de inclusões cilíndricas (cataventos ou "pinwheels"; rolos ou "scrolls"; agregados laminados; agregados laminados curtos e curvados), o gênero *Potyvirus* é separado em quatro subdivisões (Edwardson, 1974; Edwardson *et al.*, 1984):

Subdivisão I: contém espécies que induzem inclusões cilíndricas do tipo I (cataventos e rolos)

Subdivisão II: contém espécies que induzem inclusões cilíndricas do tipo II (cataventos e agregados laminados)

Subdivisão III: contém espécies que induzem inclusões cilíndricas do tipo III (cataventos, rolos e agregados laminados)

Subdivisão IV: contém espécies que induzem inclusões cilíndricas do tipo IV (cataventos, rolos e agregados laminados curtos e curvados).

Métodos sorológicos, que são utilizados com sucesso na identificação de vírus de plantas e na determinação de relações filogenéticas entre eles, não são eficientes quando usados para potyvirus devido à ocorrência de reações cruzadas entre os vírus e de relações sorológicas inconsistentes (Shukla *et al.*, 1991). Isso provavelmente se deve ao fato de que os epitopos específicos do gênero estejam principalmente localizados na região interna conservada ("core") da proteína capsidial, enquanto aqueles específicos para espécies estejam localizados na região variável N-terminal, a qual fica externamente exposta na partícula e sujeita a degradação nos processos de purificação, tornando difícil a produção de anti-soros para esta região. Os anti-soros produzidos são úteis na detecção de membros do gênero *Potyvirus*, mas

não para determinação de espécies (Jordan e Hammond, 1991; Jordan, 1992).

Devido a essas dificuldades, o critério da identidade de nucleotídeos, principalmente na região terminal-3', tem sido utilizado para definir relações filogenéticas dentro do gênero *Potyvirus* (Ward *et al.*, 1992). Através da comparação da sequência de nucleotídeos da região interna conservada ("core") do gene da capa proteica, identidades de 55-75% indicam diferentes espécies de potyvirus, 74-88% refletem subgrupos de uma espécie, enquanto que identidades de 90-99% correspondem a estirpes de um determinado potyvirus (Shukla *et al.*, 1991; Ward e Shukla, 1991; Ward *et al.*, 1992).

Alguns potyvirus com ocorrência no Brasil

No Brasil, muitos potyvirus já foram descritos (Kitajima, 1986;1995) e as doenças causadas por eles representam um grande problema para várias culturas, sendo determinantes de elevadas perdas na produtividade (Zerbini e Zambolim, 1999). Nesse sentido, alguns dos mais importantes são:

- *Papaya ringspot virus* – estirpe W ("watermelon"): a produção comercial de cucurbitáceas é afetada por diversos vírus, sendo que o *Papaya ringspot virus*-W é considerado o mais importante, pelos prejuízos significativos que causa à produção (Albuquerque *et al.*, 1972; Lima *et al.*, 1980; Pavan *et al.*, 1989; Yuki *et al.*, 2000; Stangarlin *et al.*, 2001). Outros dois potyvirus, o *Watermelon mosaic*

virus 2 (WMV-2) e o *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) são também considerados fatores limitantes no cultivo de cucurbitáceas (Oliveira *et al.*, 2000).

- *Papaya ringspot virus* – estirpe P (“papaya”): o mamoeiro (*Carica papaya* L), outra cultura de grande importância econômica, é afetado pelo *Papaya ringspot virus*-P, um vírus que ocasiona grandes perdas na produtividade podendo até induzir a destruição total das plantações (Rezende e Fancelli, 1997).
- *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CAMV): o caupí (*Vigna unguiculata* Bertoni), muito cultivado no Nordeste, é afetado por vários vírus e o CAMV merece destaque pela larga dispersão e pelo nível dos danos ocasionados nessa cultura (Santos *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 1981). Este vírus foi também encontrado infectando plantações de soja no Estado do Ceará (Lima *et al.*, 1990).
- *Passion fruit woodiness virus* (PWV): a cultura do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg) é afetada por vários vírus e o PWV é, provavelmente, o mais importante pelas perdas induzidas e pela predominância na cultura (Costa *et al.*, 1995; Gioria *et al.*, 2000).

Algumas doenças causadas por potyvirus constituíram sérios problemas fitossanitários no passado mas hoje encontram-se controladas. Citam-se como exemplos o *Bean common mosaic virus* (Costa *et al.*, 1972), o *Sugarcane mosaic virus* (Costa *et al.*, 1971), o *Peanut mottle virus* e o *Peanut strip virus* (Costa e Kitajima, 1974; Kitajima, 1986; Pio-Ribeiro *et al.*, 1996) e o *Bidens mosaic virus* infectando girassol (Costa e Kitajima, 1966).



MATERIAL E MÉTODOS

Texto descrito de acordo com a revista "Journal Virological Methods"

Nos procedimentos utilizados para extração e análise de RNA a água e as soluções utilizadas foram tratadas com dietil pirocarbonato de sódio (DEPC) para eliminação de RNases. As vidrarias foram esterilizadas, em uma estufa a seco, a 200°C por 3 horas.

1. Vírus/Planta

- O *Potyvirus* utilizado neste estudo foi obtido de plantas de capitão (*Zinnia elegans*), com sintoma de mosaico, encontradas no Câmpus da UNESP de São José do Rio Preto
- Preparo do inóculo: maceração das folhas em tampão fosfato de potássio 0,02M pH 7,4, contendo sulfito de sódio 0,02M
- Aplicação manual do inóculo em folhas de *Chenopodium quinoa* utilizando Celite como abrasivo
- Uma única lesão local clorótica da folha de *C. quinoa* foi isolada, macerada em tampão e inoculada em *Nicotiana occidentalis*. Esta planta foi, então, utilizada como fonte de inóculo para os demais experimentos para determinação da gama de hospedeiras



2. Purificação das partículas virais

- Folhas de *N. occidentalis* infectadas foram trituradas em liquidificador com igual volume de KH_2PO_4 0,25M pH 7,5 contendo EDTA 0,01M e 0,1% de 2-mercaptoetanol
- Filtração em gaze
- Centrifugação por 10 min. a 10.000g e recuperação da fase aquosa
- Precipitação do vírus da fase aquosa pela adição de 4% PEG 8000, 1% triton X-100 e NaCl 0,1M sob agitação por 2:30 h. a 4°C
- Centrifugação por 15 min. a 8.000g e re-suspensão do "pellet" em KH_2PO_4 0,25M pH 7,5 contendo MgCl_2 0,01M sob agitação lenta por 14 h. a 4°C
- Centrifugação por 10 min. a 8.000g e recuperação da fase aquosa
- Ultracentrifugação por 1:30 h. a 100.000g e re-suspensão do "pellet" em 1ml de tampão fosfato 0,01M, pH 7,0
- Centrifugação por 10 min. a 8.000g e recuperação da fase aquosa
- Ultracentrifugação em gradiente isopínico de cloreto de cério (CsCl) a 15% sobre um colchão também de CsCl a 53% dissolvidos em KH_2PO_4 0,01M pH 7,0, por 16 h. a 150.000g
- Coleta da banda resultante e diálise desta por 3 vezes em KH_2PO_4 0,01M pH 7,0, obtendo-se assim o "vírus purificado"

3. Espectrofotometria

- Vírus purificado submetido a leitura em espectro de 220 a 320nm (luz ultravioleta)



- Determinação da concentração viral utilizando o coeficiente de extinção utilizado para potyvirus cujo valor é 2,4mg/ml por centímetro em leitura à 260nm (Shepherd e Purcifull, 1971)

4. Microscopia eletrônica ("leaf-dip") (Kitajima, 1965)

- Aplicação de uma gota do contrastante ácido fosfotúngstico a 2% sobre telinha de microscopia recobertas com Butvar (Sigma) 3% e reforçadas por deposição de carbono
- Pequenos (1mm²) pedaços de folhas são mergulhados na gota e, após 1 minuto, retirados com pinça
- Absorção do contrastante com papel de filtro
- Observação da telinha em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM906

5. Microscopia eletrônica do vírus purificado

- Aliquotas do vírus purificado foram aplicadas sobre telinhas de microscopia eletrônica recobertas com Butvar (Sigma) 3% e reforçadas por deposição de carbono
- Contrastação negativa por 1 min. com acetato de uranila 2%
- Observação em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906, operando a 80KV



6. Extração de proteínas totais de folhas

- Homogeneização de folhas em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,5 contendo sacarose 0,4M, $MgCl_2$ 0,005M, KCl 0,01M e glicerol 20% (v/v) (Bradley e Zaitlin, 1971)
- Centrifugação por 5 min. a 16.000g e recuperação da fase aquosa
- Precipitação com 5 volumes de acetona à $-20^{\circ}C$ /20 horas
- Recuperação das proteínas por centrifugação por 20 min. a 16.000g
- Ressuspensão em tampão de amostra para eletroforese

7. Eletroforese

- Gel desnaturante em SDS-PAGE conforme Laemmli (1970)
- Gel de empacotamento a 5% e de resolução a 15%
- Proteínas desnaturadas por fervura (3 min. a $100^{\circ}C$) em tampão de amostra (Tris.HCl 0,125 M pH 6,8 contendo SDS 4%, glicerol 20%, 2-ME 10% e azul de bromofenol 0,001 M)
- Eletroforese por 90 min. a 100V em aparelho Mini Protean II (BioRad)
- Fixação das proteínas em mistura de metanol, água e ácido acético (50:50:10) por 60 min.
- Coloração com azul de Comassie 0,25% nessa mesma mistura por 60 min e descoloração com metanol e água (1:1) por 18 horas

8. "Western blot"

- Eletroforese das proteínas conforme os quatro primeiros passos do item 6



- Transferência para membrana de nitrocelulose (Gibco-BRL) em um eletrotransferidor (Mini Trans-Blot Electrophoretic Cell, BioRad) operando a 100V (constante) por 60 min.
- Tampão de transferência: Tris-Glicina (Tris 0,025M, Glicina 0,192M) contendo metanol 20%

9. Imunolocalização da proteína capsidial (Teste Sorológico)

- Incubação da membrana de nitrocelulose “overnight” a 4°C em tampão PBS contendo BSA 5% e Tween-20 0,3% (PBS-T)
- Incubação por 1 hora a temperatura ambiente com anti-soro primário (anti-BiMV) diluído 1:1.000 com tampão PBS-T contendo BSA 0,5% e heparina a 20µg/ml (Dietzgen e Francki, 1987).
- Lavagens com PBS-T (3 x 15 min)
- Incubação por 60 min. à temperatura ambiente com anti-soro anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído (1:30.000) em PBS-T contendo BSA 0,5%
- Lavagens com PBS (3 x 5 min.)
- Incubação por 20 min. com mistura de BCIP/NBT (substrato para fosfatase alcalina).

10. Extração do RNA viral

- Extração de RNA viral de partículas purificadas utilizando o “RNeasy Plant Mini Kit” conforme especificações do fabricante (QIAGEN)



- eluição em água-DEPC e estocagem a -20°C

11. Extração de RNAs totais de folhas

- Extração a partir de folhas de plantas inoculadas e planta sadia
- 100mg de folhas congeladas com N_2 líquido e trituradas a pó
- Extração com 1,0ml de tampão contendo guanidina 4M; acetato de sódio 0,2M pH 5,0; EDTA 25mM e PVP-40 2,5% (Mackenzie *et al.*, 1997)
- Coleta da fase aquosa (0,5ml) após centrifugação a 12.000g por 15 min. a 4°C
- Precipitação dos RNAs com 0,5ml de isopropanol por 10 min. a temperatura ambiente
- Recuperação do RNA por centrifugação a 12.000g por 20 min. a 4°C
- Lavagem do RNA com etanol 75%, ressuspensão em tampão de desnaturação (MOPS 0,02M contendo formamida 67% e formaldeído 2,46M) e estocagem a -20°C

12. Gel nativo de agarose

- Agarose 1% em tampão TAE (Tris.HCl 0,04M; acetato de sódio 0,02M; EDTA 0,001M pH 8,3)
- Amostras de ácidos nucleicos diluídas em tampão amostra (TAE 1x; glicerol 20% e Orange G)
- Eletroforese a 80-100 V até o corante chegar cerca de 1cm da porção final do gel; tampão de corrida TAE



- Ácidos nucleicos corados por 10 min. com brometo de etídio (0,05µg/ml), descorados em água, observados e fotografados sob luz ultravioleta

13. Produção de sonda (cDNA) não radioativa a partir do RNA viral

- Volume de reação de 20µl consistindo de 50mM Tris.HCl (pH 8,3); 75mM KCl; 10mM DTT; 3mM MgCl₂; 0,1mM cada dGTP, dATP, dCTP; 0,065mM dTTP; 0,035mM DIG-dUTP; 10µg/ml hexanucleotídeos; 1 unid. Inibidor de RNase; 1µg RNA viral; 200 unid. Transcriptase Reversa “Superscript” (Gibco).
- Desnaturação do RNA viral e dos hexanucleotídeos por aquecimento a 95°C por 5 min; resfriamento em gelo/álcool; adição dos demais componentes da reação
- Incubação por 20 h a 42°C e término da reação pela adição 1µl de EDTA 0,2M
- Precipitação do cDNA com 0,1 vol. de cloreto de lítio 4M e 3 vol. de etanol a -70°C por 60 min.
- Recuperação do cDNA por centrifugação a 13.000g por 15 min. a 4°C
- Lavagem do RNA com etanol 75%, ressuspensão em tampão TE (Tris.HCl 0,01M; EDTA 0,001M) e estocagem a -20°C



14. Determinação da especificidade da sonda por "Dot blot"

- Desnaturação dos RNAs por aquecimento a 55°C por 15 min., resfriamento em gelo/álcool e aplicação em membrana de nylon (Hybond-N+; Amersham Pharmacia)
- Fixação dos RNAs por exposição à radiação ultravioleta a 50 mJoule (GS Gene Linker; BioRad) e hibridização com sonda específica

15. Hibridização

- Pré-hibridização a 50°C por 1-2 h em solução contendo: SDS 7%; fosfato de sódio 0,05M pH 7,0; formamida 50%; reagente bloqueador (Boehringer Mannheim) 2%; SSC 5X (SSC 1X= citrato de sódio 0,03M pH 7,0; NaCl 0,3M); N-lauroylsarcosina 0,1%
- Hibridização a 50°C por 20 h em solução de pré-hibridização acrescida da sonda previamente desnaturada por fervura a 100°C por 10 min. e resfriamento em gelo/álcool
- Lavagens da membrana com SSC 2X contendo SDS 0,1% (2 x 5 min; temperatura ambiente) e SSC 1X contendo SDS 0,1% (2 x 15 min.; 68°C)

16. Detecção dos híbridos RNA-cDNA

- Incubação da membrana por 1 min. a temperatura ambiente em tampão 1 (ácido maleico 0,1M pH 7,5; NaCl 0,15M; Tween 20 0,3%)
- Bloqueio por 60 min. a temperatura ambiente em tampão 2 (tampão 1 contendo reagente bloqueador 1%, Boehringer Mannheim)



- Incubação por 60 min. a temperatura ambiente com anti-soro (anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina; Boehringer Mannheim) diluído 1:10.000 em tampão 2
- Lavagens com tampão 1 (2 x 15 min.; temperatura ambiente) e incubação por 2 min. a temperatura ambiente com tampão 3 (Tris.HCl 0,1M pH 9,5; NaCl 0,1M; MgCl₂ 0,05M)
- Incubação por 5 min. a temperatura ambiente com substrato quimioluminescente (CDP-Star, Amersham) diluído 1:100 em tampão 3 e exposição de filme de raio X (X-OMAT, Kodak)

17. Gel desnaturante de agarose-formaldeído

- Agarose 1% em tampão MOPS 0,02M pH 7,0, acetato de sódio 0,05M, EDTA 0,01M contendo formaldeído 0,66M
- Amostras de ácidos nucleicos diluídas em tampão desnaturante (MOPS 0,02M contendo formamida 67% e formaldeído 2,46M); aquecimento por 15 min. a 55°C; imediato resfriamento em gelo/álcool; adição de corante Orange G (EDTA 0,01M, Ficoll 400 15% e Orange G)
- Eletroforese a 80-100 V até o corante chegar cerca de 1cm da porção final do gel; tampão de corrida MOPS 0,02M pH 7,0
- Incubação do gel em solução aquosa de glicina à 1% por 1 h para melhor contraste das bandas



- Ácidos nucleicos corados por 10 min. com brometo de etídio (0,05g/ml), descorados por 16-18 h em água-DEPC a 4°C e observados e fotografados sob luz ultravioleta

18. Determinação do tamanho do RNA viral

- Gel desnaturante de agarose-formaldeído (item 16)
- Utilização de marcadores de RNA de tamanho molecular conhecido (0,24-9,5 Kb RNA Ladder; Gibco).

19. Síntese do DNA complementar (cDNA)

- “Primers” utilizados: CN47, CN54 E CN55 contendo 21 timinas antecedidas, respectivamente, por A, C ou G (Pappu *et al.*, 1993) complementares à cauda poli(A) da região 3’terminal do RNA viral.
- Desnaturação do RNA viral e dos “primers” por aquecimento a 95°C por 10 min. e imediato resfriamento com gelo/álcool; adição dos demais componentes
- Volume de reação (20µl) consistindo de: 50mM Tris.Cl pH 8,3; 75mM KCl; 10mM DTT; 0,1mM cada dCTP, dGTP, dATP, dTTP; 0,4mM de cada “primer”, 2 U de Inibidor de RNase; 1µg RNA viral e 40 unid. de Transcriptase Reversa (SuperScrip Rnase H, Gibco).
- Incubação por 1-2 h. a 42°C.



20. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

- Os “primers” utilizados foram sintetizados com base na sequência publicada por Dujovny e colaboradores (2000), de um *Potyvirus* encontrado na Argentina infectando girassol (AF255677), com as seguintes seqüências:

Sense: 5'-GGA ACG TAT GAA GTG CAC CA-3'

Anti-sense: 5'-GCT TGG GGT TCG TAA CAT GTG A-3'

- A mistura de reação (50 µl) consistiu de: 20mM Tris.Cl pH 9,5; 50mM KCl; 3,5mM MgCl₂; 0,2mM cada dCTP, dGTP, dATP, dTTP; 2µl da mistura de reação de cDNA; 0,4µM cada “primer” (sense e anti-sense); 3 U de *Taq* polimerase (Gibco).
- PCR: desnaturação inicial por 10 min. e 30 ciclos de 1 min. de desnaturação a 94°C, 1 min. de anelamento dos “primers” a 47°C e 2 min. de extensão a 72°C. Extensão final por 10 min. a 72°C. Termociclador MJ Reserch

21. Clonagem do produto da reação de PCR

- Eletroforese em gel nativo de agarose 1%
- Purificação do fragmento usando o kit “Concert™ Rapid PCR Purification System” (Gibco-BRL)
- Quantificação do fragmento purificado em gel nativo de agarose 1% utilizando marcador quantitativo “Low DNA Mass™ Ladder” (Gibco-BRL)



- Ligação do fragmento ao plasmídeo pUC 18 SmaI/BAP com o kit "SureClone™ Ligation" (Amersham Pharmacia) ou kit "TOPO" (Quiagen)
- Otimização da eficiência de ligação pelo uso de taxa equimolar de extremidades de inserto (fragmento de DNA) para vetor (plasmídeo)
- Enzima de ligação T4-DNA ligase em reação de 2 h. a 16°C

22. Transformação em células bacterianas competentes

- Incubação de 5µl da solução contendo plasmídeo com 100µl de bactérias *Escherichia coli* linhagem DH 5α (Gibco-BRL) por 1 h. em gelo
- Tratamento de choque térmico a 42°C por 90 s. e imediata incubação em gelo por 2 min.
- Adição de 800µl de meio líquido SOC [triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, Mg^{2+} ($MgCl_2$: $MgSO_4$), glicose 20mM]. Incubação por 1 h. a 37°C sob agitação vigorosa
- Plaqueamento em placas de Petri com meio sólido LB (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, ágar 1,5%) contendo ampicilina 100µg/ml. Sobre a superfície do meio foram espalhados 100µl de IPTG 100mM e 20µl de X-gal 50 mg/ml. Incubação por 16 h. a 37°C
- Seleção dos clones recombinantes através de "Dot blotting" e hibridização com a sonda específica
- Transferência das colônias positivas para tubos de ensaio contendo meio LB líquido + ampicilina 100µg/ml

- Extração do plasmídeo recombinante pelo uso do kit “Concert™ Rapid Plasmid Purification System” (Gibco-BRL). Estocagem do plasmídeo diluído em TE a -20°C
- Identidade do fragmento clonado por digestão com enzimas de restrição (EcoRI e HindIII) e posterior “Southern blot” e hibridização com sonda específica para o potyvirus
- Um dos clones foi obtido utilizando o kit “TOPO TA cloning” conforme especificações do fabricante (INVITROGEN)

23. Seqüenciamento do fragmento clonado

- Foram seqüenciados 5 clones em ambos os sentidos
- “Primers” utilizados: “M13 Universal Sequencing Primers (forward and reverse)”
- As reações de seqüenciamento foram feitas com o “DNA sequencing Kit Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” de acordo com as instruções do fabricante (Perkin Elmer)
- O seqüenciamento foi feito no ABI Prism 377 DNA Sequencer
- Para obtenção da seqüência consenso foi utilizado o programa MULTALIN (INRA)

24. Análise da seqüência

- Seleção de algumas seqüências de potyvirus depositadas no “GenBank”
- Análise comparativa das seqüências pelo sistema BLAST (NCBI)



- Alinhamento das seqüências pelo programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994)
- Relações filogenéticas pelo método "neighbor-joining" (NJ) (Saitou e Nei, 1987) como implementado no PAUP v.4.0b10 (Swofford, 1997)
- Análise de "bootstrap" consistindo de 500 réplicas
- Construção da árvore usando Tree View 1.6.1.

2. Obtenção do vírus purificado

A figura 4 mostra partículas de vírus purificado contrastadas negativamente e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. As partículas mostram-se alongadas e flexíveis com comprimento ao redor de 750 nm.

3. Massa molecular da proteína capsidial

Em gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (6% 3A) ficou evidenciando a presença da proteína capsidial do ZIMV com massa molecular estimada de 33 kDa, colong 1, quando determinada comparativa com proteínas de massas moleculares conhecidas (coluna M).

4. "Western blot" da proteína capsidial

O perfil eletroforético de extratos de folhas de planta sadia e infectada pelo ZIMV revelou um padrão de bandas similar em ambas as amostras. Entretanto, por "Western blot" seguida de reação com anti-soro específico para o *Bolovirus muscae virus* (BIMV), detectou-se uma banda

RESULTADOS

1. Hospedeiras e sintomatologia

As plantas inoculadas mecanicamente e os sintomas induzidos pelo ZiMV estão demonstrados na tabela 2 e figura 3.

2. Obtenção do vírus purificado

A figura 4 mostra partículas do vírus purificado contrastadas negativamente e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. As partículas mostraram-se alongadas e flexíveis com comprimento ao redor de 750 nm.

3. Massa molecular da proteína capsidial

Em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (fig. 5A) ficou evidenciada a presença da proteína capsidial do ZiMV com massa molecular estimada de 33 kDa, coluna 1, conforme determinação comparativa com proteínas de massas moleculares conhecidas (coluna M).

4. "Western blot" da proteína capsidial

O perfil eletroforético de extratos de folhas de planta sadia e infectada pelo ZiMV revelou um padrão de bandas similar em ambas as amostras. Entretanto, por "Western blot" seguido de reação com anti-soro específico para o *Bidens mosaic virus* (BiMV), detectou-se uma banda

de aproximadamente 33 kDa tanto na amostra do vírus purificado como na amostra de proteínas totais obtidas de planta infectada pelo ZiMV. Não houve reação com as proteínas extraídas da planta sadia (fig. 5B).

5. RNA viral

O RNA extraído de partículas do potyvirus purificado, em gel desnaturante de agarose (fig. 6), mostrou apenas uma banda de aproximadamente 9,7 Kb.

6. Sonda não radioativa

A sonda produzida para o RNA do ZiMV hibridizou especificamente com o RNA genômico extraído de partículas e com o RNA viral extraído de planta infectada pelo ZiMV (fig. 7). Não houve hibridização com o RNA do *Tobacco mosaic virus* (TMV) nem com RNA extraído de folha de planta sadia.

7. Amplificação por RT/PCR, clonagem e seqüenciamento

Um fragmento de tamanho esperado de aproximadamente 820 pb foi amplificado por RT/PCR (fig. 8). Após clonagem em vetor pUC18, bactérias *Escherichia coli* foram transformadas e cinco clones selecionados. Os plasmídeos extraídos foram duplamente digeridos com as enzimas EcoRI e HindIII liberando um fragmento de aproximadamente 820 pb (fig. 9A). A identidade viral do fragmento foi positivamente demonstrada por "Southern blot" e hibridização com sonda

específica para o ZiMV (fig. 9B). A diferença no tamanho do plasmídeo na coluna 1 pode ser explicado pelo fato deste clone ter sido obtido utilizando-se o kit "TOPO TA" enquanto os demais foram obtidos pelo sistema "SureCloning" que tem plasmídeos de tamanhos diferentes.

O seqüenciamento do fragmento viral demonstrou a existência de 822 pb (fig. 10), correspondendo aos 27 nt finais do gene da proteína Nib (9aa) e aos 795 nt da região codificadora da proteína capsidial (264aa), incluindo-se o códon de terminação UGA.

A identidade entre a seqüência completa da proteína capsidial e também o "core" do ZiMV e outros *Potyvirus* selecionados está demonstrada na tabela 3.

A figura 11 resume os resultados da análise filogenética das seqüências dos potyvirus usando o método de "neighbor-joining". A árvore obtida indica que o ZiMV e o SuCMoV estão juntos em um mesmo ramo em 100% das 500 réplicas.

Tabela 2: Gama de hospedeiras e sintomatologia do ZiMV

Família Compositae	
<i>Zinnia elegans</i> Jacq. (capitão)	Mosaico sistêmico, mais evidente nas folhas jovens
<i>Helianthus annuus</i> L. (girassol)	Mosaico, necrose e eventual morte da planta
<i>Bidens pilosa</i> L. (picão)	Não apresentou sintoma
<i>Emilia sonchifolia</i> (L.) DC. (emília)	Mosaico sistêmico
<i>Lactuca sativa</i> L. (alface)	Não apresentou sintoma
<i>Cichorium intybus</i> L. (almeirão)	Não apresentou sintoma
Família Chenopodiaceae	
<i>Chenopodium amaranticolor</i> (HJ. Coste & A. Reyn)	Lesão local necrótica
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd	Lesão local clorótica
Família Cruciferae	
<i>Brassica oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i> (couve)	Não apresentou sintoma
Família Cucurbitaceae	
<i>Cucumis sativus</i> L. (pepino)	Não apresentou sintoma
Família Solanaceae	
<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill. (tomate)	Não apresentou sintoma
<i>Petunia hybrida</i> (petúnia)	Não apresentou sintoma
<i>N. tabacum</i> TNN	Lesão local clorótica nas folhas inoculadas
<i>N. rustica</i> L.	Não apresentou sintoma
<i>N. benthamiana</i> Domin.	Não apresentou sintoma
<i>N. glutinosa</i> L.	Não apresentou sintoma
<i>N. occidentalis</i> Wheeler	Mosaico, enrugamento foliar e retardo do crescimento
Família Leguminosae	
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. (feijão)	Não apresentou sintoma
<i>Arachis hypogaea</i> L. (amendoim)	Não apresentou sintoma
Família Amarantaceae	
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Não apresentou sintoma
Família Malvaceae	
<i>Gossypium hirsutum</i> L. (algodão)	Não apresentou sintoma



Tabela 3: Porcentagem de identidade entre o ZiMV e outros *Potyvirus*

Potyvirus	Nº de acesso	Seqüência de aminoácidos	
		"Core" da CP	CP completa
SuCMoV 95	AF255677	95	91
PVY-T	D12570	85	81
PVY-H	M95491	86	81
PVY-Fr	D00441	84	80
PVY-Nus	U09508	86	81
PVY-Eur	X68223	85	81
PVY-N-Rus	X54636	84	80
PVY(Chil.)	X68221	86	81
PVY (0')	X68226	86	80
PVY (0 ₄)	D12539	85	80
PVY (0 ₁)	X14136	86	80
PVY-NsNr	X68224	86	82
PepMoV	M11598	86	81
LMV	Z78228	71	65
BCMV	L11890	63	60
TuMV	AJ000690	67	64
TEV	M15239	62	62
MDMV	AJ001691	63	60
SCMV	X98166	58	62
TVMV	X04083	55	55
PRSV	NC001785	64	61
ZYMV	AJ429071	64	61
WMV-2	L22907	62	60
PWV	U67149	60	57

ZiMV. (A) *Helianthus annuus*, (B) *Eulalia sorghifolia*, (C) *Nicotiana occidentalis*, (D) *Chenopodium quinoa*.

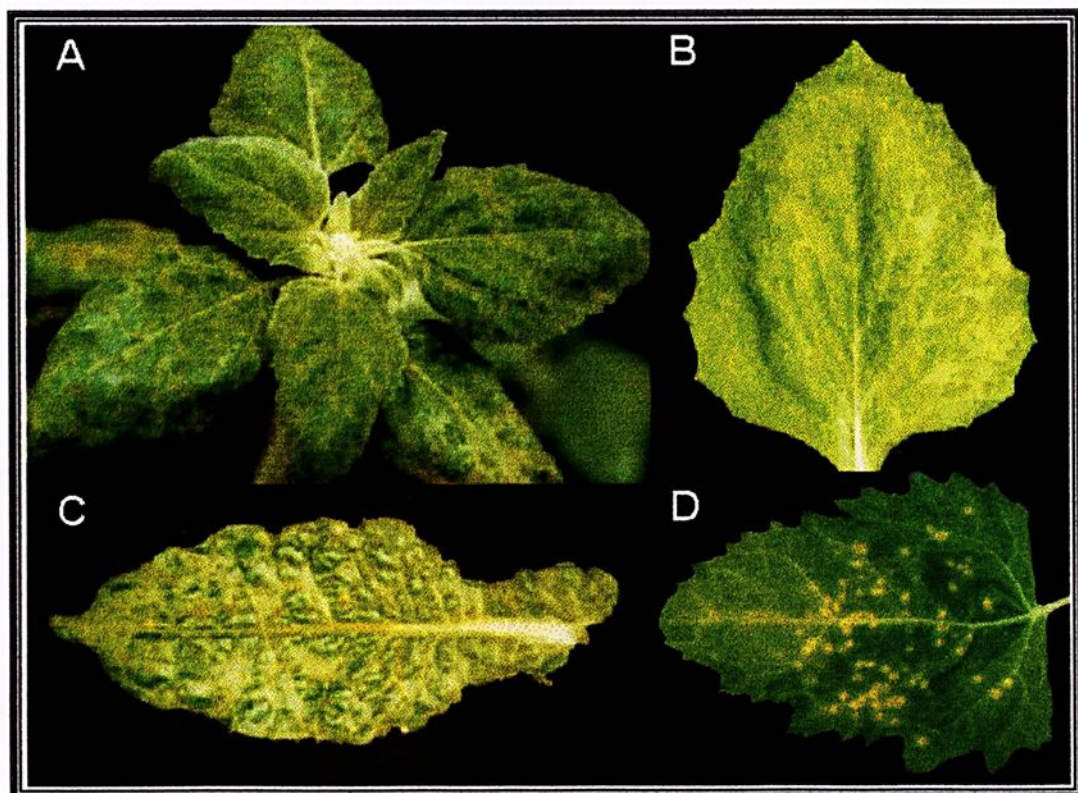


Figura 3: Sintomas apresentados por algumas hospedeiras suscetíveis ao ZiMV. (A) *Helianthus annuus*; (B) *Emília sonchifolia*; (C) *Nicotiana occidentalis*; (D) *Chenopodium. quinoa*.

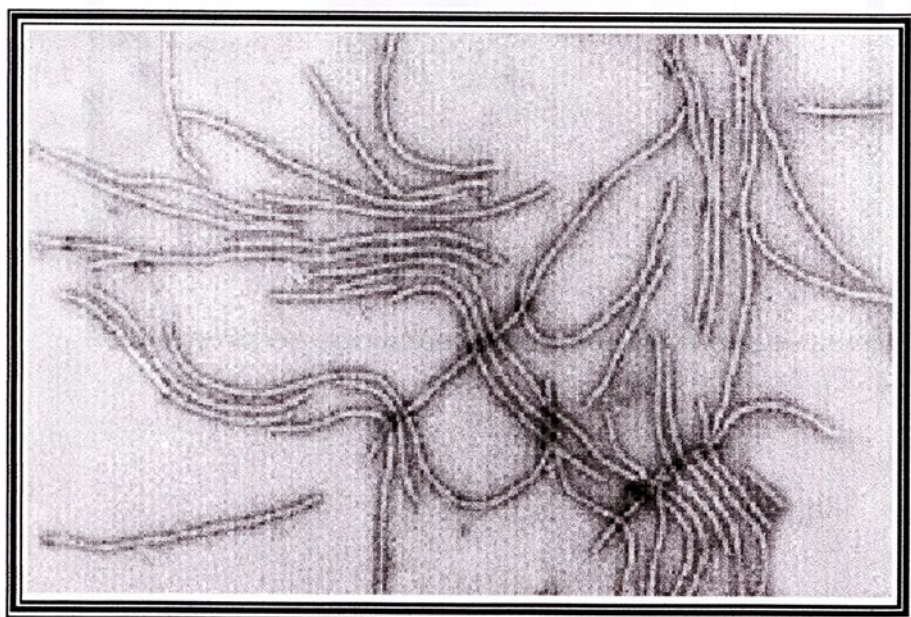


Figura 4: Preparação purificada do ZiMV observada ao microscópio eletrônico de transmissão após contraste negativo. Aumento: 43.120x.

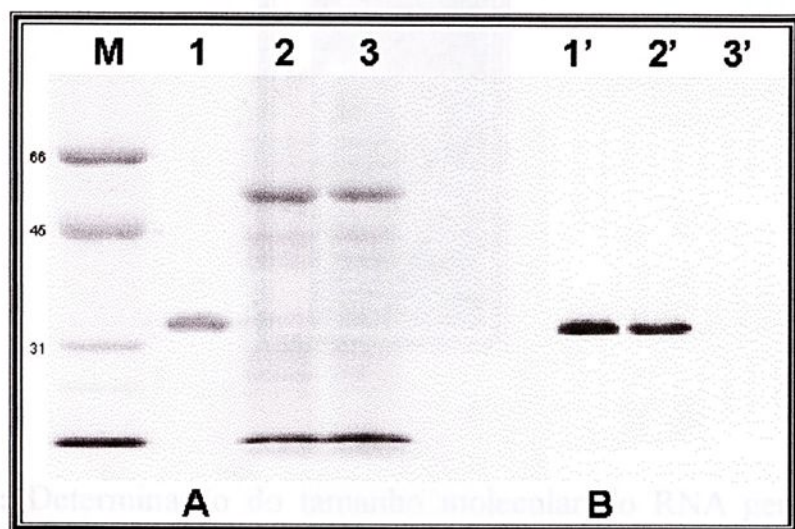


Figura 6: Determinação da identidade molecular do RNA extruído do ZIMV purificado em gel de acetato de amônio. (A) marcador RNA Ladder (Gibco) em Kb (10) RNA extraído de partículas de ZIMV

Figura 5: A: Perfil eletroforético do ZIMV purificado (1), proteínas totais de planta infectada (2) e proteínas totais de planta sadia (3) em gel desnaturante de poliácridamida (SDS-PAGE). B: "Western blot" e reação imunológica com anti-soro para o BiMV, de um gel similar ao A. M: Marcador de peso molecular Low Range (BioRad).

Figura 7: Determinação da especificidade da sonda através de "Dot blot". (1) RNA extraído de partículas purificadas de ZIMV; (2) RNA de Tobacco mosaic virus (TMV); (3) RNA totais extraídos de planta infectada pelo ZIMV; (4) RNA total de plantas sadias.

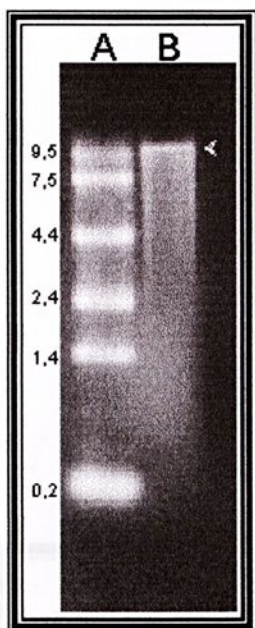


Figura 6: Determinação do tamanho molecular do RNA genômico do ZIMV purificado em gel desnaturante de agarose. (A) marcador RNA Ladder (Gibco) em Kb. (B) RNA extraído de partículas do ZIMV.

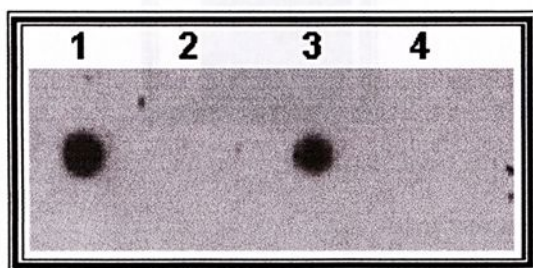


Figura 7: Determinação da especificidade da sonda através de "Dot blot". (1) RNA extraído de partículas purificadas do ZIMV; (2) RNA do *Tobacco mosaic virus* (TMV); (3) RNA totais extraídos de planta infectada pelo ZIMV; (4) RNA totais de plantas sadias.

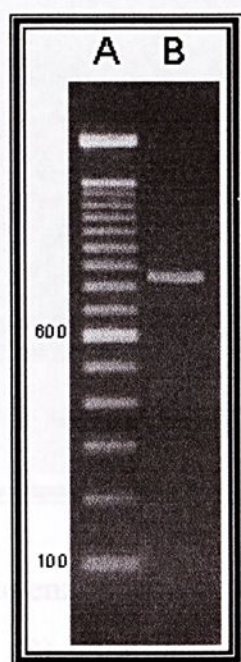


Figura 8: Análise do produto de amplificação por PCR em gel nativo de agarose. (A) marcador molecular DNA 100pb (Gibco). (B) fragmento amplificado de aproximadamente 820 pb.



Figura 10: Sequência correspondente ao gene da proteína capsidial do ZIMV

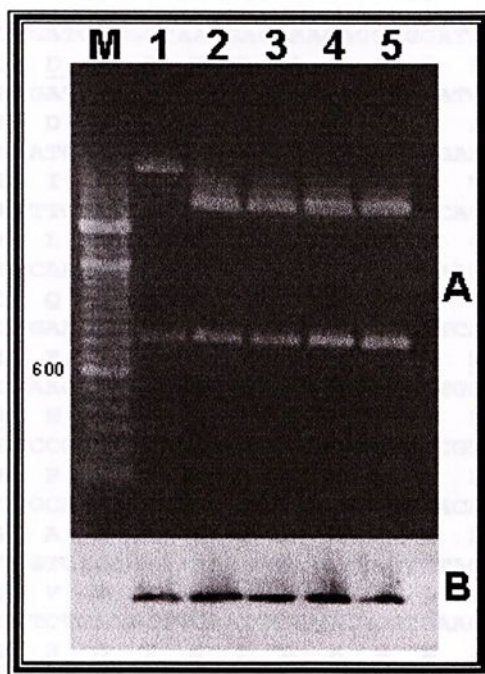
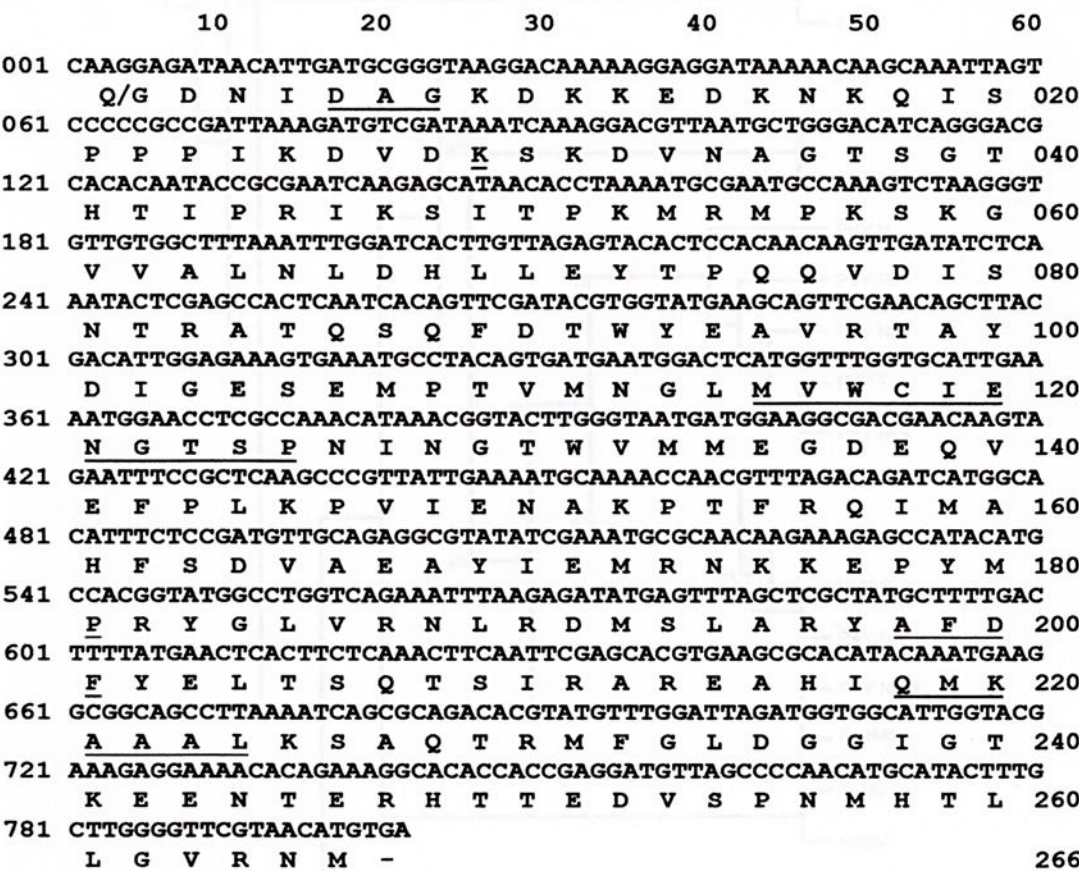


Figura 9: Análise do corte enzimático de DNA de plasmídeo purificado.

(A) gel de agarose 1%. (B) "Southern blot" e hibridização com sonda específica para o ZIMV. M: marcador molecular 100pb (Gibco); 1, 2, 3, 4, 5: DNAs de plasmídeos purificados, respectivamente, à partir dos clones 2, 12, 23, 26 e 40, digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII. Obs.: a diferença no tamanho do plasmídeo do clone 1 se deu devido à utilização do kit "TOPO" para obtenção deste e "SureClone" para obtenção dos demais.

Figura 10: Sequência correspondente ao gene da proteína capsidial do ZimV



Q/G: Sítio de clivagem entre a NIb e CP
Sequências sublinhadas: motivos conservados da CP dos *Potyvirus*
K (posição 32) e P (posição 184): limites do "core" da CP

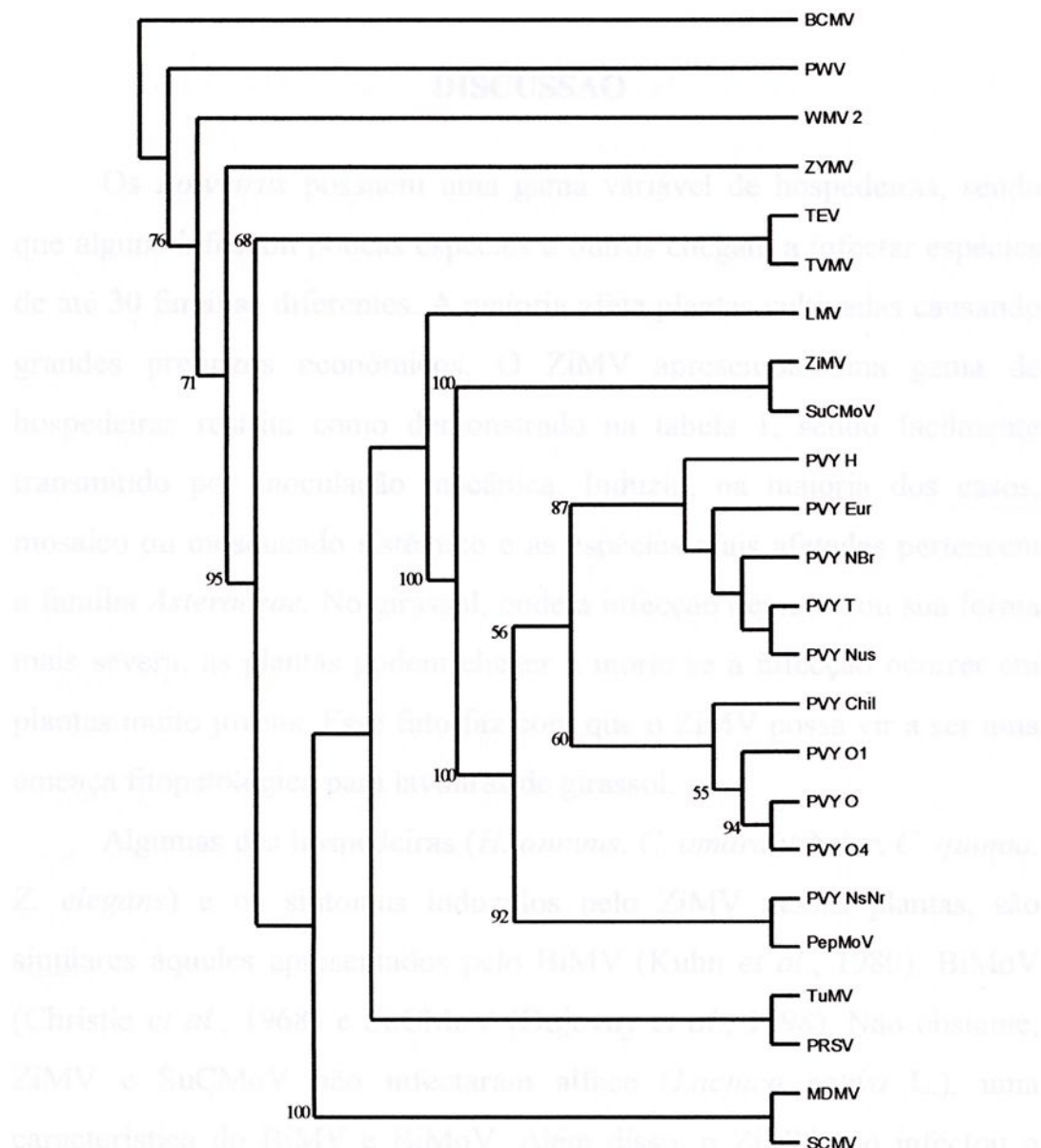


Figura 11: Análise filogenética com base na seqüência completa de aminoácidos da CP do ZIMV e outros potyvirus listados na tabela 3. As porcentagens de "bootstrap" são indicadas nos ramos da árvore (porcentagens menores que 50% não são mostradas).

DISCUSSÃO

Os *Potyvirus* possuem uma gama variável de hospedeiras, sendo que alguns infectam poucas espécies e outros chegam a infectar espécies de até 30 famílias diferentes. A maioria afeta plantas cultivadas causando grandes prejuízos econômicos. O ZiMV apresentou uma gama de hospedeiras restrita como demonstrado na tabela 1, sendo facilmente transmitido por inoculação mecânica. Induziu, na maioria dos casos, mosaico ou mosqueado sistêmico e as espécies mais afetadas pertencem a família *Asteraceae*. No girassol, onde a infecção demonstrou sua forma mais severa, as plantas podem chegar à morte se a infecção ocorrer em plantas muito jovens. Esse fato faz com que o ZiMV possa vir a ser uma ameaça fitopatológica para lavouras de girassol.

Algumas das hospedeiras (*H. annuus*, *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *Z. elegans*) e os sintomas induzidos pelo ZiMV nessas plantas, são similares àqueles apresentados pelo BiMV (Kuhn *et al.*, 1980), BiMoV (Christie *et al.*, 1968) e SuCMoV (Dujovny *et al.*, 1998). Não obstante, ZiMV e SuCMoV não infectaram alface (*Lactuca sativa* L.), uma característica do BiMV e BiMoV. Além disso, o ZiMV não infectou o picão (*Bidens pilosa*), que é hospedeira do BiMV, BiMoV e SuCMoV. Entretanto, essas variações na gama de hospedeiras podem ser causadas por diferenças nas cultivares utilizadas. No geral, o ZiMV se assemelhou mais ao SuCMoV do que ao BiMV e BiMoV.

A metodologia utilizada para purificação do ZiMV a partir de folhas de *Nicotiana occidentalis* infectadas, mostrou-se satisfatória em



relação ao grau de pureza da preparação quando avaliada por eletroforese em gel desnaturante de SDS-PAGE. A concentração do vírus purificado (18mg/Kg de tecido) pôde ser considerada normal, pois segundo Marinho e Kitajima (1989), uma preparação viral purificada é considerada satisfatória para vírus do gênero *Potyvirus* quando a concentração alcança de 15 a 20mg/Kg de tecido. Deve-se levar em conta que, normalmente, há uma grande dificuldade na obtenção de purificações de boa qualidade dos potyvirus, devido a tendência de agregação das partículas e a baixa concentração do vírus nos tecidos das hospedeiras (Delgado-Sanches e Grogan, 1966; Damirdagh e Shepherd, 1970; Langenberg, 1973).

A massa molecular da proteína capsidial (~33 kDa) está entre os valores obtidos para a maioria dos potyvirus (de 28 a 47 kDa) (Allinson *et al.*, 1985; Hollings e Brunt, 1981) e foi similar aos valores encontrados para o SuCMoV (Dujovny *et al.*, 1998) e para o BiMV (Nagata *et al.*, 1995).

Os estudos feitos pela técnica de "Western blot" indicaram que o ZiMV possui relação sorológica com o BiMV. Levando-se em consideração que BiMV, BiMoV e SuCMoV são sorologicamente relacionados (Nagata *et al.*, 1995; Dujovny *et al.*, 1998), pode-se inferir que o ZiMV é também relacionado ao BiMoV e SuCMoV. Entretanto, a utilização da sorologia para determinação do grau de parentesco entre espécies dos potyvirus não tem sido utilizada com sucesso, devido a ocorrência de reações cruzadas entre os vírus e os resultados

inconsistentes na determinação das relações de parentesco (Shukla *et al.*, 1991). Isso tem levado à utilização do critério de identidade de nucleotídeos para a determinação de parentesco entre os potyvirus (Ward *et al.*, 1992).

O RNA extraído do ZiMV teve seu tamanho estimado em 9,7 Kb e está dentro do padrão considerado normal para o gênero *Potyvirus* (9,4 a 10,3 Kb) (Brunt, 1992). Este RNA serviu de molde para produção de uma sonda não radioativa de grande especificidade, a qual foi utilizada com eficiência para diagnosticar a presença do ZiMV em várias hospedeiras (dados não mostrados).

Devido a grande semelhança das características biológicas entre o ZiMV e o SuCMoV isolado de girassol na Argentina, foi utilizada a sequência deste vírus (Dujovny *et al.*, 2000), para o desenho de “primers” que pudessem amplificar o gene da capa proteica do ZiMV. Por RT/PCR e utilizando-se cDNA para o ZiMV, foi amplificado um fragmento de aproximadamente 820 pb, o qual foi clonado e seqüenciado.

A região seqüenciada (822 pb), quando comparada com seqüências depositadas no GenBank, mostrou similaridade com a de outros *Potyvirus*. Nela foram identificados o sítio de clivagem entre as proteínas NIb e CP [glutamina (Q)/glicina (G)] que é comum aos vírus pertencentes a família *Potyviridae* (Van der Vlugt *et al.*, 1993); o motivo DAG (4-aa a partir do sítio de clivagem) que está relacionado à transmissão por afídeos e presente na região N-terminal da CP dos

Potyvirus assim transmitidos (Atreya *et al.*, 1990; 1991; 1995; Gal-On *et al.*, 1992) e as seqüências altamente conservadas na CP dos membros deste gênero: MVWCIENGTSF, AFDF e QMKAAAL localizadas 117, 200 e 220 aminoácidos a partir do sítio de clivagem, respectivamente.

A porcentagem de identidade das seqüências da capa proteica completa e do "core" tem sido utilizada para identificar espécies de *Potyvirus* e traçar relações filogenéticas entre eles (Ward *et al.*, 1992; Shukla *et al.*, 1994). Comparações entre seqüências completas da CP de muitos membros do gênero *Potyvirus* revelaram que potyvirus distintos apresentam de 38 a 71% de homologia e estirpes de um mesmo vírus têm de 90 a 99% (Ward *et al.*, 1992), mas há várias exceções a esta regra (McKern *et al.*, 1991; Tracy *et al.*, 1992; Uyeda, 1992). Alguns trabalhos demonstraram que comparações da seqüência do "core" da CP são mais representativas (Shukla *et al.*, 1991; Ward e Shukla, 1991). Com base nesses critérios, quando a seqüência de aminoácidos do "core" da CP do ZiMV foi alinhada com a seqüência correspondente de outros potyvirus, as porcentagens de identidade variaram de 55% a 95%, sendo que o valor máximo (95%) foi observado na comparação com o SuCMoV, enquanto que as porcentagens obtidas na comparação da CP inteira foram de 55% a 91%.

As maiores variações observadas foram localizadas no N-terminal. Esta região é altamente variável e encontra-se exposta na superfície das partículas dos *Potyvirus*. Nela estão presentes os epitopos vírus-específicos e vários pesquisadores atribuem a variação no tamanho da

proteína capsidial dos potyvirus principalmente às diferenças no comprimento desta região, já que o "core" interno (cerca de 220 aminoácidos) permanece conservado dentro do gênero (Allinson *et al.*, 1985; Doughert *et al.*, 1985; Sherphard *et al.*, 1974; Shukla *et al.*, 1986; Shukla *et al.*, 1988).

O ZiMV apresentou quatro aminoácidos a menos (posições 9 a 12 após o sítio de clivagem entre a CP e a NIb) quando comparado ao SuCMoV, sendo esta a maior diferença observada entre eles.

A análise filogenética, realizada para as seqüências de aminoácidos correspondentes às proteínas capsidiais de alguns potyvirus, agrupou o ZiMV e SuCMoV em um mesmo ramo em 100% das réplicas, confirmando a proximidade entre eles. O agrupamento ZiMV e SuCMoV apresentou-se fortemente relacionado com os isolados do PVY necróticos e comuns. Os demais potyvirus foram agrupados mais distantemente.

Devido à ausência de dados da seqüência de nucleotídeos do BiMV e BiMoV, não foi possível determinar o grau de parentesco entre estas espécies e o ZiMV.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o ZiMV e SuCMoV possuem uma grande homologia no gene da capa proteica que, somadas às semelhanças biológicas em relação a gama de hospedeiras, permitem considerá-los como estirpes do mesmo vírus. Potanto, sugere-se o nome de *Sunflower chlorotic mottle virus* isolado *Zinnia* (SuCMoV-Zi) ao potyvirus relatado pela primeira vez em *Zinnia elegans* no Brasil.



CONCLUSÕES

1. O ZiMV tem uma gama de hospedeiras restrita e a maioria é comum ao BiMV, BiMoV e SuCMoV.
2. O ZiMV é uma ameaça à cultura de girassol.
3. O método de purificação utilizado para o ZiMV permite a obtenção de preparações de bom grau de pureza e concentração satisfatória.
4. A massa molecular da proteína capsial do ZiMV é 33 kDa.
5. O ZiMV é relacionado sorologicamente ao *Bidens mosaic virus*.
6. O gene da proteína capsial do ZiMV é constituído por 798 nucleotídeos e codifica para uma sequência de 266 aminoácidos.
7. A proteína capsial do ZiMV apresenta quatro aminoácidos a menos em relação à do SuCMoV.
8. A porcentagem de identidade da sequência do "core" da proteína capsial entre o ZiMV e o SuCMoV é de 95%.
9. O ZiMV e o SuCMoV são relacionados filogeneticamente e constituem estirpes de um mesmo potyvirus.

O RNA extraído de partículas do ZiMV purificado teve seu tamanho estimado em 9,7 Kb e serviu de molde para produção de uma sonda não radioativa que reconhece especificamente RNAs do ZiMV.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização de um potyvirus isolado de *Zinnia elegans* na região norte do Estado de São Paulo, designado aqui *Zinnia mosaic virus* (ZiMV).

O ZiMV apresentou uma gama de hospedeiras restrita, principalmente membros da família *Asteraceae* e, na maioria dos casos, os sintomas induzidos foram mosaico ou mosqueado sistêmico. Em girassol, o vírus pode levar a planta à morte. A maioria das hospedeiras e os sintomas induzidos foram comuns ao *Bidens mosaic virus* (BiMV), *Bidens mottle virus* (BiMoV) e *Sunflower chlorotic mottle virus* (SuCMoV). O ZiMV foi facilmente transmitido por inoculação mecânica.

O ZiMV purificado a partir de folhas de *Nicotiana occidentalis* infectada forneceu preparações com um bom grau de pureza e concentração satisfatória (18mg/Kg de tecido). Por gel desnaturante (SDS-PAGE), a massa molecular da proteína capsidial foi determinada tendo um valor estimado de 33 kDa. A proteína capsidial do ZiMV reagiu com anti-soro para o BiMV indicando que estes vírus são relacionados.

O RNA extraído de partículas do ZiMV purificado teve seu tamanho estimado em 9,7 Kb e serviu de molde para produção de uma sonda não radioativa que reconhece especificamente RNAs do ZiMV.

Por RT/PCR e utilizando “primers” desenhados a partir da sequência do SuCMoV e cDNA para o ZiMV, um fragmento de aproximadamente 820 pb foi amplificado, clonado e sequenciado. O fragmento, que inclui o gene da proteína capsidial, mostrou a identidade de aminoácidos do “core” da CP variando de 55% (TVMV) a 95% (SuCMoV) e a CP completa de 55% (TVMV) a 91% (SuCMoV). As maiores variações entre as sequências do ZiMV e outros potyvirus foram observadas no N-terminal, que é altamente variável entre espécies deste gênero. Nesta região, o ZiMV tem uma deleção de quatro aminoácidos (posições 9 a 12 após o sítio de clivagem entre a Nib e a CP) quando comparada com a sequência do SuCMoV. A análise filogenética agrupou o ZiMV e SuCMoV em um mesmo ramo em 100% das réplicas, mostrando uma relação de parentesco muito fechada entre estas duas espécies. Não foi possível determinar o grau de parentesco entre o ZiMV e o BiMV e BiMoV, uma vez que não há informações sobre as sequências de nucleotídeos destes vírus.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o ZiMV e o SuCMoV são estirpes do mesmo vírus. Sugere-se o nome de Sunflower chlorotic mottle virus isolado *Zinnia* (SuCMoV-Zi) ao potyvirus encontrado em *Zinnia elegans* no Brasil

SUMMARY

The present work describes the identification and characterization of a potyvirus isolated from *Zinnia elegans* in the northern region of the State of São Paulo, Brazil, here denominated *Zinnia mosaic virus* (ZiMV).

The ZiMV has a restricted host range, mainly members of the *Asteraceae* family and, in most cases, the symptoms induced were systemic mosaic or mottling. In sunflower, the virus may induce plant in to death. Most hosts and symptoms induced by ZiMV were common to those of *Bidens mosaic virus* (BiMV), *Bidens mottle virus* (BiMoV) and *Sunflower chlorotic mottle virus* (SuCMoV). ZiMV was easily transmitted by mechanical inoculation.

The ZiMV was purified from infected *Nicotiana occidentalis* leaves yielding preparations with a good degree of purity and satisfactory virus concentration (18 mg/kg of tissue). By denaturing gel electrophoresis (SDS-PAGE), the molecular mass of the coat protein was determined to have an estimated value of 33 kDa. The ZiMV coat protein reacted with antiserum to BiMV indicating that they are related viruses.

The RNA extracted from ZiMV purified particles had an estimated size of 9.7 Kb and was used in the production of a non-radioactive molecular probe which recognizes specifically ZiMV RNAs.

By RT/PCR and using primers designed from the sequence of the SuCMoV and cDNA for ZiMV, a fragment of about 820 bp was amplified, cloned and sequenced. The fragment, which included the coat



protein gene, displayed amino acids identity in the coat protein core ranging from 55% (TVMV) to 95% (SuCMoV) and in the whole coat protein ranging from 55% (TVMV) to 91% (SuCMoV). The greatest variation between the sequence of ZiMV and other potyvirus was observed in the N-terminal region, which is highly variable among species of this genus. In this region, ZiMV has a deletion of four amino acids (positions 9 to 12 downstream of the cleavage site of the putative NIb protein) when compared with the SuCMoV sequence. The filogenetic analysis grouped the ZiMV and SuCMoV in the same branch in 100% of the replicates, showing a very close relationship between these two species. It was not possible to determine the relationship between ZiMV and BiMV and BiMoV, since there is no information on the nucleotide sequences of these viruses.

The results obtained in the present work demonstrated that ZiMV and SuCMoV are strains of the same virus. The name *Sunflower chlorotic mottle virus* isolate *Zinnia* (SuCMoV-Zi) is suggested to the potyvirus found in *Zinnia elegans* in Brazil.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKI, A. **Qual o tamanho do mercado de flores?** 2001. Disponível em: <<http://www.mercadodasflores.com.br>>. Acesso em: 20 de abril de 2002.

ALBUQUERQUE, F. C.; IKEDA, H.; COSTA, A. S. Ocorrência do vírus do mosaico da melancia em plantações de melão na região de Belém-PA. **XXI Reunião An. Soc. Oleric. do Brasil**. Fortaleza, CE, 1972. (res.).

ALLISON, R. F.; SORENSON, J. C.; KELLY, M. E.; ARMSTRONG, F. B.; DOUGHERTY, W. G. Sequence determination of the capsid protein gene and flanking regions of *Tobacco etch virus*: evidence for synthesis and processing of a polyprotein in potyvirus gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A**, v. 82, p. 3969-3972, 1985.

ATREYA, C. D.; RACCAH, B.; PIRONE, T. P. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. **Virology**, v. 178, p. 161-165, 1990.

ATREYA, P. L.; ATREYA, C. D.; PIRONE, T. P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 7887-7891, 1991.

ATREYA, P. L.; 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. Virol.** v. 76, p. 265-270, 1995.

BARNETT, O. W.; ADAM, G.; BRUNT, A. A.; DIJKSTRA, J.; DOUGHERTY, W. G.; EDWARDSON, J. R.; GOLDBACH, R.; HAMMOND, J.; HILL, J. H.; JORDAN, R. L.; KASHIWAZAKI, S.Ç LOMMEL, S. A.; MAKKOU, K.; MORALES, F. J.; OHKI, S. T.; PURCIFULL, D.; SHIKATA, E.; SHUKLA, D. D.; UYEDA, I. Potyviridae. In: Murphy, F. A. *et al.*, (eds) **Virus Taxonomy**,

Classification and Nomenclature of Viruses, Springer, New York, v. 6, p. 348-358, 1995.

BRADLEY, D. W.; ZAITLIN, M. Replication of Tobacco mosaic virus II. The in vitro sythesis of high molecular weight virus-specific RNAs. **Virology**, v. 45, p. 192-199, 1971.

BRUNT, A. A. The general properties of potyviruses. **In**: Barnett, O. W. (ed.), **Potyvirus Taxonomy**. **Arch. Virol.**, Springer, New York, v. 5, p. 3-16, 1992.

BRUNT, A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.; GIBBS, A.; WATSON, L. **Viruses of Plants: descriptions and Lists from the VIDE database** CAB Interntional, Wallingford., pp.1484, 1996.

CHRISTIE, S. R.; EDWARDSON, J. R.; ZETTLER, F. W. Characterization and electron microscopy of a virus isoled from Bidens and Lepidium. **Plant Dis.**, v. 52, p. 763-768, 1968.

COSTA, A. F.; BRÁS, A. S. K.; CARVALHO, M. G. Transmissão do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (VEFM) por afídeos (Hemiptera-Aphididae). **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 376, 1995. (res.).

COSTA, A. S.; KITAJIMA, W. E. Virus do mosaico do picão ataca o girassol. **O Estado de São Paulo**, São Paulo. Suplemento Agrícola. J. 605, p. 12-13, 1966.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W. Mosaico do amendoim, uma doença de vírus transmitida por semente e por afídeo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 48, 1974. (res.).

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasma do milho em S. Paulo. **Rev. Soc. Bras. Fitopatol.**, v. 4, p. 39-41, 1971.



COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; MIYASAKA, S.; ALMEIDA, L. I. Moléstias do feijoeiro causadas por vírus. **Anais I Simpósio Brasileiro do Feijão**, p. 305-384, 1972.

DAMIRDAGH, I. S.; SHEPHERD, R. J. Purification of the *Tobacco etch* and other viruses of the potato Y group. **Phytopathology**, v. 60, p. 132-142, 1970.

DELGADO-SANCHEZ, S.; GROGAN, R. G. Purification and properties of *Potato virus Y*. **Phytopathology**, v. 56, p. 1397-1404, 1966.

DIETZGEN, R. G.; FRANCKI, R. I. B. Nonspecific binding of immunoglobulins to coat proteins of certain plant viruses in immunoblots and indirect ELISA. **J. Virol. Methods**, v. 15, p. 159-164, 1987.

DOUGHERTY, W. G.; ALLISON, R. F.; PARKS, T. D.; JOHNSTON, R. E.; FEILD, M. J.; ARMSTRONG, F. B. Nucleotide sequence of the 3' terminus of pepper mottle virus genomic RNA: evidence for an alternative mode of potyvirus capsid protein gene organization. **Virology**, v. 146, p. 282-291, 1985.

DUJOVNY, G.; SASAYA, T.; KOGANESAWA, H.; USUGI, T.; SHOHARA, K.; LENARDON, S. L. Molecular characterization of a new potyvirus infecting sunflower. **Arch. Virol.**, v. 145, p. 2249-2258, 2000.

DUJOVNY, G.; USUGI, T.; SHOHARA, K.; LENARDON, S. Characterization of a *Potyvirus* infecting sunflower in Argentina. **Plant Dis.**, v. 82, p. 470-474, 1998.

EDWARDSON, J. R. Some properties of the potato virus Y-group. **Florida Agricul. Exp. Sta. Monograph Series**, v. 4, p. 398, 1974.

EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, R. G.; KO, N. J. Potyvirus cylindrical inclusions. Subdivision-IV. **Phytopathology**, v. 74, p. 1111-1114, 1984.

EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, R. G.; PURCIFULL, D. E.; PETERSEN, M. A. **In:** Matthews, R. E. F. (ed.) **Diagnosis of Plant Virus Diseases. Inclusions in diagnosing plant virus diseases**, CRC Press, p. 101-128, 1993.

GAL-ON, A.; ANTIGNUS, Y.; ROSNER, A.; RACCAH, B. A *Zucchini yellow mosaic virus* coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 2183-2187, 1992.

GEMTCHÚJNICOV, I. D. **Manual de Taxonomia Vegetal: Plantas de interesse econômico**. Ed. Agronômica Ceres São Paulo, p.276, 1976.

GIORIA, R.; BOSQUÊ, G. G.; REZENDE, J. A. M.; AMORIM, L.; KITAJIMA, E. W. Incidências de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista SP e danos causados pelo *Passion fruit woodiness virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 182-189, 2000.

HOLLINGS, M.; BRUNT, A. A. Potyviruses. **In:** Durst, E. (ed.), **Handbook of Plant Virus Infections: Comparative diagnosis**, pp. 731-799, Elsevier, Amsterdam, 1981.

JORDAN, R. L. Potyviruses, monoclonal antibodies and antigenic sites. **In:** Barnett, O. W. (ed.), **Potyvirus Taxonomy**. **Arch. Virol.**, Springer, New York, v. 5, p. 81-95, 1992.

JORDAN, R.; HAMMOND, J. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-virus, subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 25-36, 1991.

KITAJIMA, E. W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. **J. Electron Microsc.** (Japan), v. 14, p. 119-121, 1965.



KITAJIMA, E. W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1911 - 1985). **Fitopatologia Brasileira**, Suplemento especial, 100 pp, 1986.

KITAJIMA, E. W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986 - 1993). **Fitopatologia Brasileira**, Suplemento especial, 92 pp, 1995.

KITAJIMA, E. W.; LIMA, I. M. Infecção natural de zínia pelo vírus do mosaico do picão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16(2), p. 26 (res.), 1991.

KUHN, G. B.; LIN, M. T.; COSTA, C. L. Transmissão, círculo de hospedeiras e sintomatologia do vírus do mosaico do picão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, p. 39-50, 1980.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANGENBERG, W. G. Serology, physical properties, and purification of unaggregated infectious *Maize dwarf mosaic virus*. **Phytopathology**, v. 63, p. 149-154, 1973.

LIMA, J. A. A.; FERNANDES, E. R.; MENDES, M. L. Identificação sorológica de *Watermelon mosaic virus-1* em curcubitáceas cultivadas e nativas no Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, p. 414, 1980. (res.).

LIMA, J. A. A.; OLIVEIRA, F. M. E. S.; KITAJIMA, E. W.; LIMA, M. G. A. Propriedades biológicas, citológicas e sorológicas de um potyvirus isolado de feijão de corda no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 205-216, 1981.

LIMA, J. A. A.; SOUZA, A. E. B. A.; GONÇALVES, M. F. B. Purificação biológica e gama de hospedeiras de dois potyvirus isolados de *Canavalia ensiformes* e *Glycine max*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p. 127, 1990. (res.).



LÓPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. Potyviruses (*Potyviridae*). In: **Encyclopedia of Virology** (2ed) Academic Press, p. 1-11, 1999.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 2ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 452, 1999.

MACKENZIE, D. J.; McLEAN, M. A.; MUKERZI, S.; GREEN, M. Improved RNA extraction for woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Thanscription Polymerase Chain Reaction. **Plant Disease**, v. 81, p.222-226, 1997.

MARINHO, V. L. A.; KITAJIMA, E. W. Um método simplificado de purificação de potyvirus. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p. 91-93, 1989.

MARTELLI, G. P. Plant virus taxa: Properties and epidemiological characteristics. **J. Plant Pathology**, v. 79(3), p. 151-171, 1997.

McKERN, N. M.; EDSKES, H. K.; WARD, C. W.; STRIKE, P. M.; BARNETT, O. W.; SHUKLA, D. D. Coat protein of potyviruses: Amino acid sequence of peanut stripe virus. **Arch Virol.** v. 119, p. 25-35, 1991.

NAGATA, T.; INOUÉ, A. K.; DUSI, A. N.; KITAJIMA, E. W. Bidens mosaic potyvirus newly isolated from pea, its characteristics and serological relationship with other potyviruses. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 473-478, 1995.

OLIVEIRA, V. B.; LIMA, J. A. A.; VALE, C. C.; PAIVA, W. O. Caracterização biológica e sorológica de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 628-636, 2000.

PAPPU, S. S.; BRAND, R.; PAPPU, H. R. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: aplication to *Dasheen mosaic virus*. **J. Virol. Methods**, v. 41, p. 9-20, 1993.



PAVAN, M. A.; CARVALHO, M. G.; FERNANDES, J. J. Distribuição do vírus do mosacio da melancia (*Papaya ringspot virus* - "W") nas principais regiões produtoras de pepino (*Cucumis sativus*) e abobrinha (*Cucurbita pepo*) de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 84-85, 1989.

PIO-RIBEIRO, G.; SANTOS, R. C.; ANDRADE, G. P.; ASSIS FILHO, F. M.; KITAJIMA, E. W.; OLIVEIRA, F. C.; PADOVAN, I. P.; DEMSKI, J. W. Isolamento e erradicação do *Peanut stripe potyvirus* em amendoim (*Arachis hypogaea*) no Estado da Paraíba. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 289-291, 1996.

REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M. I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: Kimati *et al.* (eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**, v. 2, p. 486-496, 1997.

RIECHMANN, J. L.; LAIN, S.; GARCIA, J. A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 1-6, 1992.

SANTOS, F. M. L.; LIMA, J. A. A.; SANTOS, A. A.; BARRETO, P. D. Infecções simples e múltiplas de vírus em caupi no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 518-522, 1999.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v.4, p. 406-425, 1987.

SHEPHERD, R. J.; PURCIFULL, D. E. *Tobacco etch virus*. **Descriptions of Plant Viruses**, n.55, Commonw. Mycol. Inst., Assoc. Applied Biol.; Kew, Surrey, England, 1971.

SHERPHARD, J. F.; SECOR, G. A.; PURCIFULL, D. E. Immunochemical cross reactivity between the dissociated capsid proteins of PVY group of plant viruses. **Virology**, v. 58, p. 464-475, 1974.



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 Plant Pathol.**, v. 13, p. 178-191, 1991.

SHUKLA, D. D.; INGLIS, A. S.; McKERN, N. M.; GOUGH, K. H. Coat protein of potyviruses 2. Amino acid sequence of the coat protein of potato virus Y. **Virology**, v. 152, p. 118-125, 1986.

SHUKLA, D. D.; STRIKE, P. M.; TRACY, S. L.; GOUGH, K. H.; WARD, C. W. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. **J. Gen. Virol.** v. 69, p. 1497-1508, 1988.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The potyviridae**. CAB International, Wallingford, pp. 516, 1994.

STANGARLIN, O. S.; DIAS, P. R. P.; BURIOLLA, J. E.; REZENDE, J. A. M. Incidência de viroses em ensaios de avaliações de genótipos de abóboras e de pepino na região de Dourados/MS. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 34, São Pedro, 2001. Resumos. São Pedro: Fitopatologia Brasileira, v. 26, p. 532, 2001.

SWOFFORD, D. PAUP: Phylogenetic analysis using parcimony. Version 4.0b10. **Smithsonian Institution**, Washington, D.C., 1997.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. **Nucl. Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRACY, S. L.; FRENKEL, M. J.; GOUGH, K. H.; HANNA, P. J.; SHUKLA, D. D. Bean yellow mosaic, clover yellow vein, and pea mosaic are distinct potyviruses: evidence from coat protein gene sequences and molecular hybridization involving the 3' non-coding regions. **Arch. Virol.**, v. 122, p. 249-261, 1992.



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

UYEDA, I. Bean yellow mosaic virus subgroup; search for the group specific sequences in the 3' terminal region of the genome. In: Barnett, O. W. (ed.), **Potyvirus Taxonomy**. Arch. Virol., Springer, New York, v. 5, p.377-385, 1992.

VAN DER VLUGT, R. A. A.; LEUNISSEN, J.; GOLDBACH, R. Taxonomic relationships between distinct potato virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat proteins and 3' nontranslated regions. **Arch Virol.**, v. 131, p. 361-375, 1993.

WARD, C. W.; McKERN, N. M.; FRENKEL, M. J.; SHUKLA, D. D. Sequence data as the major criterion for potyvirus classification. In: Barnett O.W. (ed) **Potyvirus Taxonomy**. Arch Virol Springer, New York, v. 5, pp 283-297 , 1992.

WARD, C. W.; SHUKLA, D. D. Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. **Intervirol**, v. 32, p. 269-296,1991.

YUKI, V. A.; REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W.; BARROSO, P. A. V.; KUNIYUKI, H.; GROppo, G. A.; PAVAN, M. A. Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v. 84, p. 516-520, 2000.

ZERBINI, F. M.; ZAMBOLIM, E. M. Família *Potyviridae* - parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, p. 1-67, 1999.



Eu, Ana Cláudia Maritan, autorizo
a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, ____/____/____.



