

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

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E DESENVOLVIMENTO DE
OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA DETECÇÃO DE
SEQUIVÍRUS INFECTANDO ALFACE**

Eng^a. Agr^a ADRIANA SALOMÃO JADÃO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu,
para a obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração: Proteção de
Plantas.

BOTUCATU-SP
Novembro - 2004

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

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E DESENVOLVIMENTO DE
OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA DETECÇÃO DE
SEQUIVÍRUS INFECTANDO ALFACE**

Eng^a. Agr^a ADRIANA SALOMÃO JADÃO

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan



Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu,
para a obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração: Proteção de
Plantas.

mysi 332482
63953

T
J21c

BOTUCATU-SP
Novembro, 2004



REPRODUÇÃO
AUTORIZADA

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

J21c Jadão, Adriana Salomão, 1976-
Caracterização parcial e desenvolvimento de oligonu-
cleotídeos específicos para detecção de sequivírus infec-
tando alface / Adriana Salomão Jadão. -- Botucatu :
[s.n.], 2004.
x, 126 f. : il. color., tabs.

Tese (doutorado) -- Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas.
Orientador: Marcelo Agenor Pavan.
Inclui bibliografia.

1. Alface. 2. Vírus. 3. Molecular. I. Pavan, Marcelo
Agenor. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de
Ciências Agrônômicas. III. Título.

Palavras-chave: Sequivírus.

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

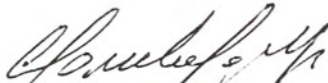
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E DESENVOLVIMENTO DE
OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA DETECÇÃO
DE SEQUIVÍRUS INFECTANDO ALFACE"

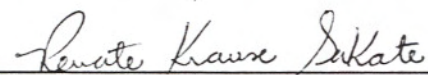
ALUNA: ADRIANA SALOMÃO JADÃO

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

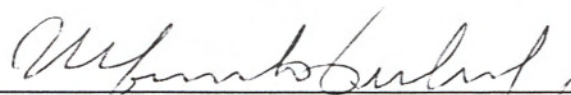
Aprovado pela Comissão Examinadora:



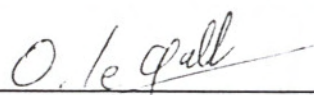
PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN



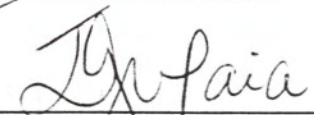
DRA. RENATE KRAUSE SAKATE



PROF. DR. FRANCISCO MURILO ZERBINÍ JUNIOR



DR. OLIVIER LE GALL



PROF. DR. IVAN G. MAIA

DEDICO

À minha MÃE SANDRA,

A MINHA MAIOR *BASE*,

A MINHA MAIOR *FORÇA*,

A MINHA MAIOR *PAZ*,

O MEU MAIOR *EXEMPLO*,

O MEU MAIOR AMOR...

Obrigada á minha irmã Andréia, meu
"irmão" Renato, meu segundo pai José
Wagner e a toda minha família, por
estarem sempre ao meu lado...

AGRADEDECIMENTO ESPECIAL

A Todos do laboratório de Virologia Molecular do
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE-INRA-BORDEAUX-
França, onde passei 14 meses desenvolvendo este trabalho.

A OLIVIER LE GALL pela orientação, pela confiança que depositou em mim, pela preocupação com a minha adaptação e principalmente pela seriedade com que sempre me ajudou a conduzir este trabalho.

A THIERRY CANDRESSE por todo apoio científico ao trabalho, por me ajudar sempre a encontrar as soluções com novas idéias e por tudo que me ensinou sobre caracterização molecular de vírus de plantas.

A Sylvie German-Retana, Frédéric Revers, Valerie Nicaise, Thierry Michon (TIMI), Thomas Guiraud, Geneviève Roudet (Gege), Marie, Jocelyne Walter, Marie-Christine Houvenaghel, Thierry Mauduit, Véronique Decroocq, Ligia Ion-Nagy, Valerie Schurdi-Levraud, Martine Peypelut, Thierry Delaunay;

À Equipe de Etiologia com a qual eu trabalhei: Armelle Marais, Laurence Svanella-Dumas, Marie-Josée Dulucq, Danielle Liberti e Thierry Candresse;

A todos os estudantes de iniciação científica, pós-graduação e de pos-doc, de diferentes partes do mundo, que passaram pelo laboratório neste período;

Aos amigos Valie, Dani, Magali (Maga), Marie-Pierre, Jean Michel e Noelle pelo companheirismo, amizade, carinho e pelas “pizzas” que dividimos nas longas noites de trabalho no laboratório.

Obrigada a todos por terem me recebido tão bem desde o meu primeiro dia no laboratório, pelos “cuidados” que sempre tiveram comigo, pela paciência com este meu francês cheio de sotaque, pelo nosso dia-a-dia, pelo espírito de equipe e por tudo que aprendi com cada um de vocês... Um grande MERCI!

REMERCIEMENT ESPECIAL

Je remercie à tous du laboratoire de Virologie Moléculaire d'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE-INRA-BORDEAUX-France, où j'ai resté pendant 14 mois, pour développer mon travail de tèse.

Je remercie à OLIVIER LE GALL, par l'orientation, par la confiance en moi et en mon travail et par la sérieux, avec laquelle, il m'a aidé toujours à conduire ce travail. Je ne vais pas m'oublier des attentions avec moi, pendant tout le temps de mon adaptation en France.

Je remercie à THIERRY CANDRESSE, pour tout l'appui scientifique au travail, pour m'aider toujours à trouver les solutions avec nouvelles idées et surtout, pour tout qu'il m'a enseigné sur caractérisation moléculaire de virus des plantes.

Je remercie à Sylvie German-Retana, Frédéric Revers, Valerie Nicaise, Thierry Michon (TIMI), Thomas Guiraud, Geneviève Roudet (Gege), Marie, Jocelyne Walter (Joce), Marie-Christine Houvenaghel, Thierry Mauduit, Michel, Véronique Decroocq, Ligia Ion-Nagy, Valerie Schurdi-Levraud, Martine Peypelut, Thierry Delaunay.

Je remercie à équipe d' Etiologie avec laquelle j'ai travaillé: Armelle Marais, Laurence Svanella-Dumas, Marie-Josée Dulucq, Danielle Liberti e Thierry Candresse.

Je remercie aux étudiants d'initiation scientifique, pós-graduation et pós-doc, des différents parties du monde, qu'ont été avec moi dans le labo.

Aux mes amis: Valie, Dani, Magali (Maga), Marie-Pierre, Jean Michel et Noelle... merci beaucoup! Je vais me rappeler toujours de l'amitié, de l'affection, de l'union et aussi de toutes les "pizzas" que on a partagé, pendant le nuits de travail dans le labo...

Merci à tous, par l'accueil, pour les soins que tout le monde a eu avec moi, pour la patience avec mon français plein d'accents...Merci pour le jour à jour avec vous, pour l'esprit d'équipe et pour tout que j'ai appris avec vous...

Un grand MERCI! Je vous embrasse très fort....

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan, pela orientação e confiança que depositou em mim, acreditando sempre que eu pudesse dar “mais um passo”. Com o prof. Marcelo eu aprendi que nós precisamos esperar o tempo de cada pessoa: o tempo de observar, o tempo de errar, o tempo de aprender com os erros e por si só começar a acertar. Ele soube esperar o meu tempo... Quando entrei na sala do prof. Marcelo pela primeira vez para pedir estágio, no terceiro ano da graduação, é impossível de esquecer com que atenção ele me recebeu...Foram tempos bons de iniciação científica...depois o mestrado...Os anos foram passando e hoje quando estou dando “mais um passo”, fico feliz que seja aqui na nossa FCA. Queria muito agradecer a chance que me foi dada, do estágio no INRA-Bordeaux, onde amadureci muito, aprendi demais e que sem dúvida alguma, foi a maior e melhor oportunidade da minha vida. Obrigada por ter acreditado em mim...

À Dra. Renate Krause Sakate, por tudo que tem me ensinado durante este tempo que estamos trabalhando juntas. A Renate está em cada página deste trabalho, em cada detalhe...e acho que ela também sente isto. Agradeço à minha amiga, companheira de todas as horas...é bom demais poder conviver com você...

Ao Prof. Dr. F. Murilo Zerbini, por todo apoio científico e incentivo ao meu trabalho, por toda orientação durante o tempo que estive na França e por me receber, no seu laboratório na UFV, todas as vezes em que precisei “dar um pulinho” até Viçosa...

Ao Prof. Dr. João P. Araújo por toda atenção e ensinamentos durante o início do trabalho e por ceder seu laboratório quando eu estava começando as tentativas de purificação...foi super importante.

Aos Professores do Departamento de Produção Vegetal, em especial ao Prof. Dr. Antônio Carlos Maringoni pelo apoio e incentivo.

À família Biazon, minha família de Botucatu, que esteve presente em todos os momentos, sempre cuidando de mim e fazendo com que eu me sentisse em casa. Viviane e Ricardo obrigada pelo carinho, pela dedicação, pela paciência, pela fidelidade com a nossa amizade. Adoro demais vocês!

Aos amigos de Botucatu: Gabriela, Ana Carolina, Christiane, César, Paulo, Desiré, Denise, Simone, Gustavo, pela amizade, companheirismo, pelas risadas....enfim, pelos ótimos momentos vividos.

Aos amigos de Viçosa: Raquel Mello, Leonardo (Shock), Adriana Moreira, Ana Verônica, Adriana Truta, Renata, Glória, Eduardo (Tutu), Ana Raquel, João, Lili, Re Branco, Carlinha, Rodolfinho, em especial à Dani e Ricardo pela hospedagem e por toda força que sempre me deram. Obrigada a cada um de vocês por terem feito de Viçosa um lugar tão especial pra mim.

À CAPES-COFECUB pela concessão da bolsa de "Doutorado Sanduíche".

À CAPES e CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

SUMARIO

1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	6
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5.1. Localização experimental.....	20
5.2. Obtenção dos isolados virais.....	20
5.3. Multiplicação e manutenção dos isolados virais.....	21
5.4. Teste com gama de hospedeiro.....	21
5.5. Síntese de oligonucleotídeos degenerados para a família <i>Sequiviridae</i> ..	22
5.6. Extração de RNA e RT-PCR.....	22
5.6.1. Extração de RNA total.....	22
5.6.2. Extração de RNA fita dupla, 'Degenerated Oligonucleotide Primer' (DOP-PCR) e RT-PCR.....	25
5.6.2.1. Extração de RNA fita dupla utilizando celulose CF11..	26
5.6.2.2. Extração de RNA fita dupla utilizando micro-celulose MN301.....	27
5.6.2.3. Cinética de extração de dsRNA.....	28
5.6.2.4. Amplificação por PCR Aleatório com 'Degenerated Oligonucleotide Primer'-DOP-PCR.....	30
5.6.2.5. RT-PCR.....	31
5.7. Purificação viral.....	31
5.7.1. Minipurificação viral.....	32
5.7.2. Protocolo de purificação do CMV.....	32
5.7.2.1. Gradiente de cloreto de cézio.....	33
5.7.2.2. Refratometria e Espectrofotometria.....	33
5.7.3. Protocolo de purificação do PYFV.....	33

5.7.3.1. Gradiente de sacarose.....	35
5.7.4. Protocolo de purificação de um isolado de TBRV.....	35
5.7.4.1. Gradiente de sacarose.....	36
5.7.5. Protocolo de purificação do isolado de LeMoV-BR11.....	36
5.7.5.1. Gradiente de sulfato de cézio.....	37
5.7.5.2. Espectrofotometria.....	37
5.7.6. Protocolo de purificação do DaYMV-Ls2.....	37
5.7.6.1. Gradiente de sulfato de cézio.....	38
5.7.6.2. Espectrofotometria.....	38
5.8. Teste de infectividade.....	39
5.9. Microscopia eletrônica.....	39
5.10. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	40
5.11. Gel de poliacrilamida e 'Western Blot'.....	41
5.12. Extração de RNA e RT-PCR.....	42
5.13. Gel de RNA em condições desnaturantes.....	43
5.14. Síntese de oligonucleotídeos degenerados.....	43
5.15. Clonagem e sequenciamento.....	45
5.16. Oligonucleotídeos universais para LeMoV/DaYMV.....	45
5.17. Oligonucleotídeos específicos para diagnose em RT-PCR.....	46
5.18. Teste para presença de cauda poliA.....	47
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÕES.....	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
9. APÊNDICE.....	104
Apêndice 1. Protocolo de extração de RNA total (Bertheau <i>et al.</i> , 1998)....	105
Apêndice 2. Protocolo de extração de RNA fita dupla (dsRNA) utilizando a celulose CF11.....	107
Apêndice 3. Protocolo de extração de RNA fita dupla (dsRNA) utilizando	

a microcelulose MN301.....	110
Apêndice 4. Protocolo de ‘Degenerated Oligonucleotide Primer’-DOP-PCR após extração de dsRNA.....	112
Apêndice 5. Protocolo de purificação do <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) (Lot <i>et al.</i> , 1992).....	114
Apêndice 6. Protocolo de purificação do <i>Tomato black ring nepovirus</i> (TBRV), cedido por Marie-Josée Duluq (INRA-Bordeaux).....	115
Apêndice 7. Protocolo de purificação do <i>Parsnip yellow fleck sequivirus</i> (PYFV) (Hemida & Murant, 1989).....	116
Apêndice 8. Protocolo de purificação do isolado BR11, cedido por Hérve LoT (INRA-Avignon).....	117
Apêndice 9. Protocolo de purificação do <i>Dandelion yellow mosaic sequivirus</i> (DaYMV-Ls2) (Bos <i>et al.</i> , 1983).....	119
Apêndice 10. Protocolo de Minipurificação viral.....	120
Apêndice 11. Protocolo de extração de RNA a partir de soluções virais purificadas.....	121
Apêndice 12. Protocolo para gel de RNA em condições desnaturantes.....	122
Apêndice 13. Protocolo para preparação de gel de poliacrilamida.....	124
Apêndice 14. Protocolo de ‘Western Blot’ utilizando o aparelho ‘Biorad semi-dry transfer’.....	125

1. RESUMO

A família *Sequiviridae* é constituída por dois gêneros: *Waikavirus* e *Sequivirus*. Os vírus apresentam partículas isométricas com aproximadamente 30nm de diâmetro e uma única fita de RNA sentido positivo, sendo que o genoma dos waikavírus é poliadenilado e dos sequivírus não. *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV) foi relatado infectando alface em diferentes países da Europa e classificado no gênero *Sequivirus*, porém dados moleculares não estão disponíveis para este vírus. No Brasil, um vírus isométrico infectando alface foi isolado por Marinho *et al.*, (1982) no Distrito Federal e denominado de Lettuce mottle virus (LeMoV). Um provável isolado deste vírus isométrico foi descrito mais tarde no estado de São Paulo por Stangarlin (1995), sendo encontrado frequentemente em infecções mistas com o *Lettuce mosaic virus* (LMV). Em ensaios de microscopia eletrônica utilizando antissoro policlonal específico para *Dandelion yellow mosaic sequivirus* (DaYMV) e extrato foliar de plantas infectadas pelo LeMoV, foi verificada uma reação sorológica parcial (Chaves, 1999), indicando que o LeMoV possivelmente seria um membro do gênero *Sequivirus*, família *Sequiviridae*. Um protocolo funcional de purificação tanto para o LeMoV como para o DaYMV foi desenvolvido e sequências parciais do genoma de ambos os vírus foram obtidas usando preparações virais purificadas e

oligonucleotídeos degenerados para a família *Sequiviridae*, desenhados a partir do alinhamento de sequências da replicase do *Parsnip yellow fleck sequivirus* (PYFV), *Rice tungro spherical waikavirus* (RTSV) e *Maize chlorotic dwarf waikavirus* (MCDV). Sequências do LeMoV-AF197 e do DaYMV-DSM2 foram analisadas e mostraram uma alta identidade com outros membros da família. Oligonucleotídeos universais que detectam ambos os vírus e oligonucleotídeos específicos para LeMoV e DaYMV foram desenhados e usados em teste de diagnose baseado em RT-PCR. Os oligonucleotídeos específicos amplificaram um fragmento de 300bp para o LeMoV e de 331bp para o DaYMV, sendo altamente específicos e mostrando-se como uma ferramenta de diagnose, uma vez que não existem antissoros de boa qualidade disponíveis para estes vírus.

Isolados de outros prováveis sequivírus provenientes do Brasil (BR11), Chile (Ch36), Holanda (DSM2) e França (2227) foram avaliados neste trabalho. O RNA viral foi extraído de soluções purificadas e utilizado em RT-PCR com oligonucleotídeos universais para a família *Sequiviridae*. Os fragmentos obtidos, de aproximadamente 600bp, foram clonados, sequenciados e analisados. Todos os isolados apresentaram identidade de sequência com vírus da família *Sequiviridae*: 32-38% com os waikavírus MCDV e RTSV e aproximadamente 72% com o sequivírus PYFV. Entre os isolados analisados a identidade foi sempre acima de 80%. Esses resultados são os primeiros dados moleculares disponíveis para o LeMoV e para o DaYMV, sugerindo que o LeMoV-AF197 e os outros isolados analisados pertencem ao gênero *Sequivirus*. A classificação em espécie ainda depende da obtenção de informações mais detalhadas sobre as propriedades biológicas e moleculares desses vírus. O estudo destes possíveis membros da família *Sequiviridae* servirá como base para uma posterior determinação de critérios para classificação taxonômica.

2. SUMMARY

FURTHER CHARACTERIZATION AND DEVELOPMENT OF SPECIFICS PRIMERS FOR DETECTION OF SEQUIVIRUSES INFECTING LETTUCE. Botucatu, 2004. p.126.

Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ADRIANA SALOMÃO JADÃO

Adviser: MARCELO AGENOR PAVAN

The *Sequiviridae* family is constituted by two genus: *Waikavirus* and *Sequivirus*. The virus have approximately 30nm of diameter and a single-stranded of positive sense RNA. The genome of waikavirus is polyadenylated and of sequivirus not. *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV) was reported in different countries of the Europe infecting lettuce and classified in the *Sequivirus* genus however, molecular data are not available for this virus. In the region of Federal District, Brazilian isometric virus infecting lettuce was isolated by Marinho *et. al.*, (1982) and called of Lettuce mottle virus (LeMoV). Probable a strain of this isometric virus was described later in the Sao Paulo state by

Stangarlin (1995), frequently found in mixed infections with the *Lettuce mosaic virus* (LMV). Using specific polyclonal antiserum for *Dandelion yellow mosaic sequivirus* (DaYMV) and foliar extract of plants infected for the LeMoV, a partial serological reaction was verified for this virus (Chaves, 1999), indicating that the LeMoV could be possibly a member of *Sequivirus* genus, *Sequiviridae* family. A functional protocol of purification was developed for LeMoV and DaYMV and partial genome sequences for both virus was obtained using virus purified preparation and degenerated primers for the *Sequiviridae* family. Sequences of the LeMoV-AF197 and the DaYMV-DSM2 were analyzed and showed a high identity with other members of the family. Universal primers that detect both viruses and specific primers for LeMoV and DaYMV were used in diagnostic tests based on RT-PCR. The specific primers amplified one fragment of 300bp for the LeMoV and 331bp for the DaYMV, being highly specific for diagnosis because no antiserum with good properties are available for these viruses.

Different sequivirus proceeding from Brazil (BR11), Chile (Ch36), Holland (DSM2) and France (2227) were also evaluated in this work. The viral RNA was extracted of purified solutions, used in RT-PCR with universal primers for the *Sequiviridae* family. The fragments of approximately 600bp were cloned, sequenced and analyzed. All the isolates showed identity of sequence with virus of the *Sequiviridae* family: 32-38% with the waikavirus MCDV and RTSV and approximately 72% with the sequivirus PYFV. The identity was always higher than 80% among the strains analyzed. These results are the first available molecular data for the LeMoV and the DaYMV, suggesting that LeMoV-AF197 and the other strains analyzed belong to the *Sequivirus* genus. The classification in species still depends on the attainment of detailed information on the biological and molecular

properties of these viruses. The study of these possible members of the *Sequiviridae* family will help on the determination of taxonomic criterion.

Keywords: *Sequiviridae*, molecular characterization, lettuce, virus

3. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L., *Asteraceae*) está entre as hortaliças economicamente mais importantes no Brasil. Esta cultura é infectada por inúmeras doenças, destacando-se as de etiologia viral. No Brasil, *Lettuce mosaic virus* (LMV) é o vírus de maior importância, tendo sido relatado pela primeira vez por Kramer *et al.* (1945). As propriedades biológicas, sorológicas e moleculares do LMV foram determinadas ao longo das últimas três décadas, possibilitando a identificação de regiões do seu genoma implicadas em diversos aspectos da interação vírus-hospedeiro.

Levantamentos realizados no estado de São Paulo por Stangarlin (1995) demonstraram a ocorrência do LMV e de um vírus isométrico ocorrendo em infecções isoladas e mistas em alface. É provável que o mesmo vírus isométrico ou uma estirpe deste vírus tenha sido anteriormente caracterizado por Marinho *et al.* (1982), no Distrito Federal e denominado Lettuce mottle virus (LeMoV). O LeMoV apresenta partículas isométricas com aproximadamente 30 nm de diâmetro, e ocorre em baixas concentrações no extrato foliar. Os sintomas induzidos pelo LeMoV em alface incluem o mosqueado e o mosaico, bastante

semelhantes àqueles induzidos pelo LMV, tornando difícil a distinção desses dois vírus com base somente na sintomatologia (Stangarlin 1997; Stangarlin *et al.*, 2000).

Em ensaios de microscopia eletrônica utilizando antissoro policlonal específico para *Dandelion yellow mosaic sequivirus* (DaYMV) e extrato foliar de plantas infectadas pelo LeMoV, foi verificada uma reação sorológica parcial (Chaves, 1999), indicando que o LeMoV possivelmente seria um membro do gênero *Sequivirus*, família *Sequiviridae*. Informações limitadas a respeito das propriedades biológicas e sorológicas do LeMoV e do DaYMV estão disponíveis, porém nada se sabe a respeito destes vírus à nível molecular. A existência de apenas uma espécie caracterizada neste gênero, o *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV), com sequência nucleotídica disponível, dificulta o posicionamento taxonômico de outros possíveis membros deste gênero. Além disto, nenhum teste para detecção do LeMoV ou do DaYMV foi desenvolvido até o momento, impedindo estudos importantes de incidência no campo e estudos moleculares envolvendo estes vírus. O fato de o LeMoV ser encontrado constantemente em infecção mista com o LMV torna relevante a existência de um método eficiente de detecção do LeMoV, tanto como ferramenta no estudo de uma possível interação LMV/LeMoV, como para se evitar erros de diagnose baseados somente na sintomatologia.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo eficiente para purificação do LeMoV e do DaYMV; o estudo biológico e molecular destes dois vírus; o desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para detecção de ambos os vírus com estabelecimento de um teste de diagnose baseado em RT-PCR (“Reverse Transcription-Polymerase chain reaction”) e a busca de evidências moleculares de que o LeMoV é um

membro da família *Sequiviridae*, gênero *Sequivirus*, provavelmente sendo uma espécie distinta do DaYMV.

4. REVISÃO DE LITERATURA

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence ao gênero *Lactuca*, família *Asteraceae* e economicamente representa um dos mais importantes vegetais consumidos em todo o mundo (FAOSTAT, <http://www.fao.org>). Dependendo das condições ambientais e dos cuidados dispensados à cultura, os vírus podem ser responsáveis por perdas de até 100% em cultivos de alface (Resende & Cupertino, 1995). Mais de 20 vírus podem infectar a cultura da alface (Van Regenmortel, 2000; Blancard *et al.*, 2003), sendo o *Lettuce mosaic virus* (LMV) o vírus mais importante na ausência de medidas de controle. O LMV pertence à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, que compreende vírus com partículas flexuosas e filamentosas e genoma composto por uma única molécula de RNA fita simples, sentido positivo (Dinant & Lot, 1992; Le Gall, 2003). O RNA genômico do LMV possui 10.080 nucleotídeos e é poliadenilado na sua extremidade 3' (Revers *et al.*, 1997). O LMV foi relatado pela primeira vez na Flórida, por Jagger, em 1921. No Brasil o mosaico foi relatado pela primeira vez por Kramer *et al.* (1945). Os sintomas causados pelo LMV variam dependendo do isolado em questão, e incluem mosaico, distorção e redução da área foliar, nanismo, necrose e até mesmo morte da planta (Grogan, 1980; Kiriakopoulou, 1985; Krause *et al.*, 1999). O LMV é transmitido pela semente (Newhall, 1923; Stangarlin, 1997; Jadão *et al.*, 2002) e é

disseminado no campo por várias espécies de afídeos, incluindo *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Acyrtosiphon scariolae* e *Aphis gossypii*, de maneira não circulativa (não-persistente) (Dinant e Lot, 1992).

Através de ensaios de microscopia eletrônica em plantas de alface com sintomas de mosaico, um vírus isométrico foi encontrado no Núcleo Rural de Vargem Bonita, Distrito Federal, apresentando propriedades similares ao LMV, e sendo algumas vezes encontrado em infecção mista com este vírus (Kitajima *et al.*, 1980). Inicialmente foi designado de vírus do mosaico necrótico da alface, mas em função de um melhor estudo de suas propriedades teve a nomenclatura modificada, passando a ser designado de Lettuce mottle virus (LeMoV) (Kitajima *et al.*, 1980).

O isolado de LeMoV encontrado no Núcleo Rural da Vargem Bonita-DF foi caracterizado por Marinho *et al.*, (1982) tendo sido também identificado no Núcleo Rural do Rio Preto-DF, Núcleo Bandeirantes-DF, Estação Biológica da UnB-DF, CEASA-DF, Caxias do Sul-RS, Rio Novo-SC e Campinas-SP.

Este vírus foi transmitido mecanicamente para alface com muita facilidade e transmitido de maneira não circulativa (não persistente) pelo pulgão *Hyperomyzus lactucae*, apresentando as seguintes propriedades físicas ‘in vitro’: Ponto de Inativação Térmica está entre 55 a 60 °C, Longevidade “in vitro” de 24 horas a 4° C ou a temperatura ambiente e Ponto Final de Diluição entre 10^{-2} e 10^{-3} (Marinho *et al.*, 1982). Partículas isométricas de cerca de 30nm de diâmetro, em concentração muito baixa, foram encontradas em preparações de ‘leaf-dip’ de plantas de alface infectadas sistemicamente ou de lesões locais de *Chenopodium quinoa* e zonas ricamente vesiculadas foram notadas no citoplasma de algumas células do parênquima, do mesófilo e dos vasos (Marinho *et al.*, 1982). Dentre os

protocolos testados para purificação deste isolado, ainda que a concentração do vírus tenha sido baixa, o protocolo de Kassanis *et al.*, (1977) empregado na purificação do *Beet cryptic virus* foi utilizado com pequenas modificações (Marinho & Kitajima, 1986). Com relação à gama de hospedeiro, conforme Marinho & Kitajima (1986), foram testadas 19 famílias, compreendendo 94 espécies e cultivares. Apenas 1 espécie de *Amaranthaceae* (*Gomphrena globosa*); 3 de *Chenopodiaceae* (*Chenopodium amaranticolor*; *Chenopodium murali* e *Chenopodium quinoa*) e 2 de *Asteraceae* (*Lactuca sativa* e *Zinnia elegans*) foram suscetíveis a este isolado. No caso de *Zinnia elegans*, o sintoma foi latente, sendo recuperado através da retroinoculação em *Chenopodium quinoa* que reage com lesões locais. Nas tentativas de se determinar o posicionamento taxonômico deste vírus, Marinho *et al.*, (1986) testaram 23 antissoros para vírus isométricos mantidos na soroteca da Universidade de Brasília-UnB, que incluía antissoros para tymovírus, comovírus, ilarvírus, cucumovírus entre outros. Entretanto nenhum dos 23 antissoros testados reagiu sorologicamente em testes de dupla difusão em ágar-gel, com extrato de plantas infectadas pelo LeMoV.

Um vírus isométrico foi encontrado, mais tarde, na região de Campinas-São Paulo por Stangarlin (1995), apresentando partículas isométricas de 30 nm de diâmetro, ocorrendo em baixa concentração na planta e sendo encontrado frequentemente em infecção mista com o LMV. Este vírus isométrico foi separado do LMV por passagens sucessivas em plantas de *Chenopodium quinoa*, através da inoculação mecânica de lesões locais retiradas de plantas com sintoma de mosaico trazidas do campo e analisadas ao microscópio eletrônico (Stangarlin, 1995). Com base nas características morfológicas e biológicas, na baixa concentração do vírus na planta, dificuldade de purificação, além da região em comum onde foram encontrados (Campinas-SP), o vírus isométrico identificado por

Stangarlin (1995) foi designado como sendo um isolado do vírus anteriormente descrito por Marinho & Kitajima (1982), sendo denominado de LeMoV-AF197.

Em ensaios de microscopia eletrônica utilizando antissoro policlonal para *Dandelion yellow mosaic sequivirus* (DaYMV), cedido por L. Bos (Research Institut for Plant Protection, Wageningen-Holanda) e extrato de plantas infectadas pelo LeMoV, foi verificada uma reação sorológica parcial (Chaves, 1999), indicando a possibilidade de que o LeMoV fosse um membro da família *Sequiviridae*, gênero *Sequivirus*.

Os sintomas induzidos pelo LeMoV-AF197 em alface incluem o mosqueado e o mosaico, bastante semelhantes àqueles induzidos pelo LMV e tornando difícil a distinção desses dois vírus com base somente na sintomatologia (Stangarlin, 1997, Stangarlin *et al.*, 2000). Os testes feitos para estudar a transmissão por sementes foram negativos (Chaves, 1999, Jadão *et al.*, 2002) como descrito anteriormente por Marinho & Kitajima (1982). Estudos preliminares dos efeitos da infecção mista entre LeMoV-AF197 e patótipos do LMV em plantas de alface, sugerem que diferente de outras infecções mistas envolvendo potyvírus estudadas até o presente, uma possível interação LMV/LeMoV pode estar envolvendo um decréscimo no acúmulo do potyvírus dependendo do isolado de LMV estudado (Jadão *et al.*, 2004). Antissoros foram produzidos para o LeMoV (Marinho & Kitajima, 1986; Chaves, 1999), porém com baixa eficiência devido à dificuldades no processo de purificação viral.

Diferentes métodos de purificação são conhecidos para vírus isométricos, incluindo os protocolos descritos por Scoot, (1963), Mossop *et al.*, (1976) e Lot *et al.*, (1992) para a purificação do *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV), onde folhas de tabaco infectadas são utilizadas na extração com tampão fosfato 0,1M ou citrato de sódio

0,5M, com pH variando em torno de 6,5-9,0. O clorofórmio é utilizado na etapa de clarificação, seguido pela precipitação com PEG6000, ciclos de centrifugações diferenciais e gradiente de sacarose de 5-25%. O protocolo de purificação do *Tobacco ringspot nepovirus* (TRSV), descrito por Steere (1956) ainda é utilizado, porém com algumas modificações. A substituição mais importante foi a utilização de *n*-butanol para se obter uma concentração final de 8,5%, substituindo a adição de *n*-butanol e clorofórmio (1:1:1) à etapa de extração, já que este processo tornou-se uma desvantagem, pois envolvia volumes muito grandes de solventes orgânicos (Tomlinson *et al.*, 1959). Após clarificação, o vírus poderia ser concentrado por centrifugações diferenciais ou com a utilização de PEG6000. Já a purificação do *Beet cryptic virus* descrita por Kassanis *et al.*, (1977) é realizada na presença de um tampão fosfato 0,5M, pH7,5 na etapa de extração. A clarificação envolve a adição de *n*-butanol e clorofórmio (1:1), seguida por uma série de 3 centrifugações diferenciais. Dentro da família *Sequiviridae*, o *Parsnip yellow fleck sequivirus* (PYFV) foi purificado pelo método descrito por Hemida & Murrant (1989) e o *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV-Ls2) foi purificado com dificuldade pelo método descrito por Bos *et al.*, (1983). Para estes dois vírus, o método de purificação inclui extração em tampão fosfato 0,5-0,6M com pH em torno de 7,0, clarificação com *n*-butanol para uma concentração final de 8,0-8,5%, precipitação com PEG6000 e gradiente de sacarose a 40% no caso do PYFV e centrifugações diferenciais e gradiente de sulfato de cério no caso do DaYMV.

Os métodos de purificação descritos por Steere (1956), Tomlinson (1959), Scoot 1963, Kassanis *et al.*, (1977) e Bos *et al.*, (1983) foram testados em tentativas de purificação do LeMoV (Marinho & Kitajima, 1986; Chaves, 1999), porém com baixa eficiência, principalmente devido à dificuldade em se obter soluções virais purificadas livres

de materiais fibrilares (Marinho & Kitajima, 1986) e à baixa concentração deste vírus na planta.

4.1. A Família *Sequiviridae*

A família *Sequiviridae* é formada por vírus de partículas isométricas, não envelopadas com aproximadamente 30nm de diâmetro, sendo a gama de hospedeiro natural muito restrita para os vírus desta família. O genoma dos vírus da família *Sequiviridae* é constituído por uma única fita de RNA sentido positivo de 9-12Kb. A família é compreendida pelos gêneros *Sequivirus* e *Waikavirus* (Brunt *et al.*, 1996a).

O gênero *Sequivirus* é composto pelo *Parsnip yellows fleck virus* (PYFV) e pelo DaYMV, relatado infectando plantas de alface em diferentes países da Europa, como Inglaterra (Kassanis, 1944; 1947), Holanda (Bos *et al.*, 1983), Alemanha (Vetten *et al.*, 1985) e Polônia (Twardowicz-Jakusz, 1997).

O DaYMV foi descrito pela primeira vez na Inglaterra por Kassanis (1944), infectando plantas de ‘dandelion’ (*Taraxacum officinale*) ou ‘falsa serralha’, como é conhecida. Este vírus foi purificado com dificuldade por Bos *et al.* (1983) e mais recentemente por Twardowicz-Jakusz *et al.* (1996) que testaram diferentes protocolos de purificação já utilizados para vírus isométricos, porém o rendimento em todos os casos foi muito baixo não excedendo 1mg/kg de folhas frescas. Um antissoro policlonal produzido por Bos *et al.* (1983) contra o isolado Ls2 do DaYMV foi eficaz somente utilizando-se um protocolo modificado de ELISA, descrito por Flegg e Clark (1979).

O DaYMV é facilmente transmitido via extrato vegetal tamponado e alguns dos isolados provocam sintomas em cultivares de alface com resistência ao LMV ou à outros patógenos importantes da cultura da alface (Bos *et al.*, 1983). Em alface

os sintomas aparecem 6 dias após a inoculação e variam de cultivar para cultivar, incluindo mosaico, pontos cloróticos locais e clareamento da nervura. Dependendo dos isolados de DaYMV os sintomas podem chegar a causar lesões cloróticas seguidas por necrose do tecido foliar (Bos *et al.*, 1983). O DaYMV é transmitido de maneira não circulativa (não-persistente) pelos afídeos *Aulacorthum solani* (Kassanis, 1947; Twardowicz-Jakusz, *et al.*, 1996) e *Myzus persicae* (Bos *et al.*, 1983) e não sendo transmitido via semente (Bos *et al.*, 1983).

O PYFV, membro tipo do gênero *Sequivirus*, foi descrito pela primeira vez por Murrant e Goold (1968) infectando plantas de *Pastinaca sativa* L. e *Anthriscus sylvestris* na Inglaterra, sendo que estes dois isolados de PYFV foram denominados de P-121 e A-421, respectivamente. Este sequivírus é transmitido com eficiência via extrato vegetal, porém não infecta sistemicamente espécies que não sejam da família *Umbelliferae*. O PYFV necessita do *Anthriscus yellows waikavirus* (AYV) como vírus auxiliar para transmissão de maneira não circulativa (semi-persistente) pelo afídeo *Cavariella aegopodii* (Murrant & Gold, 1968; Elanagar & Murrant, 1976).

Isolados de PYFV foram purificados por Hemida & Murrant (1989). Após gradiente de sacarose a preparação purificada foi separada em duas frações: Um componente T ('Top component') contendo partículas vazias que não continham ácido nucléico e o componente B ('Bottom component') que apresentava partículas cheias contendo um RNA de fita simples (ssRNA), com tamanho estimado em 9,9Kb e sem a presença de uma cauda poliA na extremidade 3'do seu genoma (Hemida & Murrant ,1989).

O genoma completo do isolado P-121 do PYFV foi sequenciado a partir de clones de DNA complementar (cDNA) e por sequenciamento direto do RNA viral. O RNA viral contém uma única fase aberta de leitura (ORF-open reading frame), na orientação

5'-3', que codifica uma poliproteína de 336kDa (Turnbull-Ross *et al.*, 1992). São três as proteínas que formam a capa protéica do PYFV com aproximadamente 22,5, 26 e 31kDa (Hemida e Murant, 1989), sendo que a região que compreende a proteína capsidial de 26kDa apresenta grande similaridade de sequência com a proteína capsidial VP3 dos picornavírus (Turnbull-Ross *et al.*, 1993) (Figura 1a). A comparação da sequência da poliproteína do PYFV com outras sequências de poliproteínas virais revelou similaridade com as prováveis regiões da *NTP-binding* e da *RNA polymerase* do *Cowpea mosaic comovirus*, *Tomato black ring nepovirus* e alguns picornavírus (Turnbull-Ross *et al.*, 1992).

O gênero *Waikavirus* é formado por outros três vírus, *Rice tungro spherical virus* (RTSV), *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) e *Anthriscus yellows virus* (AYV).

No Sul e Sudoeste do continente Asiático, a doença denominada “Rice tungro” causa grandes danos à cultura do arroz (Jones *et al.* 1991). O complexo viral formado pelo RTSV e um vírus de DNA, o *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) são responsáveis por esta doença. Ambos os vírus são transmitidos pela cigarrinha *Nephotettix virescens*, entretanto a transmissão do RTBV pelo vetor depende do waikavírus RTSV, que funciona como um vírus auxiliar na transmissão (Hibino *et al.*, 1978). Foi demonstrado também que a infecção provocada somente pelo RTSV causa sintomas muito amenos e que ambos os vírus são necessários para provocarem sintomas severos em plantas de arroz (Dasgupta *et al.*, 1991). O RTSV possui partículas isométricas de 30-33nm de diâmetro (Galvez, 1984) e seu genoma é formado por um grande ssRNA poliadenilado de aproximadamente 12Kb contendo três proteínas capsidiais, com 25, 26 e 35kDa (Shen *et al.*, 1993). Análises da estrutura primária do genoma do RTSV revelaram a presença de uma grande ORF na orientação 5'-3'

do genoma de RNA capaz de codificar uma poliproteína de 390kDa e dois RNAs subgenômicos também poliadenilados, que foram identificados e provavelmente são codificados por duas pequenas ORFs localizadas próximas à região 3'terminal (Shen *et al*, 1993; Thole & Hull, 1996) (Figura 1b). A organização do genoma do RTSV se assemelha aos dos picornavírus, já que estes inicialmente expressam sua informação genética a partir de uma poliproteína, que é processada por uma ou mais proteases codificadas pelo próprio vírus (Hull, 2001).

No Sudoeste dos Estados Unidos (USA), o MCDV provoca uma doença denominada de “corn stunt” ou “maize chlorotic dwarf ”economicamente muito importante para a cultura do milho e que foi considerada a segunda mais importante doença de cereais neste país (Gingery & Nault, 1990). A transmissão do MCDV ocorre de maneira não circulativa (semi-persistente) pela cigarrinha *Graminella nigrifrons* e o vírus não é transmitido mecanicamente (Gingery, 1976).

O MCDV foi purificado por centrifugação isopícnica em solução de cloreto de cério (Louie *et al.*, 1974; Gingery, 1976), possui partículas isométricas de 30nm de diâmetro (Gingery, 1976) e seu genoma consiste de uma única molécula de RNA sentido positivo de aproximadamente 12Kb (Reddick *et al*, 1997). As três proteínas que compõe o capsídeo viral possuem 24, 25 e 34kDa (Maroon *et al.*, 1989). Análises de sequência do MCDV revelaram que seu genoma é composto por uma grande ORF que codifica uma

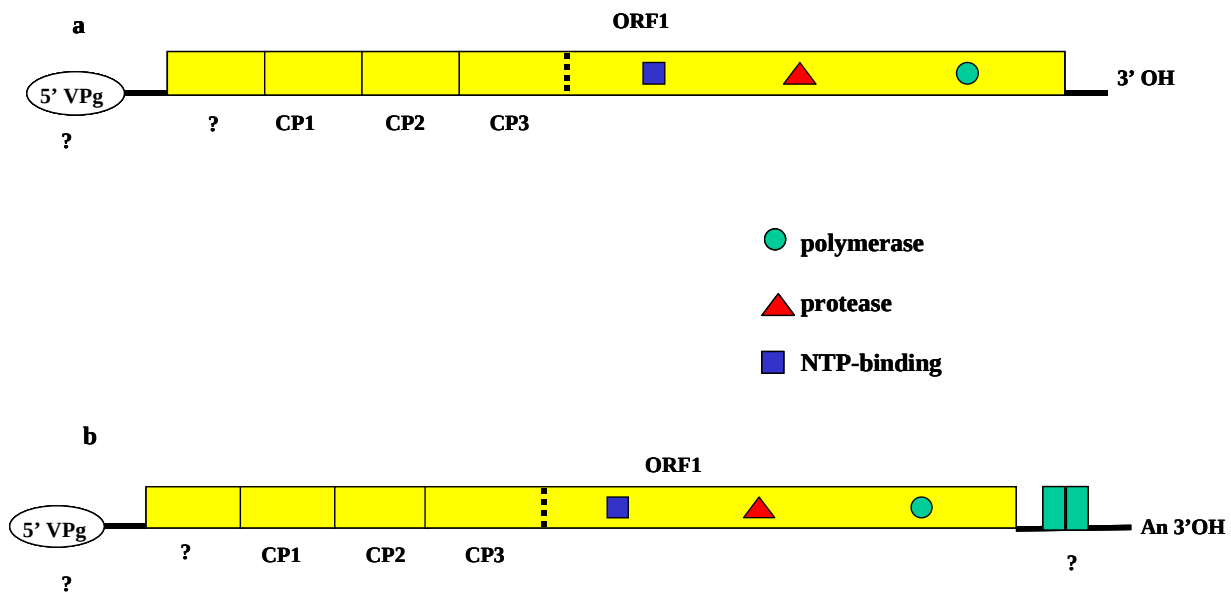


Figura 1: Esquema representativo dos genomas do sequivírus PYFV (1a) (Turnbull-Ross *et al.*, 1992 e 1993) e do waikavírus RTSV (1b) (Shen *et al.*, 1993, Thole & Hull, 1996). Os dois genomas apresentam uma grande ORF que codifica uma poliproteína. No caso do RTSV (1b) existe ainda a presença de mais duas pequenas ORFs próximas à região 3'terminal. A região contendo as três proteínas da capa protéica (CP1,2 e 3), 'putative protease protein' (PRO), os domínios para "putative NTP-binding protein" (NTP) e para 'putative polymerase protein' (POL) estão indicadas na poliproteína do PYFV e do RTSV. As linhas verticais inteiras indicam onde as clivagens são conhecidas que ocorrem na poliproteína e as linhas verticais pontilhadas onde são as prováveis clivagens ocorrem. As estruturas na região 3'terminal são de um "stem-loop" para o PYFV (1a) e de uma cauda polyA para o RTSV (1b). As interrogações indicam prováveis proteínas com funções ainda desconhecidas. Para os dois vírus, a presença de uma estrutura VPg na extremidade 5' ainda não foi confirmada.

poliproteína de 413kda e duas pequenas ORFs localizadas próximas à região 3'terminal do genoma (Reddick *et al*, 1997).

O AYV foi isolado pela primeira vez de *Anthriscus sylvestris*, na Inglaterra (Murant & Gold, 1968). O vírus possui partículas de 29nm de diâmetro e é transmitido pelo afídeo *Cavariella aegopodii* de maneira não circulativa (semi-persistente) servindo como um vírus auxiliar na transmissão do sequivírus PYFV (Murant & Gold, 1968). O AYV foi purificado por Hemida *et al.* (1989) e quatro bandas das prováveis proteínas que formam a capa protéica viral puderam ser visualizadas em gel de poliacrilamida com aproximadamente 35, 28, 24 e 22kDa. Devido ao baixo rendimento da preparação viral purificada do AYV e à sua instabilidade 'in vitro', houve uma grande dificuldade em se obter concentração viral para estudos sorológicos (Hemida *et al.*, 1989). O tamanho do genoma do AYV também foi analisado em gel de RNA em condições desnaturantes e estimado em aproximadamente 10.600 nucleotídeos (Hemida *et al.*, 1989). Dados moleculares não estão disponíveis para o AYV até o momento.

5. Material e Métodos

5.1. Localização experimental

Os trabalhos foram conduzidos na Faculdade de Ciências Agronômicas, Departamento de Produção Vegetal da UNESP, Botucatu e no “Institut National de La Recherche Agronomique”- INRA, Bordeaux-França.

5.2. Obtenção dos isolados virais

O isolado AF-197 de LeMoV foi coletado em campos de produção de alface na região de Campinas-SP e caracterizado por Stangarlin (1995). Plantas de alface apresentando sintomas de mosaico foram coletadas e verificada infecção mista do LMV e LeMoV. O LeMoV foi separado do LMV por passagem de lesões locais isoladas para plantas de *C. quinoa*. Plantas infectadas com o isolado de LeMoV foram periodicamente dessecadas, identificadas e armazenadas no Departamento de Produção Vegetal, UNESP-Botucatu. O isolado DSM2 de DaYMV foi cedido por L. Bos (Wageningen- Holanda). O isolado Ch36 foi coletado em campos de produção de alface, no cinturão verde de Santiago-

Chile e cedido por Olivier Le Gall (INRA-Bordeaux, França). O isolado 2227 e o RNA do isolado BR11 (precipitado em etanol) foram cedidos por Hérve Lot (INRA-Avignon, França).

5.3. Multiplicação e manutenção dos isolados virais

Os isolados de LeMoV e DaYMV foram inoculados em diferentes espécies para escolha da melhor planta a ser utilizada na etapa de purificação viral e para uma comparação biológica entre os dois vírus. Plantas de *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana benthamiana* e alface cv. ‘Trocadero’ (suscetível para os dois vírus) foram inoculadas mecanicamente via extrato vegetal tamponado, utilizando tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 8,0 e analisadas até o 25º dia após a inoculação.

Os isolados de LeMoV, DaYMV, e os isolados 2227 e Ch36 foram mantidos ‘in vivo’ em casa de vegetação, em plantas de *C. quinoa* e alface cv. ‘Trocadero’ inoculadas mecanicamente. Periodicamente, folhas destas plantas infectadas foram coletadas, dessecadas utilizando-se cloreto de cálcio, identificadas e armazenadas a 4°C.

5.4. Teste com gama de hospedeiro

A determinação da gama de hospedeiro do LeMoV foi realizada inoculando-se plantas de diferentes espécies com tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 8,0. As plantas foram avaliadas até o 20º dia após a inoculação e a recuperação dos sintomas foi realizada em plantas de *C. quinoa* aproximadamente 14 dias após a inoculação.

5.5. Síntese de oligonucleotídeos degenerados para a família *Sequiviridae*

Oligonucleotídeos degenerados foram desenhados baseados nas sequências dos genomas completos dos membros da família *Sequiviridae*: *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV, NC_003628), *Rice tungro spherical virus* (RTSV, NC_001632) e *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV, NC_003626). Os oligonucleotídeos degenerados Seq1s, Seq2s, Seq3aS e Seq4aS (Tabela 1, Figura 2) foram obtidos na possível região codificadora para a replicase viral do genoma dos membros da família *Sequiviridae*, sendo que o oligonucleotídeo Seq4 contém motivo típico de RNA polimerase (GDD) na sua sequência deduzida de aminoácidos.

5.6. Extração de RNA e RT-PCR

5.6.1. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de acordo com o método de Bertheau *et al.* (1998). Folhas de plantas de *C. quinoa* foram maceradas (1:5 p/v) em tampão PBS-Tween contendo PVP K25 a 2 % (p/v) e Na-DIECA 20mM e centrifugadas em tubos de microcentrífuga por 10 minutos a 13.000 rpm. Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se SDS a 1 %. Após incubação a 55°C por 15 minutos, adicionaram-se 100 µl de solução de acetato de potássio a 3M e agitou-se bem a solução. Seguiu-se incubação em gelo por 5 minutos e centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 700µl de NaI 6 M e 5µl de uma solução contendo silício, previamente agitada para que o silício fosse ressuspensionado. Agitou-se bem e manteve-se a solução por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada por 1 minuto a 5.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o ‘pellet’

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Nome	Sequencia ¹	Posição	Polaridade ²
Oligonucleotídeos degenerados para família <i>Sequiviridae</i>			
Seq1	TGGACAARATNTAYGARAARCC	7609	S
Seq2S	CNTCNGGITTYSIATGAC	8015	S
Seq2aS	GTCATIGSRAAICCNGANG	8033	aS
Seq3	AANGARTTRAANATIACIGTCTA	8044	aS
Seq4S	TAYGGIGAYGAYAAYATNGT	8163	S
Seq4aS	ACNATRTRTCTCICCRTA	8182	aS
Seq5	GAYTWYKCMIAITTTGAYGG	7842	S
Seq6	TKGAGTGYCYMAARGATG	7597	S
Seq7	GTTGKIATYAAYGGSATIG	7368	S
Seq8	TSMWSAIIYIGTGTGTGGG	6782	S
Seq9	ATCCARTIMAIYGYTCCTC	8422	aS
capDL1	TMGCAWYKARWGTMRRC	1564	S
capDL2	TYAGCYTCATKAAACGCC	1750	aS
Oligonucleotídeos específicos para LeMoV			
Lmo3	ACATGAGCACTAGTGAGG	7422	S
Lmo4	AGATAGAGCCGTCTGGCG	7722	aS
Oligonucleotídeos específicos para DaYMV			
Dan1	AATGGCTATCTCTTGGCC	7794	S
Dan2	TGTTGTATGTCCACTCTGCC	8125	aS
Oligonucleotídeos universais para LeMoV/DaYMV			
DALE1	GARTTCAACATGCACGCCAG	7697	S
DALE2	TTTTTCTCCCATYCGTCAT	8300	aS

1: N: A/G/C/T; R: A/G ; Y: C/T; W: A/T ; S: C/G; K: G/T ; M: C/A ; I: Inosina. 2: S: senso; aS: anti-senso.

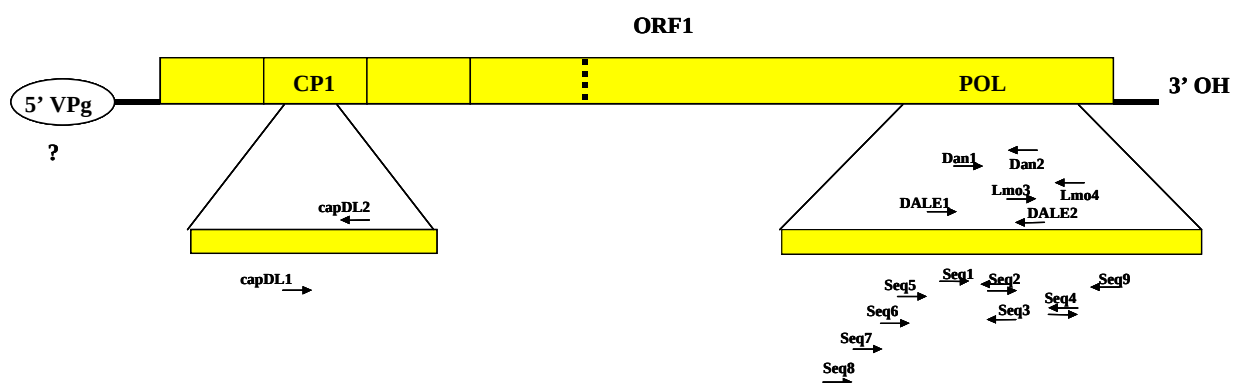


Figura 2: Esquema representativo do genoma do PYFV. Em evidência a região da polimerase viral e da capa protéica (CP1), mostrando a localização dos oligonucleotídeos degenerados para família *Sequiviridae* (Seq1, Seq2, Seq3, Seq4, Seq5, Seq6, Seq7, Seq8, Seq9, capDL1 e capDL2); universais para LeMoV e DaYMV (DALE1/DALE2) e específicos para LeMoV (Lmo3/Lmo4) e DaYMV (Dan1/pDan2). As setas indicam as respectivas orientações dos oligonucleotídeos.

lavado duas vezes com 500µl de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100mM e igual volume de etanol absoluto. Após centrifugação por 1 minuto a 5.000 rpm, o 'pellet' foi seco a vácuo e o RNA ressuscitado em 400µl de água Milli-Q tratada com DEPC (diethylpirocarbonato), seguido de incubação por 5 minutos a 55°C e centrifugação por 5 minutos a 13.000rpm. O sobrenadante (300 µl) foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C.

Utilizou-se uma alíquota de 5µl para a RT-PCR. As combinações de oligonucleotídeos degenerados Seq1s/Seq3aS que amplificam um fragmento de 435bp, Seq1s/Seq4aS que amplificam 554bp e Seq2s/Seq4aS que amplificam 127bp foram testadas para os isolados de LeMoV e DaYMV. A RT-PCR foi realizada em um volume de 40µl contendo 4µl de tampão Euróbio 10x, 4µl de Triton X-100 a 0,2% (v/v), 3,2µl de MgCl₂ 50mM, 0,32µl da mistura de nucleotídeos (dNTPs 25mM), 0,4 µl de cada oligonucleotídeo a 100µM, 0,75 unidades da enzima transcriptase reversa do *Avian myeloblastosis virus* (AMV, AmershamPharmacia) e 0,4 unidades de *Taq* DNA polimerase (Eurobio). A reação constituiu de 30 minutos a 42°C para a etapa de transcrição reversa seguida de 3 minutos a 95°C para inativação da transcriptase reversa e 45 ciclos de desnaturação por 30 segundos/95°C, anelamento por 30 segundos a um gradiente de temperatura variando de 40 a 60°C e extensão por 40 segundos /72°C. Foram retirados 10µl da reação para análise em gel de agarose a 1,0 %.

5.6.2. Extração do RNA fita dupla, 'Degenerated Oligonucleotide Primer' (DOP-PCR) e RT-PCR

O RNA fita dupla (dsRNA) ou forma replicativa viral (RF) foi extraído utilizando dois protocolos distintos de extração a partir do tecido foliar: um primeiro

utilizando a celulose CF11 para fixação do RNA de fita dupla e um segundo utilizando a microgranular celulose MN301.

5.6.2.1. Extração de RNA de fita dupla utilizando celulose CF11

Cinco gramas de folhas de *C. quinoa* sadias e infectadas pelo LeMoV e pelo DaYMV foram utilizadas na extração, 10 dias após a inoculação. Folhas de *Nicotiana xanthi* sadias e infectadas pelo *Cucumber mosaic virus*-CMV (isolado cedido por Olivier Le Gall – INRA-Bordeaux, França) foram utilizadas como controle da extração. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e ao macerado foi adicionado imediatamente 10ml de STE 2x (10ml para cada 5 gramas de folhas frescas), 0,7ml de SDS 20% e 200µl de bentonita a 40mg/ml. Após misturar bem, o extrato foi transferido para tubos de centrifugação (25 a 30ml) e adicionado 14,25ml de Fenol-Tris. Os tubos foram agitados por 30 minutos e centrifugados a 10.000g durante 20 minutos. A fase aquosa foi recuperada, transferida para novos tubos e equilibrada com STE 1x. Etanol a 95% foi acrescentado para se atingir uma concentração final de 16,5% de etanol e os tubos foram deixados em espera no gelo. O conteúdo dos tubos foi passado para tubos ‘Falcon’ preparados anteriormente com a celulose CF11 (Whatman), agitados e centrifugados a 3000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a celulose lavada com 25ml de STE 1% + 16,5% de etanol, agitando-se 5 minutos e centrifugando-se a 3000g durante 10 minutos. Este procedimento de lavagem foi repetido mais duas vezes. Todo o sobrenadante foi eliminado e o ‘pellet’ ressuspendido em 5ml de STE 1x, agitado 5 minutos e centrifugado a 3000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o ‘pellet’ novamente ressuspendido e centrifugado como na etapa anterior. O sobrenadante foi recolhido no mesmo tubo e centrifugado a 10.000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado em tubos ‘Corex’ e mensurado. A precipitação dos ácidos

nucléicos foi realizada acrescentando ao sobrenadante, acetato de sódio 3M pH 5,2, isopropanol e deixada a -20° C durante uma noite. Para o tratamento enzimático dos ácidos nucléicos foi realizada uma centrifugação a 10.000g durante 30 minutos, ressuspensão do 'pellet' em 300µl de água depc, precipitação de ácidos nucléicos utilizando acetato de sódio 3M pH5,2 e isopropanol durante 2hs a -80°C e centrifugação a 13.000g durante 30 minutos. O 'pellet' foi ressuspensionado em 15µl de água tratada com DEPC e realizados tratamentos com *DNAse* 60 minutos a 37°C, *RNAse* 2x SSC (solução salina) 30 minutos a 37°C e *Proteinase K* (1mg/ml) durante 60 minutos a 37°C. Os produtos das reações enzimáticas foram observados em gel de agarose 0,8%, corado com 'sybergreen' (5µl/50ml).

5.6.2.2. Extração de RNA fita dupla utilizando microgranular celulose MN301

Para extração do RNA fita dupla, 4 gramas de folhas de *C. quinoa* sadias e infectadas pelo LeMoV e pelo DaYMV e folhas de *Nicotiana xanthi* sadias e infectadas pelo CMV (utilizadas como controle da extração) foram maceradas em nitrogênio líquido, sendo que as folhas das plantas infectadas foram coletadas 10 dias após a inoculação. Foi adicionado ao macerado, 4 volumes de STE 1x (p/v), contendo 1% de SDS e 1% de 2-βmercapto etanol e deixado 30 minutos à temperatura ambiente. Após o repouso foi adicionado 0,5 volume de fenol/clorofórmio (1:1) e realizada uma emulsificação durante 30 minutos antes da centrifugação a 10.000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e os ácidos nucléicos precipitados em isopropanol durante uma noite a -20°C. Após precipitação foi realizada centrifugação a 10.000g durante 30 minutos e o 'pellet' foi ressuspensionado em 1,3x STE e centrifugado a 10.000g durante 20 minutos. Foi adicionada a micro-celulose MN301 ao sobrenadante na proporção de 10mg/3gramas de folhas e a solução deixada em

agitação lenta durante 30 minutos. Etanol a 20% foi adicionado lentamente deixando-se novamente a solução em agitação lenta durante 30 minutos. Após agitação foi realizada centrifugação a 10.000g durante 3 minutos e o ‘pellet’ coletado e lavado 5x com STE 1x + 16,5% etanol. O ‘pellet’ foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 200µl de STE 1x. A precipitação dos ácidos nucleicos foi realizada em acetato de sódio 3M pH 5,2, isopropanol e deixada durante uma noite a -20°C. Foi realizada centrifugação a 13.000g durante 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o ‘pellet’ foi seco e ressuspendido em 15µl de água DEPC. Os tratamentos enzimáticos foram realizados com *DNAse* 60 minutos a 37°C, *RNAse* 2x SSC (solução salina) 30 minutos a 37°C e *Proteinase K* (1mg/ml) durante 60 minutos a 37°C. O produto das reações enzimáticas foi observado em gel de agarose 0,8%, corado com ‘sybergreen’ (5µl/50ml).

5.6.2.3. Cinética da extração de dsRNA

A cinética da extração de RNA fita dupla foi realizada utilizando-se 500mg de folhas de *C. quinoa* coletadas 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inoculação com os isolados de LeMoV e DaYMV e armazenadas a -80°C. Para a extração foi utilizado um protocolo de ‘mini-extração’ de RNA fita dupla que consistiu em macerar em microtubos as 500mg de folhas infectadas, em 850µl de tampão STE 1x, 150µl de SDS a 20% e 100µl de bentonita. O extrato foi colocado em microtubos de 2 ml e centrifugado 5 minutos a 12.000g/4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido, ajustado para se obter uma solução a 15% de etanol e 20mg de celulose CF11 foram adicionados. Foi realizada uma agitação lenta/manual durante 10 minutos e centrifugação a 12.000g/4°C durante 2 minutos. O ‘pellet’ de celulose foi recolhido e lavado em 1ml de STE 1x contendo 15% de etanol. Esta

Comentário: Se em outro lugar voce escreveu eppendorff, substitua por microtubos

lavagem foi repetida 3 vezes, até que o STE utilizado na lavagem ficasse incolor. O 'pellet' foi ressuscitado em 400µl de água tratada com DEPC, agitado manualmente durante 5 minutos e a solução centrifugada 2 minutos a 12.000g/4°C. O sobrenadante foi coletado e guardado. Foi adicionado ao tubo com o 'pellet' de celulose, 400µl de água tratada com DEPC, agitação manual durante 5 minutos e uma centrifugação de 2 minutos a 12.000g/4°C. O sobrenadante foi coletado no mesmo tubo do sobrenadante coletado anteriormente.

A precipitação dos ácidos nucléicos foi realizada acrescentando-se ao sobrenadante 0,6 volumes de isopropanol e 1/10 de volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2. A solução de precipitação foi deixada uma noite a -20°C, centrifugada 30 minutos a 12.000g/4°C e o sobrenadante foi descartado. O 'pellet' foi seco em 'speed vac' durante 20 minutos e ressuscitado em 15µl de água tratada com DEPC.

O tratamento enzimático foi realizado com *DNAse* 60 minutos a 37°C, *RNAse* (2x SSC) 30 minutos a 37°C e *Proteínase K* (1mg/ml), 60 minutos a 37°C.

Uma extração fenol-clorofórmio foi realizada acrescentando-se o mesmo volume de fenol-clorofórmio à solução tratada, seguida por uma centrifugação de 15 minutos a 10.000g/4°C. O sobrenadante foi coletado e uma nova precipitação de ácidos nucléicos foi realizada como citado anteriormente. Os produtos foram observados antes e após o tratamento enzimático, em gel de agarose 0,8%, corado com 'sybergreen' (5µl/50ml).

5.6.2.4. Amplificação por PCR aleatório com ‘Degenerated Oligonucleotide Primer’-DOP-PCR

Para a reação de DOP-PCR após a extração dos RNAs de fita dupla, foi realizada uma etapa de transcrição reversa e outra de PCR. Em uma primeira etapa, 3µl de RNA foram submetidos à uma desnaturação química utilizando-se 1,2µl de metilmercurato 0,1M, 10 minutos à temperatura ambiente e 0,3 µl de 2-βmercapto etanol 0,1M, 10 minutos à temperatura ambiente. Para síntese de DNA complementar (cDNA) foi adicionado ao RNA desnaturado, 0,2µl de oligoT₁₂₋₁₈ (pd(T)12-18-Invitrogen) a 100µM, 0,5µl de um ‘random primer’ (pd(N)6-Invitrogen) a 100µM, 4µl de tampão da enzima *MMLV* (“Superscript II”, Invitrogen), 2µl de DTT 0,1M, 0,4µl de dNTPs 25mM, 7,9µl de água Milli-Q e a reação foi submetida a 25°C durante 10 minutos. Imediatamente após, adicionou-se à reação, 2µl da enzima *MMLV* ‘Superscript II’ (Invitrogen) sendo a reação submetida à um ciclo de 10 minutos/37°C, 50 minutos /42°C, 15 minutos /72°C e o cDNA armazenado a -20°C.

Para a reação de PCR utilizou-se 5µl de cDNA, 5µl de tampão Euróbio 10x, 1,5µl de MgCL₂ 50mM, 0,5µl de dNTPs 25mM, 1µl do oligonucleotídeo DOP5 (5’-CCGACTCGAGNNNNNNTGTGG-3’) ou DOP6 (5’-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3’), os dois a 100µM e contendo um sítio *Hho*1 indicado em suas sequências. O programa montado para DOP-PCR consistiu de 95°C durante 5 minutos, 5 ciclos de 94°C/1minuto, 27°C/1minuto e “ramping” de 27°C a 72°C/3minutos, 50 ciclos de 94°C/1minuto, 62°C/1minuto e 72°C/2minutos, 72°C durante 10 minutos para terminar a extensão. Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1%.

5.6.2.5. RT-PCR

Para a reação de RT-PCR as combinações de oligonucleotídeos degenerados Seq1s/Seq3aS (435bp), Seq1/Seq4aS (554bp) e Seq2s/Seq4aS (127bp) foram testadas tanto para o LeMoV como para o DaYMV. A RT-PCR foi realizada em um volume total de 40 µl, contendo 3µl de dsRNA submetidos à desnaturação química (1,2µl de metil mercurato 0,1M/ 10minutos/temperatura ambiente e 0,3µl de 2-βmercapto etanol 0,1M 10 minutos/ temperatura ambiente), 4µl de tampão Euróbio 10x, 4µl de Triton X-100 a 0,2% (v/v), 3,2µl de MgCl₂ 50mM, 0,32µl da mistura de nucleotídeos (dNTPs 25mM), 0,4 µl de cada oligonucleotídeo a 100µM, 0,75 unidades da enzima AMV e 0,4 unidades de *Taq* DNA Polimerase. O ciclo utilizado foi de 45 minutos a 42°C seguidos de 3 minutos a 95°C e 45 ciclos de 30 segundos/95°C, 30 segundos a um gradiente de temperatura variando de 40 a 60°C e extensão por 40 segundos/72°C. Foram retirados 7 µl da reação para análise em gel de agarose a (1,0 %).

5.7.Purificação viral

Nas tentativas para se obter um método eficiente de purificação para o LeMoV e o DaYMV, seguiram-se procedimentos empregados para vírus isométricos com algumas modificações: Lot *et al.*, 1992; Murant & Gold, 1968; protocolo de purificação de um isolado de *Tomato black ring virus* (TBRV) cedido por Marie-Josée Dulucq (INRA-Bordeaux); protocolo de purificação do isolado BR11 cedido por Hérve Lot (INRA,Avignon); Bos *et al.*, 1983 e um protocolo de mini-purificação viral.

5.7.1 Mini-purificação viral

Para realização da mini-purificação viral, 2g de folhas de *C. quinoa* infectadas pelo LeMoV ou pelo DaYMV, 18 dias após a inoculação, foram macerados em 15ml de tampão citrato de amônia 0,1M, pH 6,5, 150µl de uma solução de iodoacetamida 0,25M e 150µl de uma solução de NaDieca 1,0M. O extrato foi filtrado em tubo 'Corex' usando gaze e centrifugado 10 minutos a 10.000g. Ao sobrenadante recolhido em novos tubos 'Corex', foi adicionado 1ml de Triton X-100 e realizada agitação utilizando-se vortex. Quando a solução estava completamente dissolvida foi adicionada lentamente, 5ml de sacarose a 20% e realizada uma ultracentrifugação de 90 minutos a 35.000rpm (rotor Ti50.2 Bekman). O sobrenadante foi descartado, o 'pellet' ressuspenso em 300µl de tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 e a solução centrifugada 5 minutos a 10.000rpm em centrifuga para tubos eppendorf. O 'pellet' foi descartado e o sobrenadante (mini-purificado) armazenado a 4°C.

5.7.2. Protocolo de purificação do CMV

O protocolo descrito por Lot *et al.*, 1992 para purificação do CMV foi utilizado com algumas modificações. Folhas de plantas de *C. quinoa* infectadas pelo LeMoV ou pelo DaYMV foram recolhidas 19 dias após a inoculação. A extração foi realizada juntando 200ml de tampão citrato de sódio 0,5M, pH 6,5 aos 200 gramas de folhas infectadas (1:1). Após o extrato ser filtrado em gaze, o clorofórmio foi acrescentado na proporção de 1:1 (v/v) agitado para emulsificação e centrifugado durante 10 minutos a 12.000g. O sobrenadante foi recolhido e 10% de PEG6000 foram adicionados lentamente, agitando-se durante aproximadamente 50 minutos e centrifugado-se 20 minutos a 12.000g. O 'pellet' foi ressuspenso em 75ml de tampão borato 5mM, pH 9,0 e 1/9 deste volume de uma solução de Triton X-100 a 20% foi

adicionada, agitada durante 30 minutos e deixada a 4°C durante 48 horas. A solução foi centrifugada a 19.000g durante 20 minutos, o sobrenadante recolhido e ultracentrifugado 2 horas a 78.000g. O ‘pellet’ foi ressuspenso em aproximadamente 2ml de tampão borato 5mM, pH 9,0 e deixado 24 horas a 4°C. Uma centrifugação baixa de 10 minutos a 7.000g foi realizada e o sobrenadante (semi-purificado) recolhido e mantido a 4°C.

5.7.2.1. Gradiente de Cloreto de Césio

Uma solução a 40% de cloreto de césio (‘Cesium Chloride Ultrapure’) em tampão borato 5mM, pH 9,0 (p/p) foi feita em tubos de 13,2ml e agitada durante alguns minutos antes de ser acrescentada a solução semi-purificada. O gradiente foi realizado com uma ultracentrifugação de 20 horas a 154.000g (rotor 41Ti, Beckman).

5.7.2.2. Refratometria e Espectrofotometria

Após gradiente de cloreto de césio, 23 frações de aproximadamente 500µl foram aliqüotadas em tubos eppendorf com o auxílio de uma bomba peristáltica e submetidas a refratometria (% ClCs). As alíquotas foram dialisadas durante 24 horas em 1000ml de tampão borato 5mM, pH 9,0, sendo que o tampão foi trocado 3 vezes durante este período. Após diálise, leituras de absorbância em comprimentos de onda de 260 e 280nm foram determinadas em espectrofotômetro DU-64 (Beckman).

5.7.3. Protocolo de purificação do PYFV

O protocolo de purificação do PYFV, descrito por Hemida & Murant (1989) foi utilizado com modificações nas tentativas de purificação do LeMoV e do

DaYMV. Folhas de *C. quinoa* foram coletadas 20 dias após inoculação e utilizadas na purificação. A extração foi realizada com 600ml (3x o volume de folhas frescas) de tampão fosfato 0,06M, pH 8,0, contendo 0,1% de ácido tioglicólico e EDTA 10mM. O extrato foi filtrado em gaze e clarificado utilizando-se *n*-butanol a 8,5% , agitado durante 30 minutos e centrifugado a 10.000g durante 15 minutos. Foi adicionado ao sobrenadante, Triton X-100 a 4% (v/v). A mistura foi agitada durante 30 minutos antes da centrifugação de 15 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi recuperado e 10% de PEG6000 e 1% de NaCl foram adicionados. A solução foi agitada durante 60 minutos e centrifugada durante 20 minutos a 10.000g. O 'pellet' foi ressuspensionado em tampão fosfato 0,06M, pH 8,0 durante 4 horas a 4°C e centrifugado 5 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi recuperado e o volume do tubo foi completado com uma solução de sacarose a 20% (p/v) antes de ser ultracentrifugado a 250.000g durante 1,5 hora em tubos para rotor 60Ti Beckman. O 'pellet' foi ressuspensionado em tampão fosfato 0,06M pH 8,0 durante uma noite a 4°C e centrifugado 5 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi recuperado e o volume do tubo foi completado com uma solução de sacarose a 20% (p/v), sendo ultracentrifugado a 250.000g durante 1,5 hora. O 'pellet' foi ressuspensionado em tampão fosfato 0,06M, pH 8,0 durante 4 horas a 4°C, centrifugado 5 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi recuperado e o volume do tubo foi completado com uma solução de sacarose a 20% (p/v) e ultracentrifugado a 250.000g durante 1,5 hora ultracentrifugado a 250.000g durante 1,5 hora. O 'pellet' foi ressuspensionado durante uma noite em 2ml de tampão fosfato 0,06M, pH 8,0 e o semi-purificado armazenado a 4°C.

5.7.3.1. Gradiente de sacarose

Soluções de sacarose de 10 a 40% (p/v) foram preparadas em um separador de gradiente, com tampão fosfato 0,06M, pH 7,0, em tubos de 13,2ml para o rotor SW41Ti Beckman e deixadas em repouso durante uma noite a 4°C. Aproximadamente 500µl da solução semi-purificada foi adicionada cuidadosamente em cada um dos tubos de gradiente e as soluções foram ultracentrifugadas durante 70 minutos a 250.000g. As soluções foram submetidas a leituras de absorbância em um aparelho 'ISCO density gradient fractionator'.

5.7.4. Protocolo de purificação de um isolado de TBRV

O protocolo de purificação do nepovírus TBRV foi modificado e cedido por Marie-Josée Dulucq (INRA-Bordeaux). Folhas de *C. quinoa* foram recolhidas 20 dias após inoculação e utilizadas na extração realizada em tampão fosfato 0,05M pH 7,5 e *n*-butanol-clorofórmio na proporção de 1:3:0,5 (p/v/v). O extrato foi centrifugado durante 20 minutos a 10.000g, o sobrenadante foi recuperado adicionando-se 10% de PEG6000 e 1% de NaCl, deixado sob agitação lenta durante 30 minutos a 4°C e centrifugado a 10.000g durante 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e ultracentrifugado durante 2 horas a 40.000rpm (rotor 60Ti-Beckman). O 'pellet' foi ressuscitado em tampão fosfato 0,05M pH 7,5 durante 48 horas a 4°C e centrifugado durante 15 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi recuperado e ultracentrifugado durante 2 horas a 40.000rpm (rotor 60Ti-Beckman). O 'pellet' foi ressuscitado em 2ml de tampão fosfato 0,05M pH 7,5 e armazenado a 4°C.

5.7.4.1. Gradiente de Sacarose

Soluções de sacarose de 10 a 40% (p/v) foram preparadas em um separador de gradiente, com tampão fosfato 0,05M, pH 7,5, usando tubos de 13,2ml para o rotor SW41Ti Beckman e deixadas em repouso durante uma noite a 4°C. A solução semi-purificada foi adicionada cuidadosamente em cada um dos tubos de gradiente (300µl/tubo) e ultracentrifugadas durante 90 minutos a 35000rpm. As soluções foram submetidas à leituras de absorbância em um aparelho 'ISCO density gradient fractionator'.

5.7.5. Protocolo de purificação do isolado de LeMoV-BR11

O protocolo cedido por Hervé Lot para purificação do isolado de LeMoV-BR11 foi utilizado. Folhas de *C. quinoa* foram coletadas 20 dias após inoculação e a extração realizada com tampão fosfato 0,3M pH 7,4 (1:1) contendo 0,01% de DIECA e 0,1% de 2-βmercapto etanol. O extrato foi filtrado em gaze, emulsificada com clorofórmio (1:1) e centrifugada durante 10 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi recuperado, adicionando-se 10% de PEG6000 e 1% de NaCl. A solução foi deixada em repouso durante 1 hora e centrifugada durante 20 minutos a 10.000g. Cada 'pellet' foi ressuspensionado em aproximadamente 20 ml de tampão fosfato 0,02M pH 7,4, adicionando-se 2% de Triton X-100. As soluções foram colocadas em um mesmo tubo, agitadas durante uma noite a 4°C e centrifugadas a 7.000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e ultracentrifugado 2 horas a 38.000rpm (rotor 60Ti-Beckman). O 'pellet' foi ressuspensionado em aproximadamente 1,5ml de tampão fosfato 0,02M pH 7,4 e centrifugado 5 minutos a 7000g. O sobrenadante (semi-purificado) foi recuperado e mantido a 4°C.

5.7.5.1. Gradiente de Sulfato de Césio

Uma solução de Cs_2SO_4 a 60% (3 gramas de Cs_2SO_4 + 3,5ml de tampão fosfato 0,02M pH 7,4 + 1,5ml da solução semi-purificada) foi preparada em tubos de 5ml para o rotor SW50.1 e ultracentrifugada a 35.000rpm durante 20 horas.

A banda viral foi visualizada e recuperada, perfurando-se o tubo com uma seringa de 1ml em direção à banda viral. Para concentração viral, a fração viral recuperada foi diluída de 4-5x em tampão fosfato 0,02M pH 7,4 e centrifugada durante uma noite a 38.000 rpm em rotor Beckman 60Ti. O ‘pellet’ foi ressuspendido em tampão fosfato 0,02M pH 7,4 e a preparação viral purificada foi armazenada a 4° C.

5.7.5.2. Espectrofotometria

A absorbância foi determinada em espectrofotômetro DU-64 (Beckman), com comprimentos de onda entre 220 e 300 nm. As preparações virais purificadas do LeMoV e do DaYMV foram diluídas 20x em tampão fosfato 0,02M pH 7,4 antes das leituras de absorbância.

5.7.6. Protocolo de purificação do DaYMV-Ls2

O protocolo descrito por Bos *et al* (1983) foi utilizado com algumas modificações. Folhas de plantas de *C. quinoa* infectadas sistemicamente foram coletadas 18-20 dias após a inoculação e usadas no procedimento de purificação. A extração foi feita utilizando-se tampão fosfato de potássio 0,5M, pH 7,0 contendo 0,1% de ácido tioglicólico (v/v), em uma proporção de 1:1,5 (folhas:tampão). O extrato foi filtrado em gaze e deixado a -20° C durante uma noite. Depois de descongelado, *n*-butanol foi adicionado ao

filtrado para uma concentração final de 8%. A mistura foi agitada utilizando-se barras magnéticas por 45 minutos, deixada 30 minutos a 4°C e centrifugada por 10 minutos a 16.000g. O sobrenadante foi coletado, precipitado com 10% de PEG6000 (p/v), agitado com barras magnéticas durante 3-4 horas e centrifugado a 16.000g por 10 minutos. Os 'pellets' foram ressuspensos em tampão Tris 10mM HCl pH 9,0. Nesta etapa o volume de tampão utilizado na ressuspensão dos 'pellets' foi de ¼ do volume inicial de tampão utilizado na etapa inicial de extração. A solução foi ultracentrifugada por 2,5 horas a 116.000g e o 'pellet' obtido foi ressuspendido durante 24 horas em tampão Tris-HCl 10mM pH9,0. Na etapa final foi realizada uma centrifugação a 7000g durante 10 minutos, quando o sobrenadante (semi-purificado viral) foi recuperado e armazenado a 4° C.

5.7.6.1. Gradiente de Sulfato de Césio

Um ml da preparação viral semi-purificada foi misturada com 4ml de uma solução a 74,5% de Cs₂So₄, em tubos de 5ml para rotor Beckman SW-50.1 e centrifugada por 20 horas a 35.500rpm. A banda viral formada foi recuperada, perfurando-se o tubo com uma seringa de 1ml em direção à banda viral. Para concentração viral, a fração viral recuperada foi diluída de 4-5x em tampão Tris 10mM HCl pH9,0 e centrifugada durante uma noite a 38.000rpm em rotor Beckman 60Ti. O 'pellet' foi ressuspendido em tampão Tris-HCl 10mM pH9,0 e a preparação viral purificada foi armazenada a 4° C.

5.7.6.2. Espectrofotometria

A absorbância foi determinada em espectrofotômetro DU-64 (Beckman), com comprimentos de onda entre 220 e 300nm. As preparações virais purificadas

do LeMoV e do DaYMV foram diluídas 20x em tampão Tris-HCl 10mM pH9,0 para a leitura de absorbância. Para se determinar a concentração de partículas virais nas soluções purificadas, o coeficiente de extinção ($E_{1\text{cm}}^{0,1\%}$) foi determinado através das equações $A_{260}/A_{280} = 0.9320 + 0.0454 (\text{RNA}\%) - 0.0006 (\text{RNA}\%)^2$ e $(E_{1\text{cm}}^{0,1\%}) = 1.531 + 0.205 (\text{RNA}\%)$ (Gibbs & Harrison, 1976).

5.8. Teste de infectividade

O teste de infectividade foi realizado para monitoramento quanto à presença de vírus, tanto com as soluções semi-purificadas (antes de submetidas à gradiente) e purificadas (após gradiente) quanto para as soluções mini-purificadas. Plantas de *C. quinoa* foram inoculadas mecanicamente com as soluções virais na presença de um abrasivo e as plantas analisadas periodicamente para a presença de sintomas.

5.9. Microscopia Eletrônica

As soluções semi-purificadas, purificadas e minipurificadas foram analisadas em testes de contrastação negativa, utilizando-se grades de cobre de 200 mesh previamente cobertas por uma fina película de formvar e tratadas com carbono. As grades foram preparadas para visualização, deixadas-as 30 segundos em uma gota da preparação viral purificada, seguida por 3 lavagens com água destilada e 5-10 segundos em uma gota do ácido fosfotúngstico (PTA) a 1%, utilizado como contrastante. Antes da análise, o sulfato ou cloreto de cério foram eliminados das soluções purificadas por diálise durante 24 horas, a 4° C, utilizando-se o tampão de ressuspensão correspondente à purificação, sendo este tampão trocado 3 vezes durante este período. Tecidos foliares infectados pelo LeMoV também

foram analisados através de preparações de 'Leaf-dip'. Nesta técnica, o tecido foliar infectado foi macerado em tampão fosfato de potássio 25mM, pH 7,0. As grades foram deixadas 1 minuto em uma gota desta solução, lavadas 3 vezes com água destilada e imediatamente transferidas para uma gota do contrastante PTA 1%, durante 5-10 segundos. As análises foram realizadas em um Microscópio Eletrônico Philips, operando a 100kV.

5.10. Gel de poliacrilamida (SDS PAGE)

As soluções semi-purificadas, purificadas e mini-purificadas foram analisadas em mini-géis de poliacrilamida a 15 %, preparados com 5ml de uma mistura de acrilamida/bis-acrilamida (30%/0,8%(p/v), 2,5ml de um tampão Tris 1,5M pH8,8, SDS 0,4% , 2,5ml de água MilliQ, 5µl de TEMED e 50µl de uma solução de persulfato de amônia (APS) a 10%. Para facilitar a deposição das amostras e uma melhor separação e visualização das bandas, um gel empilhador também foi preparado contendo 0,85ml de acrilamida/bis-acrilamida (30%/0,8%(p/v), 1,25ml de tampão Tris 1,5M pH 6,8, 2,9ml de água MilliQ, 5µl de TEMED e 30µl de APS 10%. Este segundo gel foi colocado logo após o primeiro gel estar seco.

As amostras foram preparadas em microtubos com aproximadamente 2µg de vírus e tampão 5x composto por 2% de Tris 1M pH 6,8, 3,2% de glicerol, 0,8g de SDS/40ml de tampão, 0,32% de 2-βmercapto-etanol, 0,4mg de azul de metileno/40ml de tampão e água MilliQ. O tampão 5x foi acrescentado às amostras na proporção de 1ml de solução viral para 5ml de tampão. As amostras foram desnaturadas 5-10 minutos a 95°C e aplicadas imediatamente ao gel. Após eletroforese, o gel foi lavado em água MilliQ e colorido em uma solução de 'comassie blue' contendo metanol e ácido acético

durante 1 hora e descolorido em ácido acético para retirar o excesso de coloração e facilitar a visualização das bandas de proteína. Os marcadores de proteínas foram preparados da mesma forma que as amostras virais, utilizando-se 5µl do marcador 'BenchMark Prestained Protein Ladder' (Invitrogen) ou do 'Prosteined SDS-PAGE Standards' (Bio-Rad).

5.11. Gel de poliacrilamida e 'Western Blot'

Na técnica de 'Western blot', após a eletroforese, as proteínas são tranferidas sobre uma membrana de nitrocelulose sendo que as de interesse são reveladas por um anticorpo específico.

Duas repetições de um mesmo gel de poliacrilamida foram preparadas, sendo que um deles foi colorido com o corante 'comassie blue' para visualização das bandas de proteínas e o outro submetido ao 'Western blot'. O gel de poliacrilamida que não foi colorido após eletroforese, a folha de nitrocelulose e os papéis de filtro 'Wattman' utilizados na transferência, foram deixados 10 minutos em tampão de transferência (solução T1) contendo Tris base, glicina, etanol e água MilliQ. Um sanduíche foi preparado colocando-se três folhas de papel de filtro, do mesmo tamanho da folha de nitrocelulose. O gel foi colocado sobre a folha de nitrocelulose e outras três folhas de filtro foram colocadas sobre ele, cobrindo-o completamente. A transferência foi efetuada a semi-seco em um aparelho Bio-Rad, durante uma hora sob uma corrente de aproximadamente 20V.

No processo de revelação, a membrana foi colocada em uma placa de petri contendo 10ml de uma solução de saturação (solução T3) composta por NaCl, Tris-HCl pH7,4, gelatina e água MilliQ e deixada sob agitação durante uma noite à temperatura ambiente. Após saturação, a membrana foi lavada 3x durante 10 minutos com

uma solução de lavagem (solução T4) contendo Tris pH 7,5, NaCl, SDS20%, Triton X-100 e água MilliQ e incubada 2 horas sob agitação em solução contendo antissoro específico para o isolado BR11, cedido por Hérve Lot (INRA-Avignon), diluído na proporção de 1:500 em solução T4. A membrana foi novamente lavada em solução T4 e incubada 2 horas com o conjugado anti-coelho diluído também em solução T4 na proporção de 1:5000. A membrana foi lavada novamente com solução T4 e revelada em solução de revelação (solução T5) contendo substrato da fosfatase alcalina (NBT-BCIP) diluído em tampão Tris 1M pH 9,5, NaCl 5M, MgCl₂ 1M e água MilliQ.

5.12. Extração de RNA e RT-PCR

O RNA total tanto do LeMoV como do DaYMV foi extraído a partir de 200µl de preparação viral purificada, adicionado-se 50µl do tampão de extração (0,2M glicina, 0,2M NaCl, 0,02M EDTA, pH 9,5). Esta mistura foi ajustada para 1,5% de SDS (p/v) e 100ug/ml de 'Proteinase' K (GibcoBRL) e deixada a 37° C durante 1 hora. O RNA foi extraído com igual volume de fenol/clorofórmio (1:1) e precipitado com 2,5x o volume final (após extração fenol/clorofórmio), de etanol 100%. O 'pellet' obtido foi lavado em etanol 70% e ressuspendido em 20µl de água destilada estéril tratada com DEPC.

As combinações de oligonucleotídeos degenerados Seq1s/Seq3aS, Seq1s/Seq4aS e Seq2s/Seq4aS (item 5.4) foram testadas para os isolados de LeMoV e DaYMV. A RT-PCR foi realizada em um volume de 40 µl contendo 3µl de RNA viral, 4µl de tampão Eurobio 10x, 4µl de Triton X-100 a 0,2% (v/v), 3,2µl de MgCl₂ 50mM, 0,32µl da mistura de nucleotídeos (dNTPs 25mM), 0,4 µl de cada oligonucleotídeo a 100µM, 0,75 unidades da enzima transcriptase reversa *AMV* (AmershamPharmacia) e 0,4 unidades de *Taq* DNA

polimerase (Eurobio). A reação constituiu de 30 minutos a 42°C, seguida de 3 minutos a 95°C e 45 ciclos de desnaturação por 30 segundos/95°C, anelamento por 40 segundos/49°C e extensão por 50 segundos/72°C. Foram retirados 10 µl da reação para análise em gel de agarose a 1,0 %.

5.13. Gel de RNA em condições desnaturantes

O mini-gel foi preparado na presença do tampão FA 10x contendo MOPS ('free acid') 200mM, acetato de sódio 50mM, EDTA 10mM e agarose 1,2%. As amostras do purificado viral do LeMoV e o marcador de RNA ('RNA ladder 9,5Kb') foram preparados na presença do tampão 5x ('5x RNA loading buffer') contendo bromofenol blue saturado, EDTA 500mM, formaldeído 37%, glicerol 100%, formamida, tampão FA 10x e água 'RNase free'. A proporção utilizada foi de 1 volume de amostra para 5 volumes do tampão 5x descrito acima. As amostras foram incubadas 5 minutos a 65°C e imediatamente colocadas no gelo antes de serem aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada a 60V durante aproximadamente 2 horas.

5.14. Síntese de oligonucleotídeos degenerados

Para continuação do sequenciamento parcial do LeMoV e do DaYMV, oligonucleotídeos degenerados foram desenhados baseados nas sequências dos genomas completos dos membros da família *Sequiviridae*: PYFV, NC_003628, RTSV, NC_001632 e MCDV, NC_003626. Os oligonucleotídeos degenerados Seq5s, Seq6s, Seq7s, Seq8s e Seq9aS (Tabela 1, Figura 2) foram desenhados na região codificadora para a replicase viral do genoma dos membros da família *Sequiviridae* e testados em RT-PCR juntamente com os oligonucleotídeos Seq2 e Seq4 (item 5.5). A reação de transcriptase reversa e de polimerização em cadeia em uma só etapa foi realizada com 40µl de reação, utilizando-se 3µl

Comentário: estes virus já foram escritos por extenso anteriormente

do RNA extraído a partir de preparações purificadas, 4µl de Triton X-100 a 0,2% (v/v), 3,2µl de MgCl₂ 50mM, 0,32µl da mistura de nucleotídeos (dNTPs 25Mm), 0,4 µl de cada oligonucleotídeo a 100µM, 0,75 unidades da enzima AMV (AmershamPharmacia) e 0,4 unidades de *Taq* DNA polimerase (Eurobio) e os pares de oligonucleotídeos Seq2s/Seq4aS (167bp), Seq4s/Seq9aS (261bp) e Seq5s/Seq2aS(175bp) com uma temperatura de anelamento de 49° C e tempo de elongação de 20 segundos. Para Seq2s/Seq9aS (408bp), Seq5s/Seq9aS (585bp), Seq6s/Seq4aS (588bp) e Seq6s/Seq2aS (409bp) a temperatura de anelamento foi de 50° C e o tempo de elongação de 40 segundos. Para Seq7s/Seq2aS, uma temperatura de anelamento de 48°C e tempo de elongação de 50 segundos e para Seq8s/Seq2aS, uma temperatura de anelamento de 50°C e 90 segundos de tempo de elongação.

Os oligonucleotídeos degenerados capDL1s/capDL2aS (Tabela 1, Figura 2) na região da proteína capsidial foram desenhados a partir do alinhamento das sequências obtidas do DaYMV e do PYFV. A RT-PCR foi realizada em um volume total de 40µl com 3µl de RNA extraído a partir da solução purificada do LeMoV, 0,4µl de cada oligonucleotídeo capLmos/capLmoaS à uma concentração de 100µM, 4µl de Triton X-100 a 0,2% (v/v), 3,2µl de MgCl₂ 50mM, 0,32µl da mistura de nucleotídeos (dNTPs 25Mm), 0,75 unidades da enzima AMV (AmershamPharmacia) e 0,4 unidades de *Taq* DNA polimerase (Eurobio) e a reação consistiu de 42°C durante 30 minutos, 95°C durante 3 minutos e 40 ciclos de 95°C/30 segundos, 53°C/40 segundos e 72°C/20 segundos. O produto de amplificação de aproximadamente 200bp foi analisado em gel de agarose 1,0%.

5.15. Clonagem e sequenciamento

Os fragmentos amplificados foram clonados em vetor *pGEM-T* (Promega) e colônias foram selecionadas por PCR utilizando-se 0,25µl de cada um dos oligonucleotídeos T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') à uma concentração de 100µM, 0,5µl de meio de cultura onde cresceram as colônias, 2µl de tampão Eurobio 10x, 0,75µl de MgCl₂ 50mM, 3µl de Triton X-100 a 0,2% (v/v), 0,25µl de dNTPs 25mM, 0,3 unidades de *Taq* DNA polimerase (Eurobio) e 17,9µl de água MilliQ para uma reação de 25µl. O ciclo utilizado consistiu de 5 minutos a 94°C e 30 ciclos de 94°C/30 segundos, 50°C/30 segundos e 72°C/1 minuto. Os insertos selecionados com tamanhos esperados foram sequenciados e analisados pelo programa 'NCBI-BLAST' (www.ncbi.nlm.gov/blast/).

5.16. Oligonucleotídeos universais para LeMoV/ DaYMV

Baseado no alinhamento das sequências de nucleotídeos, oligonucleotídeos foram obtidos para a possível região codificadora para a replicase do LeMoV e do DaYMV (DALE1s/DALE2aS, Tabela 1, Figura 2). Para a reação de RT-PCR (40µl total), 3µl do RNA total obtido a partir da preparação viral purificada foi utilizado com 4µl de tampão Eurobio 10x, 4µl de Triton X-100 a 0,2% (v/v), 3,2µl de MgCl₂ 50mM, 0,32µl da mistura de nucleotídeos (dNTPs 25mm), 0,4µl dos oligonucleotídeos DALE1s e DALE2aS a 100µM, 0,75 unidades da enzima transcriptase reversa *AMV* (AmershamPharmacia) e 0,4 unidades de *taq* DNA polimerase (Eurobio). O ciclo consistiu de 30 minutos a 42°C para a etapa de transcrição reversa, 3 minutos a 95°C para inativação da transcriptase reversa e 40 ciclos de 30

segundos/95°C, 40 segundos/53°C e extensão por 50 segundos/72°C. Foram retirados 10µl da reação para análise em gel de agarose a 1,0 %.

Os produtos amplificados de aproximadamente 603bp para o LeMoV, DaYMV e para outros três isolados de prováveis sequivírus: isolados BR11, 2227 e Ch36, foram clonados e sequenciados conforme o item 5.14. As sequências foram alinhadas usando o programa 'Clustal W' (Thompson *et al.*, 1994) e a árvore filogenética foi construída pelo programa 'TreeView' (www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html).

5.17. Oligonucleotídeos específicos para diagnose em RT-PCR

Oligonucleotídeos específicos foram desenhados para o LeMoV (Lmo3s-Lmo4aS, Tabela 1, Figura 2) e para o DaYMV (Dan1s/Dan2aS, Tabela1, Figura 2). Para 40µl de reação de RT-PCR, 5µl de RNA total extraído de acordo com protocolo de Bertheau *et. al* (1998), a partir de plantas de alface cv “Trocadero” infectadas e sadias, foram utilizados com 0.4µl dos oligonucleotídeos Lmo3s/Lmo4aS (300bp) ou Dan1s/Dan2aS (331bp) à uma concentração de 100µM, 4µl de tampão Euróbio 10x, 4µl de Triton X-100 a 0,2% (v/v), 3,2µl de MgCl₂ 50mM, 0,32µl dNTPs 25mM, 0,75 unidades da enzima *AMV* (AmershamPharmacia) e 0,4 unidades de *Taq* DNA polimerase (Eurobio). O ciclo utilizado na reação para ambos os vírus consistiu de 30 minutos a 42°C, 3 minutos a 95°C, 35 ciclos de 95°C/30segundos, anelamento de 52°C/30segundos e 72°C/30segundos, e um tempo final de elongação de 72°C durante 10 minutos. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, utilizando-se 10µl da reação.

5.18. Teste para presença de cauda poliA

Para verificar a presença ou não de cauda poliA, foram realizadas duas reações de transcrição reversa para o LeMoV utilizando-se um oligonucleotídeo específico Lmo4aS localizado na provável região da replicase do LeMoV e separadamente um oligo(dT)₁₂₋₁₈ (pd(T)12-18-Invitrogen). Para um controle da reação de transcrição reversa com o oligo(dt) foi realizada uma terceira reação utilizando o LMV, um potyvirus que possui uma cauda poliA localizada na região 3' de seu genoma. Para todas as reações foram realizadas reações de 25µl, contendo 1,5µl da enzima *AMV Reverse Transcriptase* (USB), 1µl de dNTPs 10µM, oligo(dt) ou oligonucleotídeo específico Lmo4aS, ambos a 100µM e 5µl de RNA total extraído pelo método de Bertheau *et al.*, 1998, provenientes de plantas de alface cv “Trocadero” infectadas pelo LeMoV, pelo isolado AF198 do LMV e plantas sadias. As reações foram mantidas a 37° C por 50 minutos e a 75° C durante 10 minutos. Os DNAs complementares (cDNAs) obtidos foram armazenados a -20° C.

Para uma reação de PCR de 25µl foram utilizados 3µl de cDNA, 0,25µl dos oligonucleotídeos específicos para LeMoV (Lmo3s/Lmo4aS, Tabela 1, Figura 3) ou específicos para LMV (oligo8894 -5' CCGTACATAGCIGARTGTGCT 3' /oligo 9171 -5' GCGTTGATGTCGTCATCYTT 3'), à uma concentração de 100µM cada, 2,5µl de Triton X-100 a 0,2% (v/v), 1,75µl de MgCl₂ 50mM, 0,25µl dNTPs 25mM e 0,4 unidades de *Taq* DNA polimerase (Eurobio). O ciclo consistiu de 95°C durante 3 minutos e 35 ciclos de 95°C/30 segundos, 54°C/40 segundos e 72°C/20 segundos para ambos os pares de oligonucleotídeos. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, utilizando-se 10µl da reação.

6. Resultados e Discussão

Multiplificação e manutenção dos isolados virais: Plantas de alface cv. ‘Trocadero’, *C. quinoa*, *C. amaranticolor* e *N. benthamiana* foram inoculadas com os isolados de LeMoV-AF-197 e de DaYMV-DSM2 para serem comparados os sintomas provocados pelos dois isolados e para se determinar qual seria a melhor planta para ser utilizada na manutenção e no processo de purificação. As plantas de alface cv. “Trocadero” apresentaram sintomas de mosaico e clareamento do tecido foliar quando inoculadas com o DaYMV, como descrito por Bos *et al.*, 1983, sendo evidente durante a infecção nesta mesma cultivar de alface, um leve mosqueado seguido de mosaico para o isolado do LeMoV (Figura 3a). Os sintomas provocados em *C. quinoa* para o isolado do LeMoV são diferentes dos induzidos pelo DaYMV (Figura 3b). Já as plantas de *N. benthamiana*, não apresentaram sintomas para ambos os vírus, porém quando plantas de *C. quinoa* foram inoculadas a partir das plantas de *N. benthamiana*, os sintomas foram completamente recuperados, comprovando-se a multiplicação viral. Plantas de *C. amaranticolor* apresentam sintoma sistêmico quando infectadas pelo DaYMV (Figura 3c) e não multiplicam o LeMoV. Estes dados obtidos confirmam os resultados preliminares obtidos por Bos *et al.*, 1983 para diferentes isolados do DaYMV. Plantas de *C. quinoa* foram escolhidas para serem utilizadas na etapa de purificação

viral, e para manutenção “in vivo” dos isolados do LeMoV e do DaYMV em casa de vegetação, já que são facilmente infectadas e os sintomas mostram-se evidentes para ambos os vírus.

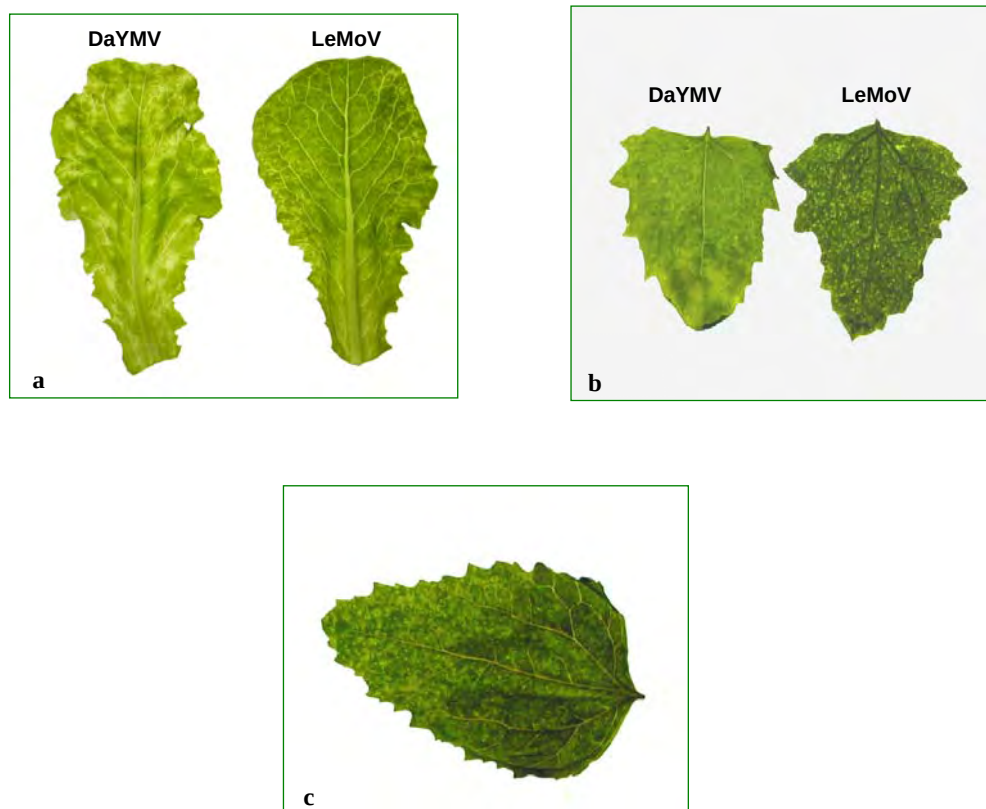


Figura 3: Plantas de alface cv. “Trocadero” (3a), *C. quinoa* (3b) e *C. amaranticolor* (3c) mostrando os sintomas provocados pelo LeMoV e DaYMV, 20 dias após a inoculação.

Teste com gama de hospedeiro: A gama de hospedeiro para diferentes isolados do DaYMV e para o isolado de LeMoV do Distrito Federal já foi descrita por Bos *et al.* (1983) e por Marinho & Kitajima (1986), respectivamente. O isolado AF-197 do LeMoV foi inoculado mecanicamente em 23 espécies contidas em 6 famílias diferentes e os sintomas foram avaliados visualmente até o 20º dia após a inoculação. As plantas que não apresentaram sintomas quando inoculadas com o LeMoV, foram verificadas quanto à multiplicação viral em *C. quinoa*. Os resultados deste experimento podem ser observados (Tabela 2). Um total de 8 espécies foram suscetíveis ao LeMoV, sendo que somente 5 mostraram sintomas após a inoculação (*Amaranthus hybridus*, *Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa*, *Sonchus oleraceus* e *Taraxacum officinalis*) e as outras 3 espécies restantes apresentaram infecção latente (*Nicotiana benthamiana*, *Helichysum. bracteatum* e *Zinnia elegans*). Seis cultivares de alface foram capazes de multiplicar o LeMoV, sendo que foi observado sintoma sistêmico de mosaico nas cultivares ‘Ithaca’, ‘Trocadero’, ‘Marisa’ e ‘White Boston’ e infecção latente nas cultivares ‘Elisa’ (*mo1¹*) e ‘Vanguard-75’ (*mo1¹* e *Mo2*).

Plantas de *C. quinoa* e a cultivar de alface cv. ‘Trocadero’ mostraram mosaico sistêmico quando inoculadas com o LeMoV, sendo que *Chicorium endivia*, *Datura stramonium*, *Nicotiana glutinosa* e *Petunia hibrida* não foram infectadas pelo vírus. Estes resultados foram também encontrados por Bos *et al.*, (1983) para a maioria dos isolados de DaYMV testados. Quando inoculadas com o LeMoV, plantas de *Chenopodium amaranticolor* e *Nicotiana clevelandii* não foram infectadas, entretanto mostraram sintomas de mosaico sistêmico e infecção latente, respectivamente, quando inoculadas com diferentes isolados do DaYMV (Bos *et al.*, 1983). Plantas de *Nicotiana benthamiana* apresentaram

Tabela 2: Gama de hospedeiro para o LeMoV-AF197.

Planta	Família	Sintomas LeMoV-AF197	Recuperação em <i>C. quinoa</i>
<i>Amaranthus hybridus</i>	<i>Amaranthaceae</i>	M	+
<i>Chenopodium amaranthicolor</i>	<i>Chenopodiaceae</i>	-	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Chenopodiaceae</i>	LL, M	+
<i>Chicorium endivia</i>	<i>Cichorioideae</i>	-	-
<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Cucurbitaceae</i>	-	-
<i>Gomphrena globosa</i>	<i>Amaranthaceae</i>	LL, M	+
<i>Datura stramonium</i>	<i>Solanaceae</i>	-	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	<i>Solanaceae</i>	-	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	<i>Solanaceae</i>	-	-
<i>Nicotiana havana 425</i>	<i>Solanaceae</i>	-	-
<i>Nicotiana physaloides</i>	<i>Solanaceae</i>	-	-
<i>Nicotiana rustica</i>	<i>Solanaceae</i>	-	-
<i>Nicotiana sansum</i>	<i>Solanaceae</i>	-	-
<i>Nicotiana tabacum TNN</i>	<i>Solanaceae</i>	-	-
<i>Nicotiana turkish</i>	<i>Solanaceae</i>	-	-
<i>Nicotiana xanthii</i>	<i>Solanaceae</i>	-	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Solanaceae</i>	LI	+
<i>Petúnia híbrida</i>	<i>Solanaceae</i>	-	-
<i>Helichrysum bracteatum</i>	<i>Asteraceae</i>	LI	+
<i>Sonchus olearaceus</i>	<i>Asteraceae</i>	M	+
<i>Taraxacum officinalis</i>	<i>Asteraceae</i>	M	+
<i>Zinnia elegans</i>	<i>Asteraceae/Compositae</i>	LI	+
<i>Lactuca sativa</i> cv. “Elisa”	<i>Asteraceae/Compositae</i>	LI	+
<i>Lactuca sativa</i> cv. “Ithaca”	<i>Asteraceae/Compositae</i>	M	+
<i>Lactuca sativa</i> cv. “Marisa”	<i>Asteraceae/Compositae</i>	M	+
<i>Lactuca sativa</i> cv. “Trocadero”	<i>Asteraceae/Compositae</i>	M	+
<i>Lactuca sativa</i> cv. “Vanguard-75”	<i>Asteraceae/Compositae</i>	LI	+
<i>Lactuca sativa</i> cv. “White Boston”	<i>Asteraceae/Compositae</i>	M	+

M: sintoma sistêmico, mosaico; LL: lesões locais; LI: infecção latente; - não hospedeira ou sem recuperação de sintomas em *C. quinoa*.

infecção latente quando inoculadas com o LeMoV e com a maioria dos isolados de DaYMV testados por Bos *et al.*, (1983). Estes resultados podem ser vistos na tabela 3.

Chenopodium quinoa, *Gomphrena globosa*, e *Sonchus oleraceus* mostraram-se suscetíveis ao LeMoV-AF197, estando de acordo com Marinho & Kitajima (1986), exceto para *Sonchus oleraceus* que não foi infectado quando inoculado com o isolado do Distrito Federal. Plantas de *Zinnia elegans* apresentam infecção latente e plantas de *Datura stramonium*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana Havana 425*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sansum*, *Nicotiana tabacum TNN*, *Nicotiana turkish*, *Cucurbita pepo* e *Chicorium endivia* não foram infectadas pelo LeMoV-AF197, como descrito por Marinho & Kitajima (1986) para o isolado de LeMoV do Distrito Federal (Tabela 4).

Extração de RNA e RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados para família *Sequiviridae*: Oligonucleotídeos degenerados Seq1s, Seq2s, Seq3aS e Seq4aS foram desenhados na possível região da replicase dos membros da família *Sequiviridae*, baseados no alinhamento das sequências nucleotídicas e testados em RT-PCR com RNA total do LeMoV e do DaYMV extraído pelo método de Bertheau *et al.*, (1998), sendo que o oligonucleotídeo Seq4 contém o motivo conservado GDD presente em todas RNA-dependentes de RNA polimerase (Argos, 1988). As combinações de oligonucleotídeos Seq1s/Seq3aS, Seq1s/Seq4aS, Seq2s/Seq4aS foram testadas em RT-PCR para o LeMoV e para o DaYMV, porém nenhuma combinação gerou um produto de amplificação para ambos os vírus, provavelmente devido à alta degeneração dos oligonucleotídeos utilizados e à baixa concentração dos vírus na planta.

Tabela 3: Gama de hospedeiro mostrando os sintomas induzidos pelo LeMoV-AF197 e por diferentes isolados do DaYMV (Bos *et al.*, 1983).

Plantas	Sintomas LeMoV- AF197	Sintomas DaYMV isolados Ls2, Ls4, Ls12, Ls16, Ls158 e Tar2 (Bos <i>et al.</i> , 1983)
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL, M	LL, M (exceto Ls12)
<i>Gomphrena globosa</i>	LL, M	LI (Tar2,Ls2)
<i>Lactuca sativa</i> cv. ‘Trocadero’	M	M (exceto para Ls4)
<i>Sonchus olearaceus</i>	M	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	LI	LI
<i>Chicorium endivia</i>	-	-
<i>Datura stramonium</i>	-	-
<i>Nicotiana. Glutinosa</i>	-	-
<i>Petúnia híbrida</i>	-	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	LI (Ls2 e Tar2)
<i>Chenopodium amaranthicolor</i>	-	LL, M (exceto Ls12 e Ls4)

M: sintoma sistêmico, mosaico; LL: lesões locais; LI: infecção latente; - não hospedeira

Tabela 4: Gama de hospedeiro mostrando os sintomas induzidos pelo LeMoV-AF197 e pelo isolado de LeMoV caracterizado por Marinho & Kitajima, 1986).

Plantas	Sintomas do LeMoV-AF197	Sintomas do LeMoV (Marinho & Kitajima, 1986)
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL, M	LL, M
<i>Gomphrena globosa</i>	LL, M	LL
<i>Sonchus olearaceus</i>	M	-
<i>Lactuca sativa</i> cv. 'White Boston'	M	M
<i>Zinnia elegans</i>	LI	LI
<i>Helichrysum bracteatum</i>	LI	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	LL, M
<i>Datura stramonium</i>	-	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	-
<i>Nicotiana havana</i> 425	-	-
<i>Nicandra physaloides</i>	-	-
<i>Nicotiana rustica</i>	-	-
<i>Nicotiana glauca</i>	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i> TNN	-	-
<i>Nicotiana glauca</i>	-	-
<i>Cucurbita pepo</i>	-	-
<i>Chicorium endivia</i>	-	-

M: sintoma sistêmico, mosaico; LL: lesões locais; LI: infecção latente; -: não hospedeira

Extração de RNA fita dupla (dsRNA), DOP-PCR e RT-PCR:

Durante a replicação viral muitos vírus formados por RNAs fita simples (ssRNA) formam longos RNAs fita dupla também chamados de formas replicativas (RFs). RNAs de fita dupla obtidos a partir de plantas infectadas por vírus de ssRNAs, são prováveis RFs. Estes RNAs são bastante resistentes quando comparados aos ssRNAs e portanto sua extração é mais simples, não necessitando de tantos cuidados com relação à enzima *RNAse* que degrada o RNA. Muitos trabalhos de caracterização viral tiveram êxito a partir da extração desses RNAs (Gentit *et al.*, 2001; Rott & Jelkmann, 2001; Gentit *et al.*, 2002). A utilização deste tipo de RNA em estudos de caracterização molecular de vírus desconhecidos pode ser muito útil, já que possibilita a utilização de testes de PCR utilizando oligonucleotídeos completamente degenerados, já que sabemos que estamos trabalhando somente com o RNA viral, livre dos RNAs da planta hospedeira.

Como os oligonucleotídeos Seq1s, Seq2s, Seq3aS e Seq4aS são muito degenerados, tentativas de se extrair o RNA fita dupla foram realizadas para se obter um RNA viral mais puro e em maior concentração. Três protocolos foram utilizados nas tentativas de se isolar os dsRNA do LeMoV e do DaYMV: um protocolo que utiliza a celulose CF11, um segundo que utiliza micro-celulose MN301 e um protocolo de mini-extração com a celulose CF11, utilizado na realização de uma cinética de extração de dsRNA. Os dois primeiros protocolos foram testados na extração de dsRNA do LeMoV e do DaYMV 10 dias após a inoculação, porém sem nenhum resultado positivo quando os géis foram analisados antes ou após os tratamentos enzimáticos. Em uma das tentativas de extração do dsRNA do LeMoV utilizando o protocolo mais habitual com a celulose CF11, nenhuma banda foi visualizada para as plantas sadias (Figura 4a), bem como para o provável RNAs do LeMoV,

com aproximadamente 10Kb (Figura 4b). Entretanto podemos ver o resultado da extração dos 3 dsRNA do CMV utilizado como controle da extração (Figura 4c).

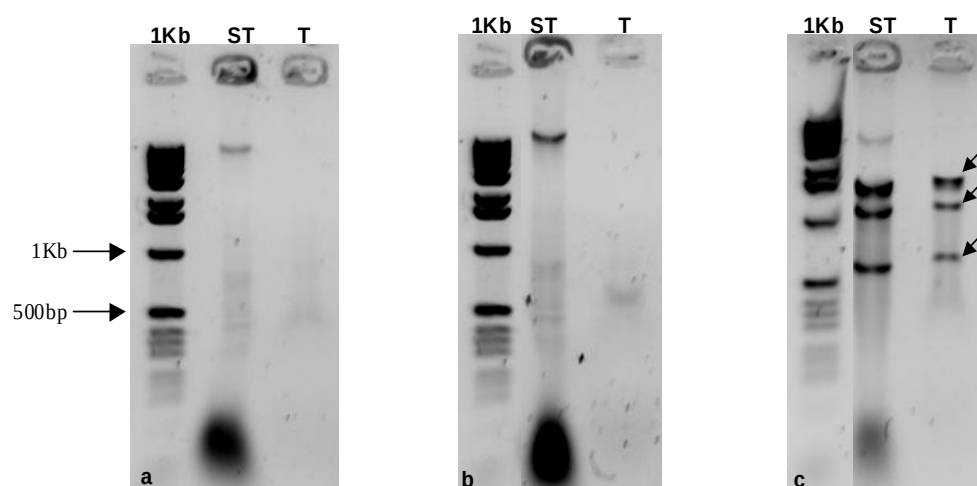


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 0,8%, após extração de dsRNA. ‘T e ST’ correspondem a tratamento enzimático e sem tratamento enzimático, respectivamente. (4a) *C. quinoa* sadia,, (4b) LeMoV e (4c) CMV

Como a concentração de dsRNA varia muito de um vírus para outro e em certos casos existe uma grande dificuldade na extração, já que alguns vírus produzem estes RNAs em baixíssimas concentrações e/ou diminuem drasticamente a sua produção em um curto espaço de tempo, uma cinética de extração foi utilizada para se tentar isolar os dsRNA do LeMoV e do DaYMV. As mini-extrações foram realizadas 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após inoculação, porém nenhuma banda do provável dsRNA do LeMoV ou do DaYMV foi visualizada antes dos tratamentos enzimáticos e após tratamentos com as enzimas *DNAse*, *RNAse* e *Proteinase K* para as amostras coletadas 4, 8 e 10 dias após inoculação com o LeMoV e para a amostra coletada 8 dias após inoculação com o DaYMV, onde havia dúvida sobre a presença de bandas de dsRNA de tamanho esperado e que na verdade, correspondiam provavelmente à bandas de DNA da planta hospedeira, já que desapareceram após os tratamentos enzimáticos (dados não mostrados).

Mesmo não sendo visualizada nenhuma banda para o LeMoV e para o DaYMV correspondente ao dsRNA, foi realizado um teste de DOP-PCR e outro de RT-PCR, com as amostras após extração e tratamentos enzimáticos. A DOP-PCR consistiu em uma etapa de transcrição reversa (RT) seguida por uma etapa de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR). Foram utilizados na etapa de PCR, os oligonucleotídeos degenerados denominados DOP5 e DOP6. Com isto, se houvesse a concentração de dsRNA, mesmo que muito baixa para ser visualizada em gel de agarose, em DOP-PCR poderíamos recuperar alguma parte deste ácido nucleico, devido a alta sensibilidade da técnica de PCR. As amostras após extração de dsRNA de *C. quinoa* infectada pelo LeMoV e de *C. quinoa* sadia foram utilizadas neste teste. Para o DOP5 não foi possível visualizar nenhum resultado, porém para DOP6 bandas de diferentes tamanhos foram visualizadas somente para *C. quinoa* infectada

com o LeMoV, utilizando o protocolo de extração com a micro-celulose MN301 (Figura 5). A reação de PCR foi purificada e os DNAs clonados em vetor *pGem-T Easy Vector* (Promega) System I. Foram obtidos 20 produtos de clonagem, onde 10 clones de diferentes tamanhos foram escolhidos e enviados para sequenciamento (Figura 6). A análise das sequências realizada pelo programa ‘NCBI-BLAST’, não mostrou nenhuma identidade de sequência com espécies virais ou com qualquer outro organismo conhecido.

Um teste de RT-PCR também foi realizado com os produtos das extrações de dsRNA e os oligonucleotídeos degenerados para família *Sequiviridae* nas combinações Seq1s/Seq3aS, Seq1s/Seq4aS, Seq2s/Seq4aS. Nenhuma banda foi observada em gel de agarose, tanto para o LeMoV como para o DaYMV.

Purificação e propriedades virais: Nas tentativas de se obter um método eficiente de purificação para o LeMoV e o DaYMV, um protocolo de mini-purificação viral e alguns protocolos de purificação para vírus isométricos foram utilizados com algumas modificações: Lot *et al.*, 1992; Murant & Gold, 1968; protocolo de purificação de um isolado de *Tomato black ring virus* (TBRV); protocolo de purificação do isolado de LeMoV BR11 e Bos *et al.*, 1983. Após o procedimento de mini-purificação do LeMoV e do DaYMV muitas bandas de diferentes pesos moleculares foram visualizadas em gel de poliacrilamida (Figura 7) evidenciando a contaminação com prováveis proteínas de planta, sendo que quando este mesmo gel foi submetido ao ‘Western blot’, houve reação do antissoro (policlonal para o isolado BR11) com algumas bandas destas prováveis proteínas da planta hospedeira, não havendo uma reação específica mais evidente com nenhuma banda de tamanho esperado para vírus de plantas (dados não mostrados). Pode ser verificada através

deste teste uma grande inespecificidade do antissoro produzido para o isolado de LeMoV BR11.

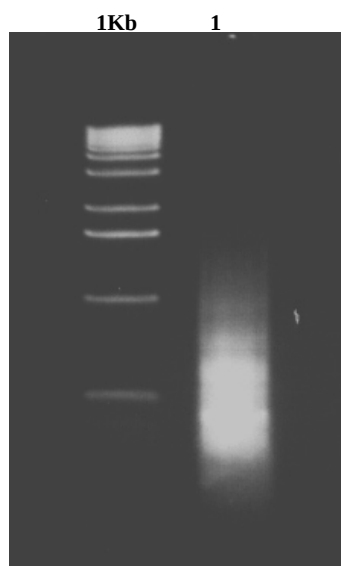


Figura 5: DOP-PCR com o oligonucleotídeo DOP6, após a extração do RNA fita dupla do LeMoV. Na linha 1 podemos observar a presença de bandas de diferentes tamanhos.

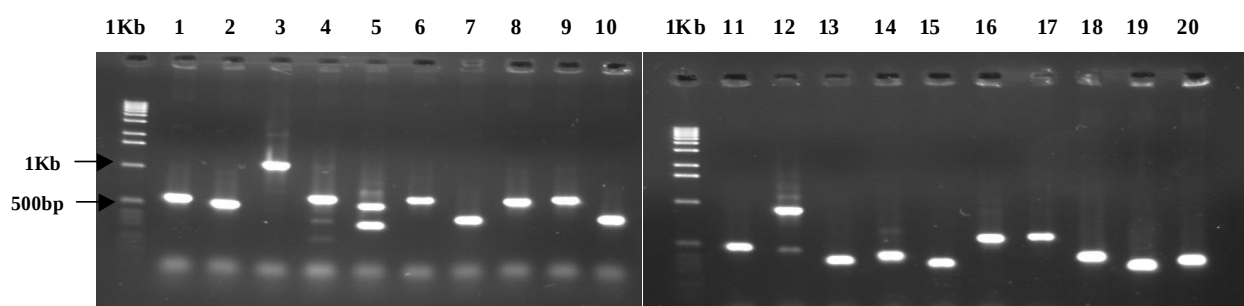


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando os 20 produtos da PCR após clonagem. Os clones 1, 2, 3, 7, 11, 12, 16, 18, 19 e 20 foram enviados para sequenciamento.

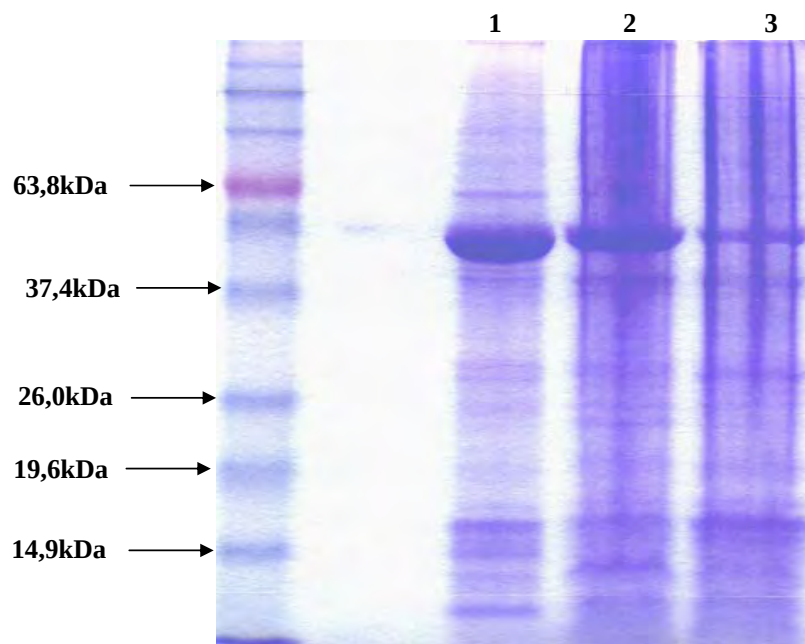


Figura 7: Gel de poliacrilamida de soluções minipurificadas após eletroforese e coloração com 'comassie blue'. (Linha 1) *C. quinoa* sadia; (Linha 2) LeMoV; (Linha 3) DaYMV.

Nos ensaios de microscopia eletrônica utilizando soluções virais mini-purificadas, foi possível observar algumas prováveis partículas do LeMoV (Figura 8) e do DaYMV, evidenciando uma baixíssima concentração das soluções mini-purificadas. Uma extração de RNA também foi realizada a partir do mini-purificado viral dos dois vírus, porém o teste de RT-PCR com os oligonucleotídeos degenerados para família *Sequiviridae* (Seq1s, Seq2s, Seq3aS e Seq4aS) não amplificou nenhum produto (dados não mostrados).

O protocolo de purificação do CMV, descrito por Lot *et al.*, (1992) foi o primeiro protocolo de purificação a ser utilizado, devido às características morfológicas da partícula do CMV serem parecidas às do LeMoV e do DaYMV. A modificação mais marcante foi no que diz respeito ao gradiente, já que no protocolo original utiliza-se um gradiente de sacarose e foi realizado um gradiente de cloreto de cério na tentativa de separar as partículas virais. As soluções semi-purificadas (antes do gradiente) foram examinadas em ensaios de microscopia eletrônica, onde foram observadas, com muita dificuldade, uma ou outra provável partícula viral e em teste de infectividade, onde sintomas de lesões locais foram observados de 4-5 dias em plantas de *C. quinoa*, seguidos pelos sintomas sistêmicos característicos de cada um dos vírus nesta espécie de planta (dados não mostrados). Com estes resultados pode-se confirmar que até a etapa que antecede o gradiente, ainda havia partículas virais e capazes de causar infecção. Para a etapa seguinte, o gradiente de cloreto de cério foi preparado a 40% (p/p), de acordo com uma tabela de conversão (Tabela 5) baseada na 'buoyant density' de 1,42g/ml, descrita para o DaYMV por Bos *et al.*, (1983). Entretanto, após gradiente, nenhuma banda foi observada e portanto, 23 aliquotas de

aproximadamente 500 μ l foram coletadas com a ajuda de uma bomba peristáltica e analisadas através de espectrofotometria e refratômetria (Tabela 6).

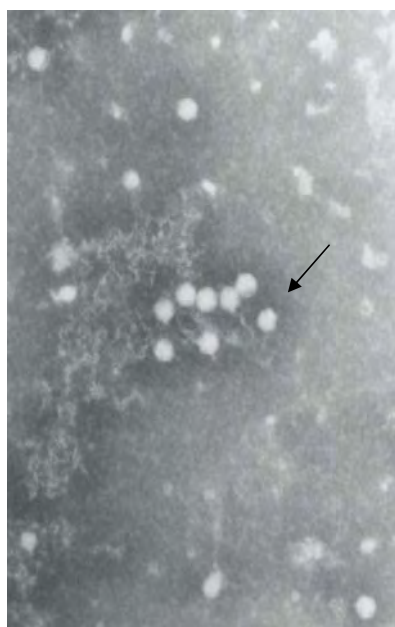


Figura 8: Micrografia eletrônica mostrando agregado de prováveis partículas do LeMoV após mini-purificação. Aumento de 73.000x.

Tabela 5: Conversão em densidade para gradientes de Césio.

% p/p	CsCl	CsBr	CsI	Cs ₂ SO ₄	CsNO ₃
1	1,00593	1.00612	1,00608	1,0061	1,00566
2	1,01374	1.01412	1,01402	1,0144	1,01319
4	1,02969	1.03048	1,03029	1,0316	1,02859
6	1,04609	1.04737	1,04707	1,0494	1,04443
8	1,06297	1.06472	1,06438	1,0676	1,06072
10	1,08036	1.08265	1,08225	1,0870	1,07745
12	1,09828	1.10116	1.10071	1.1071	1,09463
14	1.11676	1.12029	1.11979	1,1275	1,11227
16	1.13582	1.14007	1,13953	1,1484	
18	1.15549	1,16053	1,15996	1,1696	
20	1.17580	1,18107	1,18112	1,1913	
22	1.19679	1,20362	1,20305	1,2137	
24	1.21849	1,22634	1,22580	1,2375	
26	1.24093	1,24990	1,24942	1,2643	
28	1.26414	1,27435	1,27395		
30	1.28817	1,29973	1,29944		
35	1.35218	1,36764	1,36776		
40	1.42245	1.44275	1,44354		
45	1,49993	1,52626	1,52803		
50	1,58575	1,61970	1,62278		
55	1,68137	1,72492			
60	1.78859				
65	1.90966				

Tabela 6: Leituras em refratômetro e espectrofotômetro das alíquotas recolhidas do gradiente de CsCl.

Alíquota	%CsCl	Leitura 260 nm	Leitura 280 nm	260/280 nm
1	30,00	3,059	1,761	1,737
2	30,00	3,131	1,960	1,597
3	29,20	3,192	2,550	1,252
4	28,20	2,201	1,129	1,950
5	27,40	1,515	0,776	1,952
6	26,80	1,196	0,621	1,926
7	26,40	1,034	0,548	1,887
8	26,00	0,916	0,496	1,847
9	25,60	0,846	0,469	1,804
10	25,00	0,780	0,445	1,753
11	24,60	0,716	0,417	1,717
12	24,20	0,715	0,429	1,667
13	23,80	0,683	0,424	1,611
14	23,40	0,678	0,438	1,548
15	23,00	0,664	0,450	1,476
16	22,80	0,715	0,500	1,430
17	22,40	0,644	0,488	1,320
18	21,00	0,654	0,530	1,234
19	21,60	0,698	0,640	1,091
20	21,40	0,790	0,886	0,892
21	21,00	1,222	1,896	0,645
22	21,00	3,140	3,042	1,303
23	22,00	3,342	3,333	1,005

Os ensaios de microscopia eletrônica foram realizados em todas as 23 aliquotas, já que não havia picos de absorção característicos de poliproteína. Em todas as aliquotas analisadas pôde ser observada a presença de prováveis partículas (Figura 9), mostrando que o gradiente utilizado não foi eficaz, fazendo com que houvesse prováveis partículas virais espalhadas por todo o gradiente e em baixíssima concentração.

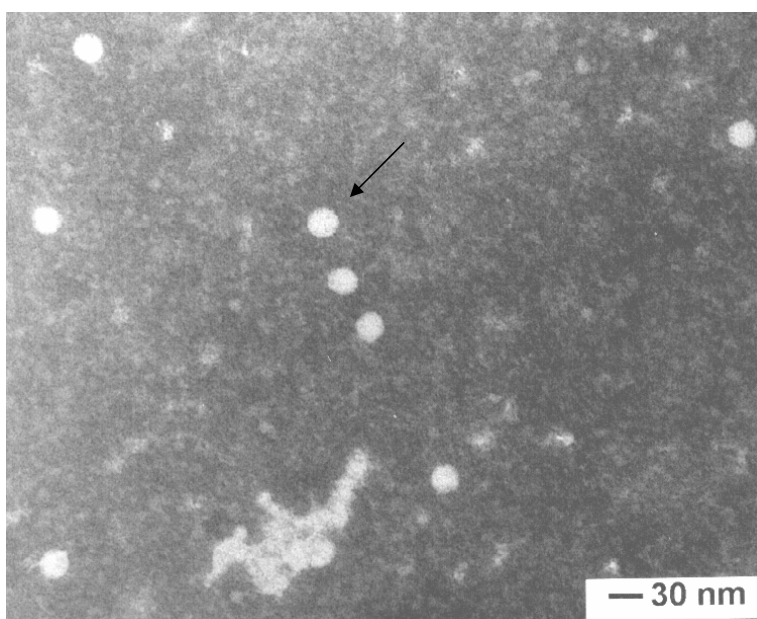


Figura 9: Micrografia eletrônica da aliquota 15 mostrando prováveis partículas do LeMoV após purificação em gradiente de cloreto de cério. **Bar = 30nm**

Quando algumas das aliquotas do purificado viral, tanto do LeMoV como do DaYMV foram analisadas em gel de poliacrilamida, apenas 2 bandas foram observadas, com tamanhos estimados em aproximadamente 60kDa e 50kDa (dados não mostrados), entretanto estas duas bandas não foram visualizadas em 'Western blot' quando utilizado o antissoro específico para o isolado LeMoV BR11 (dados não mostrados). Estas mesmas aliquotas foram submetidas à extração de RNA e RT-PCR com os oligonucleotídeos degenerados para família *Sequiviridae*, porém, nenhum produto foi amplificado, evidenciando a ineficiência do processo de purificação utilizado (dados não mostrados). Como para o gênero nepovírus é descrita a possibilidade de haver uma ou duas proteína capsidiais de aproximadamente 50-60kDa (Brunt *et al.*, 1996b) e como estes também são vírus isométricos que dependendo da espécie podem infectar alface, um protocolo de purificação do TBRV que utiliza *n*-butanol e clorofórmio na clarificação, precipitação com PEG-6000 e gradiente de sacarose a 40%, foi utilizado. Após gradiente de sacarose e análise através do aparelho de leitura ISCO, nenhum pico de absorbância foi detectado e nenhuma alíquota contendo prováveis partículas virais do LeMoV e do DaYMV foram recuperadas. Como no teste de infectividade realizado antes do gradiente de sacarose, as plantas de *C. quinoa* inoculadas com soluções semi-purificadas dos dois vírus mostraram sintomas locais característicos após 4 dias da inoculação, seguido por sintomas sistêmicos, a perda do vírus provavelmente ocorreu durante o gradiente realizado.

O protocolo de purificação do sequivírus PYFV, descrito por Hemida e Murant (1989) foi utilizado modificando-se alguns detalhes para viabilizar o protocolo, como aumento da quantidade de tampão utilizado na etapa de extração e alterações de velocidades e tempos em algumas centrifugações. Este é um protocolo longo e trabalhoso

que utiliza *n*-butanol na clarificação, PEG6000 para precipitação e sucessivas centrifugações diferenciais, com adição de uma solução de sacarose a 20%. Um gradiente de sacarose a 40% foi realizado e a análise através do aparelho ISCO foi realizada, sendo que nenhum pico de absorbância foi detectado durante coleta das alíquotas do gradiente pelo aparelho. No teste de infectividade realizado antes do gradiente, utilizando as soluções semi-purificadas do LeMoV e do DaYMV, as plantas não mostraram sintomas. Os resultados sugeriram que o vírus foi perdido durante o processo de purificação e possivelmente antes do gradiente de sacarose, provavelmente devido às sucessivas centrifugações diferenciais que envolviam a diluição destes vírus que já são encontrados inicialmente, em baixas concentrações na planta hospedeira.

Os protocolos utilizados na purificação do DaYMV-Ls2 (Bos *et al.*, 1983) e do isolado LeMoV BR11 foram realizados paralelamente, sendo que o protocolo de Bos *et al.*, (1983) foi modificado, otimizado com algumas etapas do protocolo de purificação do isolado BR11 e determinado como o protocolo de purificação do LeMoV-AF197 e do DaYMV-DSM2, chegando-se ao melhor método de purificação do para estes dois isolados virais. No protocolo original de purificação do DaYMV a modificação mais importante foi o uso do PEG6000 para precipitação viral, em contraste com etapas de centrifugações diferenciais. Com isto, pôde-se reduzir bastante o volume a ser ultracentrifugado, o que viabilizou muito o processo de purificação, sem prejudicar o rendimento final. O uso do *n*-butanol prevaleceu ao uso de clorofórmio utilizado na purificação do isolado BR11, já que o rendimento final foi maior. Para ambos os vírus, uma única banda foi observada após centrifugação isopícnica em gradiente de sulfato de cézio. A fração viral pôde ser visualizada e recuperada perfurando-se o tubo em direção à banda viral,

com a ajuda de uma seringa (Figura 10). Após gradiente, o vírus foi concentrado por ultracentrifugação, como realizado para o isolado BR11, substituindo a etapa de diálise utilizada por Bos *et al.* (1983).

Preparações purificadas do LeMoV e do DaYMV foram analisadas por absorção ultravioleta, mostrando valores típicos de uma nucleoproteína (Figura 11). A razão A_{260}/A_{280} de 1,9 foi obtida para ambos os vírus, para preparações virais purificadas resultantes de quatro purificações independentes, sugerindo que este valor seja característico de vírus e não de materiais contaminantes da planta. Este mesmo valor de $A_{260}/A_{280} = 1,9$ foi também encontrado para dois isolados do sequivírus PYFV por Hemida & Murant (1989).

As concentrações das partículas virais foram determinadas assumindo que o coeficiente de extinção a 260nm fosse igual a 12 cm^{-1} para ambos os vírus, baseado nos valores obtidos para a razão A_{260}/A_{280} (Gibbs & Harrison, 1976). O rendimento estimado da purificação para 100g de folhas foi de 1mg para ambos os vírus, sendo que o rendimento após a concentração viral (protocolo de purificação do isolado BR11) foi 20x maior do que quando as frações eram submetidas à diálise (Bos *et al.*, 1983).

Em testes de infectividade realizados antes e após o gradiente de césio, as plantas inoculadas mostraram sintomas locais após 3 dias da inoculação, seguido de sintomas sistêmicos, para ambos os vírus.

Quando examinadas em ensaios de microscopia eletrônica, alíquotas purificadas de LeMoV continham dois tipos esféricos de partículas, com 28-30nm de diâmetro: partículas cheias (não infiltradas pelo contrastante) e vazias (infiltradas) (Figura 12). Após ultracentrifugação isopícnica em gradiente de sulfato de césio, partículas vazias ou

chamadas 'componente T' não foram observadas para o LeMoV e para o DaYMV, como também não foram observadas por Bos *et al.* (1983) para o isolado Ls2 do DaYMV. Entretanto, uma observação importante foi a da formação de 2 bandas após o gradiente de sulfato de cézio, tanto para o LeMoV como para o DaYMV, quando a clarificação era realizada com clorofórmio, mostrando que o tipo de reagente utilizado na clarificação pode influenciar em se obter uma ou duas bandas após o gradiente de cézio, como descrito por Hemida & Murant (1989) na purificação de um isolado do PYFV.

Comentário: acho que isso voce não precisa colocar

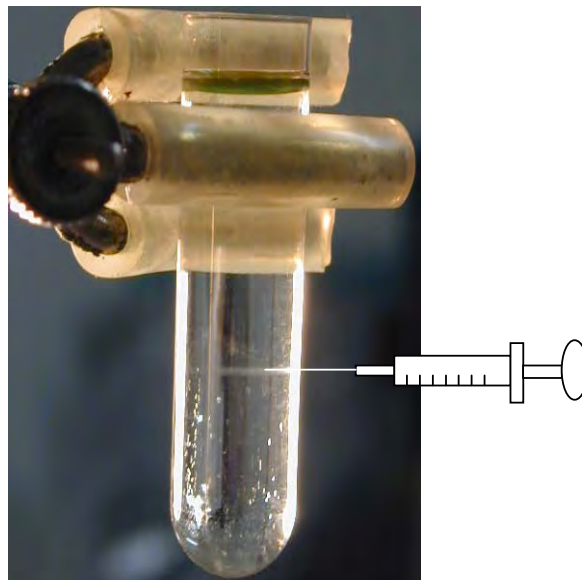


Figura 10: Recuperação da banda viral após centrifugação isopícnica em solução de sulfato de cézio, perfurando o tubo em direção à banda viral, com a ajuda de uma seringa.

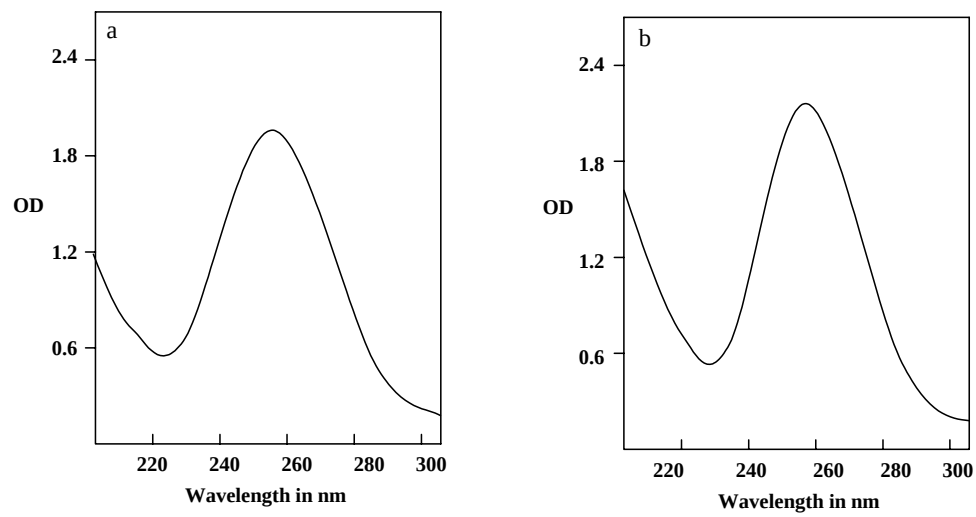


Figura 11: Espectrofotometria da preparação viral purificada após gradiente de sulfato de céσιο. (a) LeMoV e (b) DaYMV.

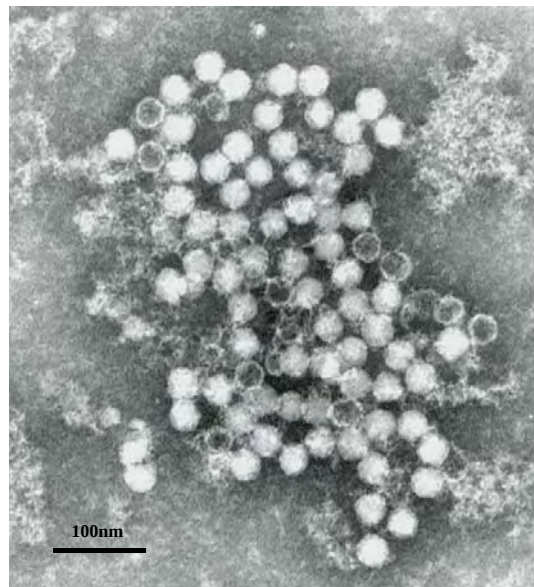


Figura 12: Micrografia eletrônica da preparação viral purificada do LeMoV, contrastada com PTA 1%, pH6,5, mostrando um agregado de presumíveis partículas virais. **Bar = 100nm**

O RNA do LeMoV foi extraído e uma única banda em torno de 9-10Kb pôde ser visualizada após eletroforese em condições desnaturantes (dados não mostrados), como pode ser observado para os RNAs dos isolados de LeMoV BR11 e 2227 que foram extraídos e visualizados em gel de agarose em condições desnaturantes (Figura 13, cedida por Hérve Lot-INRA, Avignon).

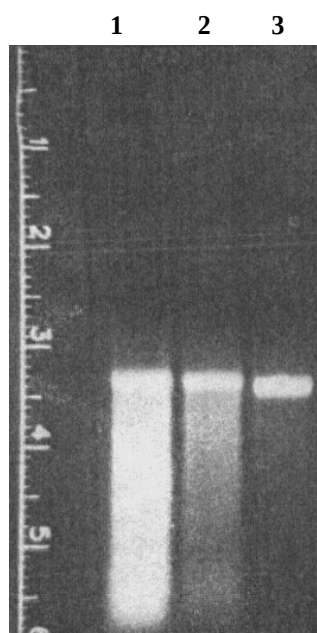


Figura 13: Gel de RNA em condições desnaturantes. (Linha 1) isolado BR11; (Linha 2) isolado 2227; (Linha 3) *Zucchini yellow mosaic potyvirus* (ZYMV) utilizado como controle do gel.

As proteínas virais do LeMoV-197 e do DaYMV-DSM2 foram analisadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e 3 proteínas capsidiais puderam ser visualizadas, com pesos moleculares estimados em 33, 31 e 28kDa para o DaYMV (Figura 14a) e 28-32, 28-30 e 24-27 para o LeMoV (Figura 14b), sendo que nos dois casos houve contaminações com proteínas menores de aproximadamente 12-18kDa.

RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados: O RNA extraído a partir de preparações purificadas do LeMoV e do DaYMV foi utilizado em RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados desenhados para a família *Sequiviridae* (Tabela1, Figura 2). As combinações Seq1s/Seq3aS e Seq1s/Seq4aS, não amplificaram os fragmentos com tamanhos esperados, entretanto a combinação Seq2s/Seq4aS, amplificou um fragmento de 127bp para ambos os vírus (Figura 15).

Os fragmentos foram e suas sequências foram analisadas pelo programa 'NCBI-BLAST'. Os fragmentos de 127bp amplificados do LeMoV e do DaYMV mostraram maior identidade de sequência com membros da família *Sequiviridae*. Para LeMoV foi verificada uma identidade de aminoácidos de 71% com *Parsnip yellows fleck virus* (PYFV) e de 63% com *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV); enquanto que para o DaYMV esta identidade de aminoácidos foi de 73% com PYFV. Entre os dois vírus a homologia foi de 80%. Estes resultados demonstraram que o LeMoV é um possível membro da família *Sequiviride*, gênero *Sequivirus* e confirmaram molecularmente a classificação do DaYMV como membro do gênero *Sequivirus*. As sequências de 127bp da proteína replicase obtidas para o LeMoV e para o DaYMV foram alinhadas entre si e com outros sequivírus para verificarmos a homologia entre estes dois vírus e também destes vírus com os outros membros

da família *Sequiviridae*. As seqüências nucleotídicas e protéicas foram analisadas usando programa 'CLUSTAL X' (Figura 16) e a árvore filogenética pelo 'TreeView' (Figura 17).

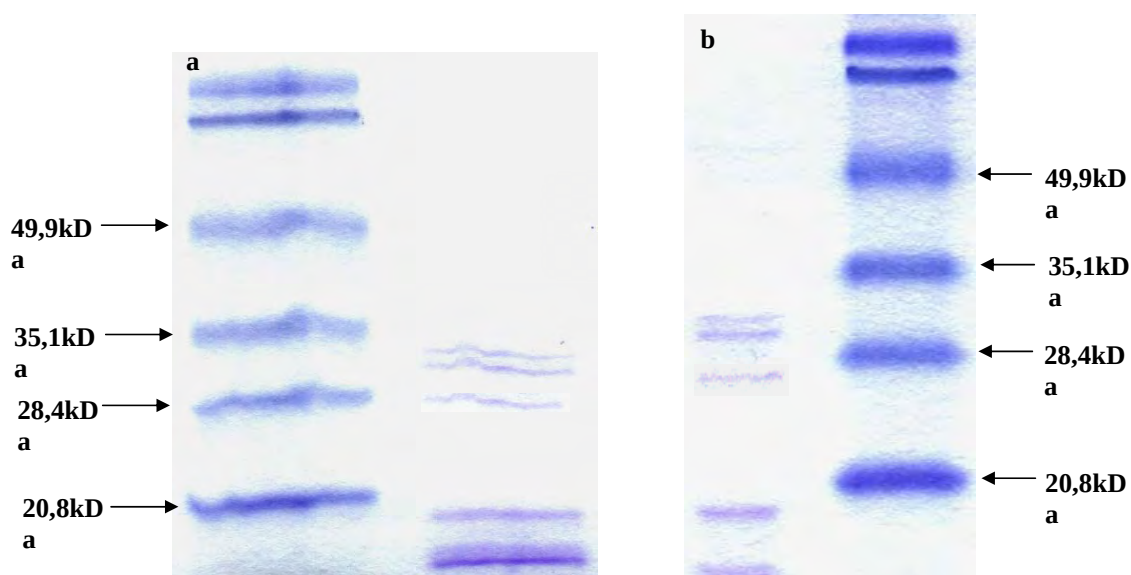


Figura 14: Gel de poliacrilamida de soluções virais purificadas pelo protocolo de Bos *et al.*, modificado. (a) DaYMV: Proteínas de pesos moleculares estimados em 33, 31 e 28kDa. (b) LeMoV: Proteínas de pesos moleculares estimados em 28-32, 28-30 e 24-27kDa.

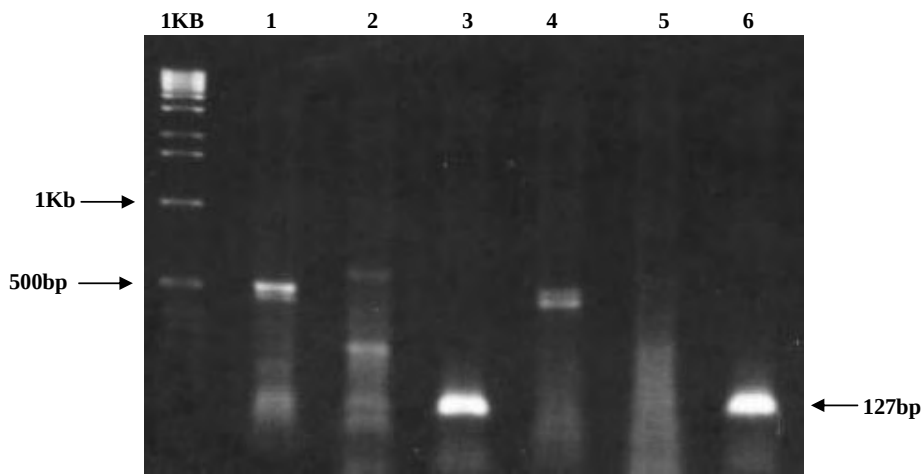


Figura 15: RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados Seq1s, Seq2s, Seq3aS e Seq4aS e RNA extraído a partir de soluções purificadas do LeMoV e do DaYMV. (Linha 1) LeMoV-Seq1s/Seq4aS; (Linha 2) LeMoV-Seq1s/Seq3aS; (Linha 3) LeMoV-Seq2s/Seq4aS; (Linha 4) DaYMV-Seq1s/Seq4aS; (Linha 5) DaYMV-Seq1s/Seq3aS; (Linha 6) DaYMV-Seq2s/Seq4aS.

DaYMV-DSM2	VIFNSYINLFYLSAWSHLATDNGRVDIQHPSFFKKYVRACV
PYFV	VIFNSFINLFYLQSAWIMLARFNQRQDISHPCNFPKYVRACV
LeMoV-AF197	VIFNSFINLFYLQAAWIQLAKEHGRSDIAHPCFYKKFVRAYV
RTSV	VIFNSFVNYYYFMALAWMSTVGSSLLSPQGSKDFDITYCKIVA
MCDV	VIFNSFVNYYYLAMAWMNLISHSPLSPQSTVRDFDNYCKVVV
	*****::* ::: ** : .: : .

Figura 16: Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente aos 127bp (putative replicase protein region) do Lettuce mottle virus (LeMoV-AF197) e do *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV-DSM2), com a região correspondente para cada um dos outros vírus da família *Sequiviridae*: *Rice tungro spherical virus* (RTSV) NC001632; *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) NC003626 e *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV) NC003628.

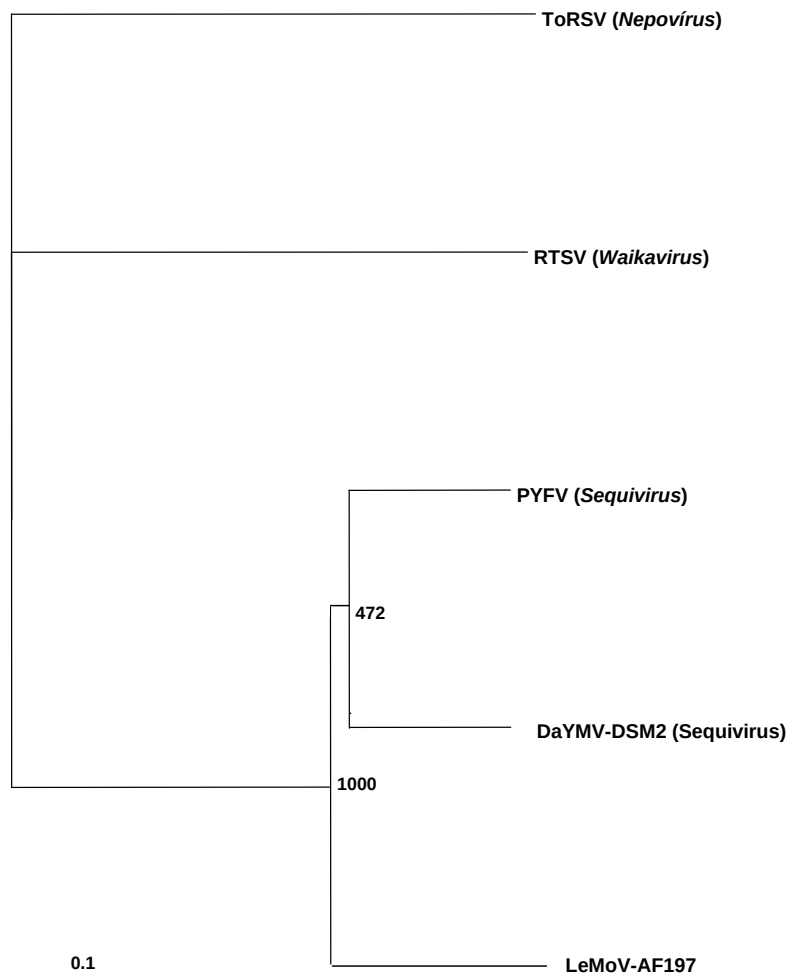


Figura 17: Árvore filogenética dos vírus : *Tomato ringspot virus* (ToRSV) RNA1 L19655; *Rice tungro spherical virus* (RTSV) NC001632; *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) NC003626; *Lettuce mottle virus* (LeMoV); *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV) NC003628 e *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV), usando o programa 'TreeView' (1000 bootstrap trials).

Para continuar o sequenciamento, outros oligonucleotídeos degenerados para a família *Sequiviridae* foram desenhados na região da replicase viral (Seq5s, Seq6s, Seq7s, Seq8s, Seq9aS) e utilizados em teste de RT-PCR juntamente com os oligonucleotídeos já existentes Seq2 e Seq4. Fragmentos de diferentes tamanhos puderam ser amplificados, clonados e sequenciados. Todas as combinações de oligonucleotídeos testadas amplificaram fragmentos de tamanhos esperados, tanto para o LeMoV (Figura 18a) como para o DaYMV (Figura 18b), com exceção da combinação Seq7s/Seq2aS e Seq4s/Seq9aS, que não amplificaram os fragmentos de tamanho esperado para o DaYMV, a combinação Seq2s/Seq9aS que não amplificou fragmento de tamanho esperado para o LeMoV e as combinações Seq5/Seq2aS, Seq8/Seq2aS, Seq6/Seq2aS que não amplificaram fragmentos de tamanhos esperados para ambos os vírus. As sequências destes fragmentos foram determinadas e comparadas para se determinar uma única sequência para cada vírus (Tabela 7). Para a combinação Seq6s/Seq4aS, utilizada para o DaYMV, dois clones de tamanho esperado foram escolhidos (Figura 19) e enviados para sequenciamento. Quando a análise das sequências foi realizada pelo programa 'NCBI-BLAST', um dos clones correspondia ao fragmento da região da replicase viral como já descrito e o outro que deveria ser igual ou complementar correspondia na verdade a um fragmento de mesmo tamanho, entretanto na região da proteína capsidial, mostrando uma identidade de sequências de 16% com o RTSV e 45% com o PYFV. O fato dos oligonucleotídeos utilizados possuírem um alto grau de degeneração, foi atribuído à amplificação de dois fragmentos de regiões diferentes do genoma do DaYMV, por um mesmo par destes oligonucleotídeos.

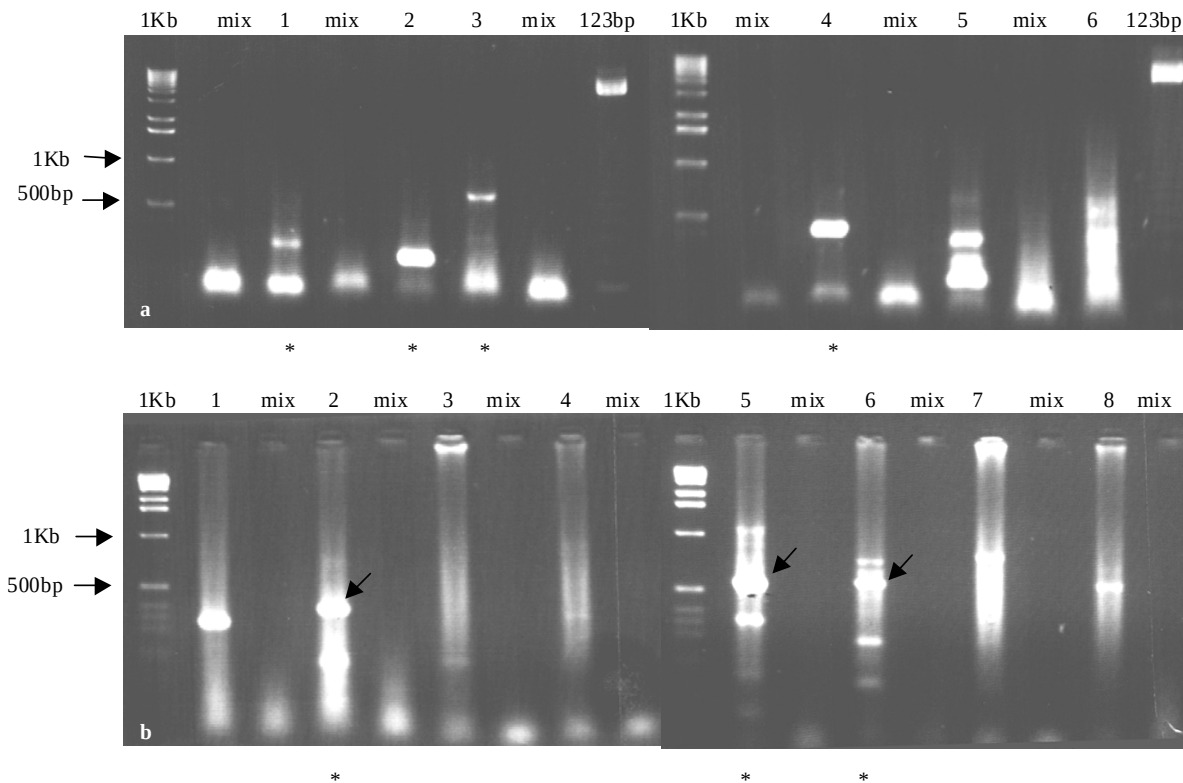


Figura 18: RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados para família *Sequiviridae* e RNA extraído de soluções purificadas. **Figura 18 (a)** LeMoV: (Linha 1) Seq4s/Seq9aS, (Linha 2) Seq5s/Seq2aS), (Linha3) Seq7s/Seq2aS, (Linha 4) Seq6s/Seq2aS, (Linha5) Seq2s/Seq9aS, (Linha 6) Seq8s/Seq2aS. **Figura 18 (b)** DaYMV: (Linha 1) Seq6s/Seq2aS, (Linha 2) Seq2s/Seq9aS, (Linha3) S2q7s/Seq2aS, (Linha 4) Seq5s/Seq2aS, (Linha5) Seq5s/Seq9aS, (Linha 6) Seq6s/Seq4aS, (Linha 7) Seq8s/Seq2aS, (Linha 8) Seq4s/Seq9aS. * Fragmentos de tamanhos esperados. Os fragmentos indicados pelas setas foram cortados do gel antes de serem purificados e clonados.

Tabela 7: Sequências nucleotídicas do LeMoV-AF197 e do DaYMV-DSM2, obtidas a partir dos oligonucleotídeos degenerados Seq2, Seq4, Seq5, Seq6, Seq7, Seq8 e Seq9 e as posições equivalentes na região da replicase viral do PYFV.

Vírus	Sequências nucleotídicas	Posição 5' - 3'
LeMoV-AF197	ATGGTGCTGAGTATTATGAGAGCATTAACATGAGCACTAGTGAGGAGTATCCTTTGATTT TGAAGAGACCCTCAGATGCGGATGGGAAGAAGTGGTTGTTTGACTTTGATGAGAGCACGG GGAAATTCGCATGGCCAATGCAGATCTTGTGAGAACTATGAGGCTTGTGGCGCTGCCT ATCCAAATTGCACCCAATCCCTTTGATCTGCATCGAGAGTCCCAAAGATGAAAGAAGAGC CTTAAAAAAGATATACACGGAACCCAAACTAGGCCTTTCTCCATATTGCCTGTGGAGTT CAACATGCACGCCAGACGGCTCTATCTTGATTTTAATGTGGTTACCATGGCGAACAGACA AAGCATGGTATAATGGTTGGCATAAACCCCCACTCCCGCGAATGGACAGAGCTGGCTCT AGGCCTTGCATCCTTTTACCAATAGGGTTCAATGGCGACTTTGCGAACTTTGATGGTAT GTTTCACCCCGATGCTTTGACATGGTGTGCGATCTAGCTAACAAATCTATGGCGACAG CAGAGGGGCCGAGCGGAATGTCTCACGGAAGCTCTTACCAACAGACTATCTCTCGTCAA AGGTTCCGTTCTAAGCATTGGAGGAGGGGGCCCTCAGGATTTCCCATGACCGTGATCTT CAACTCTTTTCAATTAACCTCTTCTATTTGCAGGCAGCGTGGATCCAGTTGGCCAAAGAACA CGGACGAAGTGACATTGCCCATCCTTGCTTTTACAAAAAATTTGTGCGAGCGTACGTCTA CGGTGATGACAACATTGTTAGCATTAAGGAGGAAGTAATTTTCATGGTACAATCTCTGCAC AGTCTCCTCCTTTCTTAAGGATGCTTTTGGTGTAACGATGACGAATGGGGAGAAAAATCA AGCGCATCTAGCAAAACCATATGGAAACATTCCGGAGTTTGACTTCCTTAAAGAGGATT TCTCGCTGACACGCAGATACCTTCCTTGTCCATGCTCCCTTAAATAGGACTAGTATC	7348-8402
DaYMV-DSM2	AAAGGCGAACATTGAAGAAGATATACAACGATCCCAAAACAAGGCTCTTCTCCATTCTAC CTGTTGAATTCAACATGCACGCCAGAAGGTTGTACCTAGACTTCAATGTTCTAACAATGG CAAATCGACATAAGCACGGAATTATGGTTGGAATAAATCCACATTCGAGGGAGTGGACAG AAATGGCTATCTCTTTGGCCTCTTTTTCTCCTCTCGGTTTCAATGGTGACTTCGCTAACT TTGACGGAATGTTCCACCCAGATTCCCTTGTCTATGGTGGAGGAGTTAGCCACCTACTTTT ACAGAGGACCACACTGCATTGGATAGGAAAACCTCACAGAATCGTTGACGAACAGGTTG TCCCTTGTCAAGGGAGCGGTGTTGAGTATTGGAGGAGGGGGTCTTCAGGATTTCTATG ACAGTCATTTTTAACTCATACATTAACCTTGTCTATCTAATGAGTGCCTGGTCCCACCTC GCAACCGACAATGGCAGAGTGGACATACAACCCATCTTTCTTCAAGAAGTACGTGAGA GCTTGCGTCTATGGAGACGACAATATCGTGAGTATAAAGGAGGAGGTTATATCGTGGTAC AATTTGTGCTCAGTATCCGACTTCCTTAAAAAAGCATTTGGTGTCAACCATGACGGATGGG GAGAAAAACGAAGCACATCTGGCCAAACCTTATGGGAAAATTCTAGAATTTGACTTTCTC AAGAGAGGCTTCTTTCCAGACTCCAGATCCCTTCTTGTTCACGCCCATTTGAACAAA GTCAGCATT	7614-8403

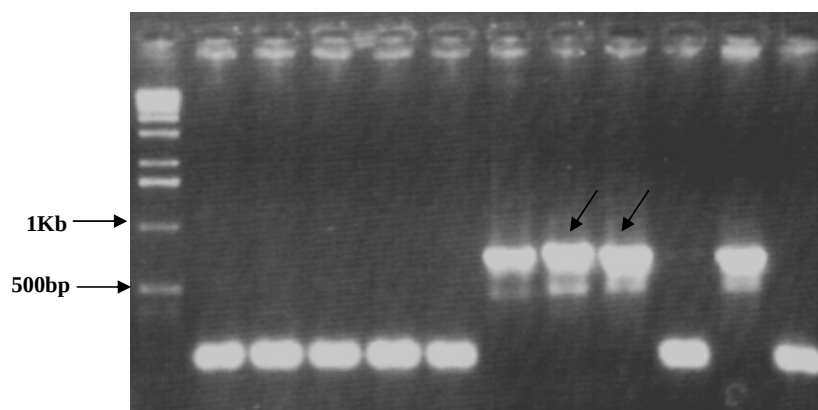


Figura 19: Produtos de clonagem do fragmento de aproximadamente 590bp amplificado em RT-PCR com o par de oligonucleotídeos Seq6s/Seq4aS e RNA do DaYMV. Os dois clones indicados pelas setas foram enviados para sequenciamento.

O alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente à capa protéica do DaYMV e do PYFV foi realizado (Figura 20) e um par de oligonucleotídeos degenerados (capDL1s/capDL2aS) foi desenhado (Tabela 1, Figura 2) para amplificação em RT-PCR de um fragmento de aproximadamente 200bp na mesma região, do LeMoV (Figura 21). Este fragmento amplificado na região da proteína capsidial do LeMoV foi clonado e sua sequência analisada (Figura 22), mostrando identidade deduzida de 6% com o RTSV, 48% com o PYFV e 75% com o DaYMV. A árvore filogenética foi construída e pode ser observada na figura 23.

RT-PCR com oligonucleotídeos universais para

LeMoV/DaYMV: Com o alinhamento das sequências obtidas na replicase do LeMoV e do DaYMV, um par de oligonucleotídeos DALE1s/DALE2aS foram desenhados para detecção em RT-PCR de ambos os vírus, amplificando com sucesso um fragmento de aproximadamente 600bp para o LeMoV, para o DaYMV e para outros 3 isolados de supostos sequivírus: os isolados BR11, Ch36 (Figura 24a) e 2227 (Figura 24b). Os fragmentos de aproximadamente 600bp amplificados, foram clonados, sequenciados e analisados. As sequências nucleotídica e de aminoácidos foram analisadas e um alinhamento das sequências de aminoácidos foi realizado (Figura 25). As análises destas sequências mostraram alta identidade com membros da família *Sequiviridae* (Tabela 8), e mais especificamente com o PYFV, o único membro do gênero *Sequivirus* com sequência completa disponível até o momento (Turnbull-Ross *et al.*, 1993).

```

PYFV      GKNLRIGVAQASIQNTKDDSTPYSLADFVQDGPVVASLESFMSSPSISQTLPLINDQ
DSM2      CQSLRIGIARSGITTELDRETHPVTDVFQDSEIEPVKAKLEAFMNKPDVGSTIDAYERQ
           :.****.*:.*. *: * .:.*:****. * ** *.**:*:*..*.: : *

PYFV      FTRPIYSRTFEWKATDTVGASIFQLELPGDVVGPQASSLFSDTMQRAFCFSSDFELSILL
DSM2      FTRPIYDNTIEWKSTDAPGDVILALESPGDFMSTHA--LFGQFVKRAFCFKADFEFNVMI
           *****.:**:*:*: * *: ** ***.:.* * *: :*****:***:..:

PYFV      TGNESYMGALKIVTDQLRRFHEAKQDDARVFHSMGPRTVFAKDSGDKIPIEFMSIHKAV
DSM2      SGNEAYSGAIKVCIDHMRRLYEADGNDSLVIYHSMGDTMHASDTNGISFVVPFNSIHNI
           :***:* ***: *:***:*. :*: *:*:* *:.*.*:*: : : * ***: :

PYFV      S
DSM2      S
           *

```

Figura 20: Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente aos 543bp na região da proteína capsial (CP1) do *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV), com a região correspondente do *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV) NC003628. Em destaque as duas regiões onde os oligonucleotídeos capDL1 e capDL2 foram desenhados.

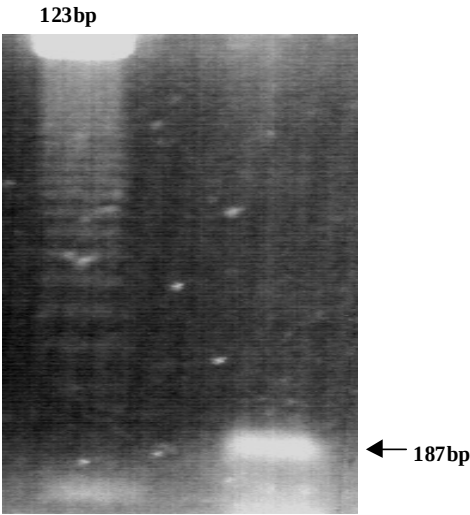


Figura 21: RT-PCR com o par de oligonucleotídeos capDL1s/capDL2aS e RNA do LeMoV extraído a partir de solução purificada. A seta indica o fragmento de aproximadamente 200bp amplificado na região da proteína capsial.

DaYMV-DSM2	STDAPGDVILALESPGDFMS---THALFGQFVKRAFCFKADFEFNV	MISGNEAYSGAIKVCIDHM
LeMoV-AF197	TYHDVGAEVFALENPGDFMG---TPSLFGQFVKRAFCFKADFEVN	IMISGNEAFSGAIKVCVDHM
PYFV	ATDTVGASIFQLELPGDVVGP-QASSLFS	DTMQRAFCSSDFELSILLTGNESYMGALKIVTDQL
RTSV	VSDGGGSILKTFSLPSDIWAANDRMKNFLSYFQYYTCEG	MTFTLTITSIG--LHGGTLLVAWDAL
	. * : :. *. .	* . : * * ..: * . *:: : * :

Figura 22: Alinhamento das sequências de aminiácidos correspondente aos 186bp na região da proteína capsial (CP1) do Lettuce mottle virus (LeMoV), *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV), com a região correspondente do *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV-NC_003628) e do *Rice tungro spherical virus* (RTSV- NC_001632).

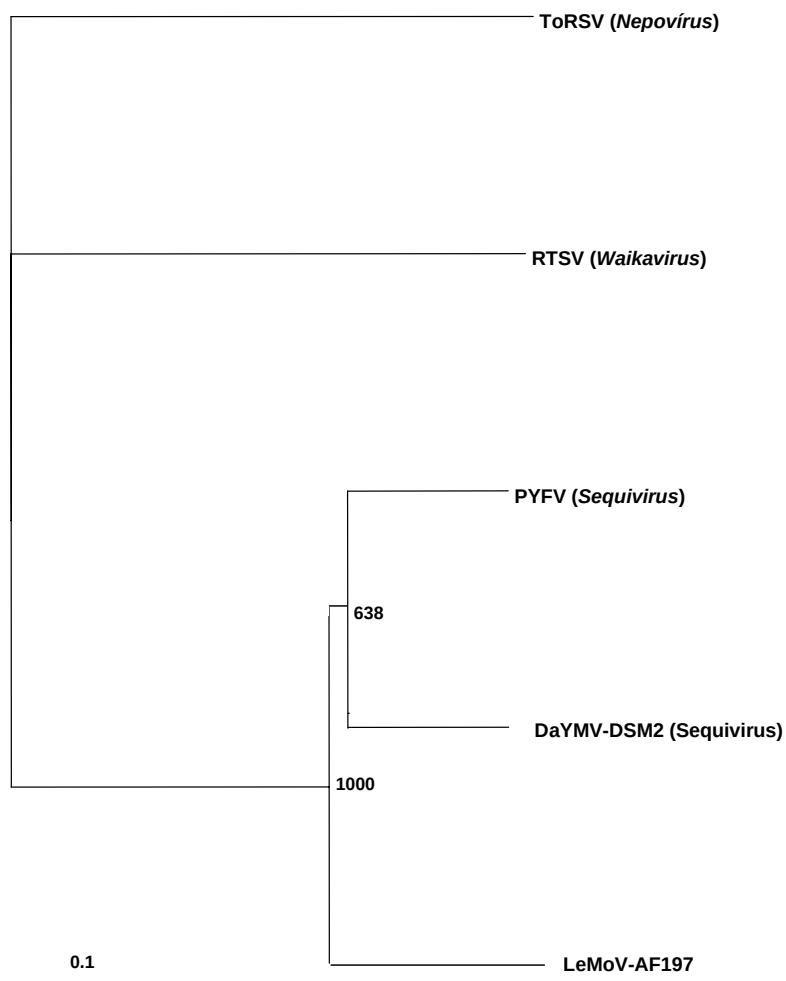


Figura 23: Árvore filogenética dos vírus : *Tomato ringspot virus* (ToRSV) RNA1 L19655; *Rice tungro spherical virus* (RTSV) NC001632; *Lettuce mottle virus* (LeMoV-AF197); *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV) NC003628 e *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV-DSM2), correspondente aos 186bp amplificados na região da capa protéica, usando o programa 'TreeView' (1000 bootstrap trials).

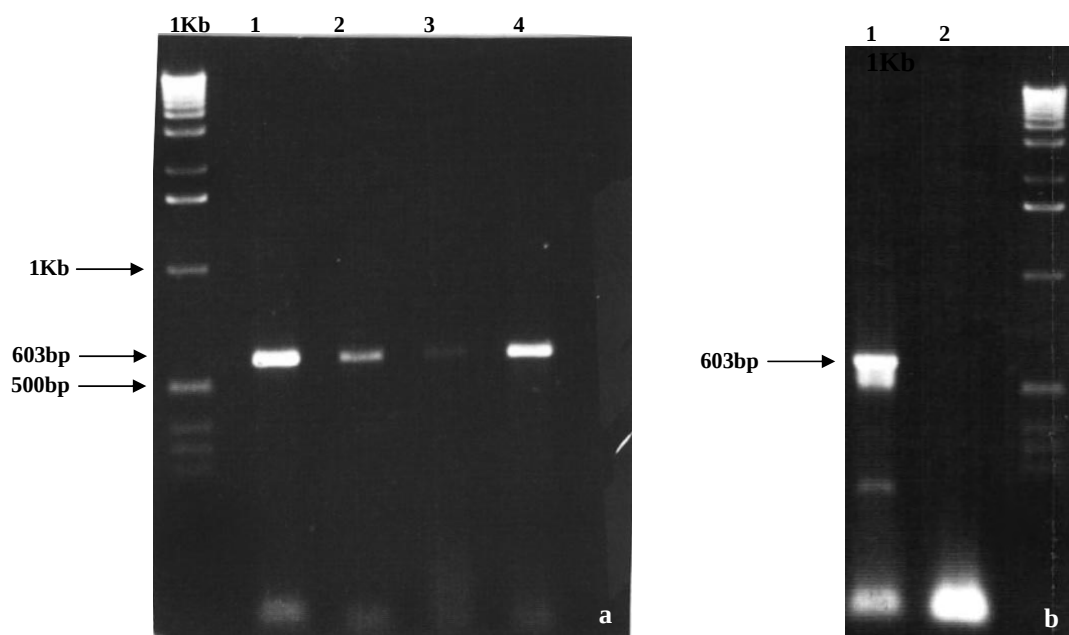


Figura 24: RT-PCR com os oligonucleotídeos DALE1/DALE2 e RNA extraído a partir de preparações purificadas. (a) DaYMV (Linha1), LeMoV (Linha2), isolado Ch36 (Linha3) e isolado BR11 (Linha4). (b) isolado 2227 (Linha1) e controle da RT-PCR (Linha2).

Ch36	VTMANRHKHGIMVGINPHSREWTELALGLASFSPIGFNGDFANFDGMFHPDAFEMVCDLANKFYGD--SRGPERKCLTEALTNRLSLIKGSVLSIGGGGPSGFPMT
2227a	VTMANRHKHGIMVGINPHSREWTELALGLASFSPVGFNDFANFDGMFHPDAFEMVCDLANKFYGD--SRGPERKCLTEALTNRLSLVKGSVLSIGGGGPSGFPMT
LeMoV	VTMANRHKHGIMVGINPHSREWTELALGLASFSPIGFNGDFANFDGMFHPDAFDMVCDLANKFYGD--SRGAERKCLTEALTNRLSLVKGSVLSIGGGGPSGFPMT
BR11	VTMANRHKHGIMVGINPHSREWTELALGLASFSPIGFNGDFANFDGMFHPDAFDMVCDLANKFYGD--SRGAERKCLTEALTNRLSLVKGSVLSIGGGGPSGFPMT
2227b	LTMANRHKHGIMVGINPHSREWTELALGLASFSPIGFNGDFANFDGMFHPDAFAMVGELANEFYGG--FLATERSTLTDLTNRLSLVKGAVLSIGGGGPSGFPMT
DaYMV - DSM2	LTMANRHKHGIMVGINPHSREWTEMAISLASFSPLGFNDFANFDGMFHPDSFAMVEELATYFYRG--HNALERKLTLESNTNRLSLVKGAVLSIGGGGPSGFPMT
PYFV	FVMANRHKHGIMVGINPHSREWSDLAISLASFSPLYGFNDFANFDGMFHPSSFSMVSELANIFYGN--FLSTERDNLTRMLTNRFSLMKGAILRVPGGGPSGFPMT
MCDV	MIMTNRSKLCQVGINPENMEWSDLMHEFLHKSTHGFAFDYSKFDGIGDPQIYHSITQVNNWYDDGEENARTRHALISSIIHREGIVKEYLFQYCQGMPSGFAMT
RTSV	MVMSTRREHFSQVGINPESMEWSDLINSLLRVNTKGFAGDYSKFDGIGSPAIIYHSIVNVVNAWYNDGEVNARARHSLISSIVHRDGICGDLILRYSQGMPSGFAMT
	. *:.* : *****.. **::: : .. ** **:::***: * : : :.. :.* . . * * : :* .: : : * ****,**
Ch36	VIFNSFINLFYLQAAWIQLAKEHGRDDIAHPCFYKKFVRAYVYGGDNIVSIKEEVISWYNLCTVSSFLKDA
2227a	VIFNSFINLFYLQAAWIQLAKEHGRDDIAHPCFYKKFVRAYVYGGDNIVSIKEEVISWYNLCTVSSFLKDA
LeMoV	VIFNSFINLFYLQAAWIQLAKEHGRSDIAHPCFYKKFVRAYVYGGDNIVSIKEEVISWYNLCTVSSFLKDA
BR11	VIFNSFINLFYLQAAWIQLAKEHGRNDIAHPCFYKKFVRAYVYGGDNIVSIKEEVISWYNLCTVSSFLKDA
2227b	VIFNSFINLFYLQAAWINLAATHGRDDISHPCFFKKYVRAYVYGGDNIVSIKEEVVSWYNLCTVSLFLKEA
DaYMV - DSM2	VIFNSFINLFYLSAWSHLATDNGRVDIQHPSFFKKYVRACVYGGDNIVSIKEEVISWYNLCSVSDFLKKA
PYFV	VIFNSFINLFYLQSAWIMLARFNQRQDISHPCNFKYVRACVYGGDNIVAIMEVLPWYNLQTVSEALFDY
MCDV	VIFNSFVNYYLAMAWMNLISHSPLSPQSTVRDFDNYCKVVYGGDNIVSVDLNLFLEYNLRVAAYLS-Q
RTSV	VIFNSFVNYYFMALAWMSTVGSSLLSPQGSCKDFDITYCKIVAYGGDNVSVHEEFLDVYNLQTVAAAYLS-H
	*****:* ::: ** : : : .******:.. :.: *** :*: *

Figura 25: Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente aos 603bp (putative replicase protein region) do Lettuce mottle virus (LeMoV), do *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV), dos isolados Ch36, BR11, 2227a e 2227b com a região correspondente para cada um dos outros vírus da família *Sequiviridae*: *Rice tungro spherical virus* (RTSV) NC001632; *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) NC003626 e *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV) NC003628.

Tabela 8: Porcentagens de identidade de sequência entre o LeMoV-AF197, DaYMV-DSM2, os isolados Ch36, BR11, 2227a e 2227b, o sequivírus PYFV (NC003628)), os waikavírus MCDV (NC003626) e RTSV (NC001632), o nepovírus GCMV (RNA1, NC003622) e o potyvírus LMV (X97704).

	LeMoV	DaYMV	BR11	Ch36	2227b	2227a	PYFV	MCDV	RTSV	GCMV	LMV
LeMoV	-	80%	98%	97%	83%	95%	72%	35%	33%	29%	20%
DaYMV	80%	-	78%	78%	82%	77%	72%	34%	33%	28%	13%
BR11	98%	78%	-	97%	85%	94%	72%	34%	32%	30%	18%
Ch36	97%	78%	97%	-	83%	96%	72%	34%	32%	28%	20%
2227b	83%	82%	85%	83%	-	81%	73%	37%	34%	30%	12%
2227a	95%	77%	94%	96%	81%	-	70%	34%	32%	29%	20%
PYFV	72%	72%	72%	72%	73%	70%	-	37%	37%	28%	20%
MCDV	35%	34%	34%	34%	37%	34%	37%	-	68%	28%	14%
RTSV	33%	33%	32%	32%	34%	32%	37%	68%	-	29%	15%
GCMV	29%	28%	30%	28%	30%	29%	28%	28%	29%	-	19%
LMV	20%	13%	18%	20%	12%	20%	20%	14%	15%	19%	-

Entretanto, quando as sequências de dois clones do isolado 2227 foram analisadas, verificou-se que não se tratava da mesma sequência como esperado, e que, portanto, haviam possivelmente dois vírus presentes na planta hospedeira da qual foi extraído o RNA. Isto é totalmente viável, já que a planta de alface dessecada e cedida por Hérve Lot (INRA-Avignon), infectada pelo isolado 2227 foi coletada no campo. Os dois isolados foram denominados de 2227a e 2227b sendo que ambos mostraram identidade de sequência com o LeMoV, o DaYMV, com os isolados BR11 e Ch36, além dos membros da família *Sequiviridae* (Tabela 8). As sequências nucleotídicas e protéicas foram analisadas usando programa 'CLUSTAL W' (Thompson *et al.*, 1994), sendo que o alinhamento foi realizado juntamente com os outros isolados citados anteriormente (Figura 25) e a árvore filogenética usando o programa 'TreeView' (Figura 26).

Estes resultados sugeriram que o LeMoV é um membro da família *Sequiviridae*, gênero *Sequivirus*. Os isolados BR11, 2227a, 2227b e Ch36 também são prováveis sequivírus, porém ainda não existem critérios de classificação em espécies dentro desta família. Estes resultados são as primeiras evidências moleculares de classificação taxonômica para o LeMoV e para o DaYMV e mostram também que os isolados BR11 e Ch36 são possíveis estirpes do LeMoV.

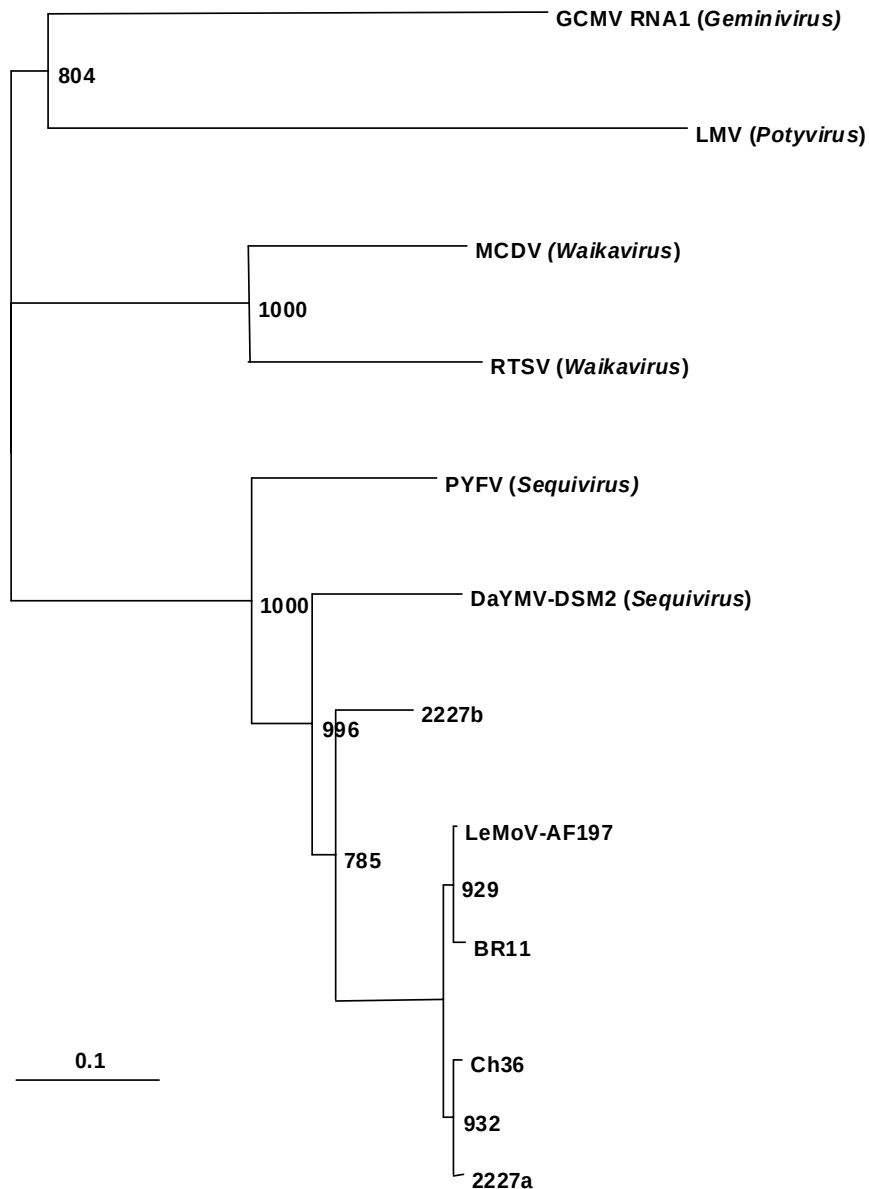


Figura 26: Árvore filogenética dos vírus : (GCMV) RNA1 NC003622; Lettuce mosaic virus (LMV) X97704, *Rice tungro spherical virus* (RTSV) NC001632; *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) NC003626; Lettuce mottle virus (LeMoV); *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV) NC003628, *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV) e isolados Ch36, BR11, 2227a e 2227b, usando o programa 'TreeView' (1000 bootstrap trials).

Oligonucleotídeos específicos e teste de diagnose: Para o desenvolvimento de um teste de diagnose baseado na detecção por RT-PCR, oligonucleotídeos específicos foram desenhados para o LeMoV (Lmo3s/Lmo4aS) e para o DaYMV (Dan1s/Dan2aS). Estes oligonucleotídeos amplificaram com sucesso um fragmento de aproximadamente 300bp para o LeMoV (Figura 27a) e 330bp para o DaYMV (Figura 27b). Os ensaios realizados até o momento indicaram que estes oligonucleotídeos são muito específicos e podem ser usados como uma eficiente ferramenta na diagnose de ambos os vírus.

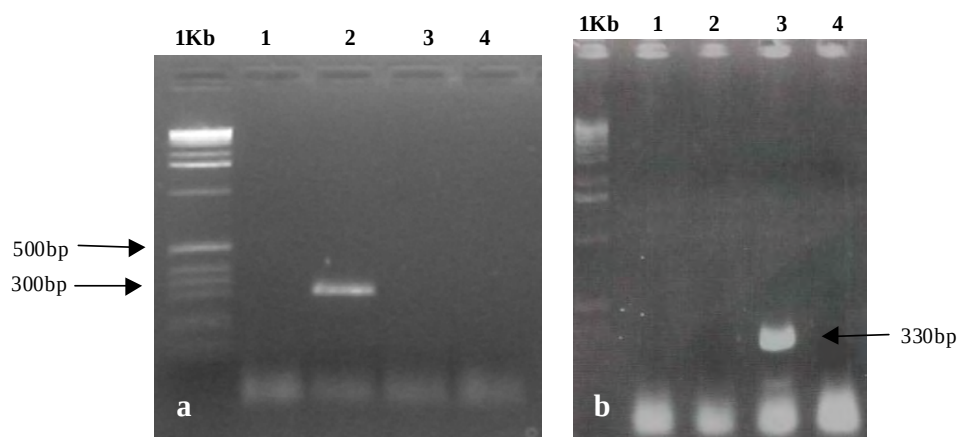


Figura 27: RT-PCR com oligonucleotídeos específicos. (a) oligonucleotídeos Lmo3/Lmo4 específicos para LeMoV, (b) oligonucleotídeos Dan1/Dan2 específicos para DaYMV. O RNA viral utilizado no teste foi extraído pelo método de Bertheau *et al.*, (1998), de plantas de alface cv. “Trocadero” sadia (linha 1), infectada com LeMoV (linha2) e infectada com o DaYMV (linha 3). A linha 4 corresponde ao controle negativo da RT-PCR.

Teste para presença da cauda poli A no LeMoV: Um teste simples foi realizado para verificar a presença ou não de uma cauda poliA na extremidade 3' do genoma do LeMoV. O fragmento de 300bp foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos para LeMoV (Lmo3s/Lmo4aS), somente quando a reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o oligonucleotídeo Lmo4aS específico para LeMoV, não havendo nenhum produto de amplificação quando a mesma reação foi realizado utilizando um oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Figura 28). Como já era esperado para o LMV, o fragmento de aproximadamente 270bp foi amplificado em PCR com os oligonucleotídeos específicos (8894/9171), quando utilizado o oligo(dT) na reação de transcriptase reversa (Figura 28). Estes resultados sugerem que o LeMoV não possui uma cauda poliA na extremidade 3' de seu genoma, exatamente como é descrito para vírus do gênero *Sequivirus*.

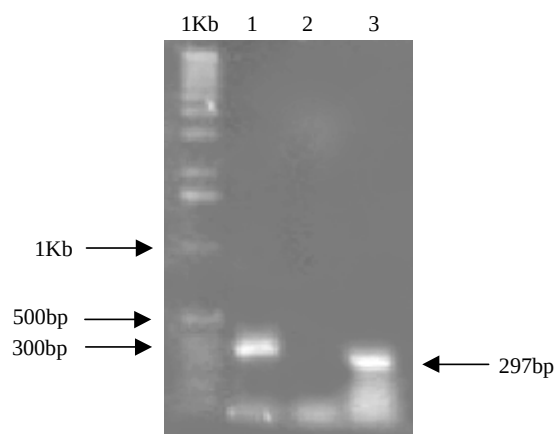


Figura 28: PCR com oligonucleotídeos específicos. O RNA viral utilizado na reação de transcrição reversa (RT) foi extraído pelo método de Bertheau *et al.*, 1998. Linha1: LeMoV, RT com oligonucleotídeo específico Lmo4aS e PCR com os oligonucleotídeos específicos Lmo3/Lmo4; Linha2: LeMoV, RT com oligo(dT) e PCR com os oligonucleotídeos específicos Lmo3/Lmo4; Linha 3: LMV, RT com oligo(dT) e PCR com os oligonucleotídeos específicos 8894/9171.

Juntos os resultados apresentados (características da partícula viral, gama de hospedeiros, similaridade de sequências, ausência de cauda poliA) sugerem que o vírus isométrico encontrado em campos de alface do estado de São Paulo, Lettuce mottle virus (LeMoV-AF197), é um membro do gênero *Sequivirus*. Entretanto, somente análises de sequências não são suficientes para resolver a questão levantada por estes dois vírus que podem ser vírus de espécies diferentes ou relatados como isolados diferentes de uma mesma espécie. Isto traz a idéia de que esta situação seja o resultado de uma antiga separação geográfica e que estes dois vírus estejam em um processo de adaptação em duas espécies, embora ainda tenham similaridades quanto à gama de plantas hospedeiras e que provoquem doença em uma mesma cultura, a alface. Somente o estudo mais profundo das propriedades biológicas destes vírus pode realmente definir suas taxonomias.

Ambos, LeMoV e DaYMV são transmitidos por afídeos. Uma importante diferença com o PYFV é que tanto o LeMoV como o DaYMV não precisam de um vírus auxiliar para transmissão por afídeos. O DaYMV é transmitido de maneira não circulativa (não-persistente) por diversas espécies de afídeos (Brunt & Boss, 1992), incluindo a espécie *Myzus persicae* (Bos *et al.*, 1983), enquanto que o LeMoV é transmitido pelo afídeo *Hipomyzus lactucae* e não pelo *M. persicae* (Marinho & Kitajima, 1986). Os dois vírus possuem uma gama de plantas hospedeiras já relatadas (Brunt & Boss, 1992; Marinho & Kitajima, 1986) e estudos publicados, indicando que o DaYMV possui uma gama de hospedeiro experimental bem mais restrita que o LeMoV.

Finalmente, com exceção de uma remota reação sorológica cruzada, estas diferenças relacionadas à transmissão por vetor e hospedeiras específicas além do relativamente alto nível de divergência em suas sequências, sugerem que o LeMoV poderá

ser considerado uma espécie distinta do DaYMV, dentro do gênero *Sequivirus*. Os oligonucleotídeos específicos utilizados em testes de detecção em RT-PCR para diagnose destes vírus abrem a possibilidade de estudos de variabilidade e incidência no campo, além desta ferramenta de detecção poder estar sendo utilizada na identificação de fontes de resistência em alface.

7. CONCLUSÕES

- Com o protocolo desenvolvido para purificação do LeMoV e do DaYMV, pode-se obter um rendimento de aproximadamente 1mg de vírus por 100g de folhas frescas, para ambos os vírus;
- Os oligonucleotídeos desenvolvidos para LeMoV (Lmo3s/Lmo4aS) e para DaYMV (Dan1s/Dan2aS) são altamente específicos em teste de detecção por RT-PCR, sendo uma importante ferramenta na diagnose de ambos os vírus;
- O LeMoV é um membro da família *Sequiviridae*, gênero *Sequivirus*, provavelmente distinto do DaYMV;
- O LeMoV provavelmente não possui uma cauda poliA na extremidade 3' do seu genoma;
- Os isolados BR11, 2227a, 2227b e Ch36 também são prováveis sequivírus e próximos do LeMoV;

- Estes resultados são as primeiras evidências moleculares de classificação taxonômica para o LeMoV e para o DaYMV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGOS, P. A sequence motif in many polymerases. **Nucleic Acid Research** 16, 9909-9916. 1988.

BERTHEAU Y., D., FRECHON I.K., TOTH L.J., HYMAN. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR) (1998). **In: Perombelon, M.C.M. e van der Wolff, J.M. (Ed.) Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes.** Scottish Crop Research Institute Occasional Publication.

BLANCARD D., LOT H., MAISONNEUVE B. Diseases of lettuces: identification, detection and control (2003). **In: Maladies des salades: identifier, connaitre et maitriser**, pp. 375. Paris: INRA Editions.

BOS L., HUIJBERTS N., HUTTINGA H., MAAT D.Z. Further characterization of *dandelion yellow mosaic virus* from lettuce and dandelion. **Neth. Journal Plant Pathology** 89, 207-222. 1983.

BRUNT, A.A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J., WATSON, L. AND ZURCHER, E.J. (Eds.). Plant Viruses Online: Sequiviruses: *Sequiviridae*. VIDE Database: <http://image.fs.uidaho.edu/vide/genus043.htm>. 1996a.

BRUNT, A.A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J., WATSON, L. AND ZURCHER, E.J. (Eds.). Plant Viruses Online: Nepoviruses: *Comoviridae*. VIDE Database: <http://image.fs.uidaho.edu/vidе/genus033.htm>. 1996b.

BRUNT A.A. & BOS L. *Dandelion yellow mosaic virus*. VIDE Database: <http://image.fs.uidaho.edu/vidе/descr284.htm>. 1992.

CHAVES, A.L.R. **Caracterização de um vírus isométrico causador de mosqueado em alface (*Lactuca sativa* L.)**. (Dissertação de Mestrado). Botucatu, Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP. 1999.

DASGUPTA, I., HULL, R., EASTOP, S., POGGI-POLLINI, C., BLAKEBROUGH, M., BOULTON, M.I., DAVIES, J.W. *Rice tungro bacilliform virus* DNA independently infects rice after *Agrobacterium*- mediated transfer. **Journal of General Virology** 72, 1215-1221. 1991.

DINANT,S. & LOT,H. *Lettuce Mosaic Virus*. **Plant Pathology** 41, 528-42. 1992.

ELNAGAR, S. & MURANT, A.F. Relations of the semi-persistent viruses parsnip yellow fleck and anthriscus yellows with their vector *Caraviella aegopodii*. **Annals of Applied Biology** 84, 153-167. 1976.

FLEGG, C.L. & CLARK, M.F. The detection of apple chlorotic leafspot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Annals of Applied Biology** 91, 61-65. 1979.

GALVEZ, G.E. Purification and characterization of rice tungro virus by analytical density-gradient centrifugation for VAX. **Nucleic Acids Research** 12, 387-395.1984.

- GENTIT P., FOISSAC X., SVANELLA-DUMAS L., PEYPELUT M., MACQUAIRE G., CANDRESSE T. Molecular characterization of foveaviruses associated with the cherry necrotic mottle leaf disease and complete sequencing of an European isolate of *Cherry green ring mottle virus*. **Archives of Virology** 147, 1033-1042. 2002.
- GENTIT P., FOISSAC X., SVANELLA-DUMAS L., PEYPELUT M., CANDRESSE T. Characterization of two different apricot latent foveavirus (ALV) variants associated with peach asteroid spot and peach sooty ringspot diseases. **Archives of Virology** 146, 1453-1464. 2001.
- GIBBS, A. & HARRISON, B.D. Physical and chemical methods of assay and analysis (1976). In: **Edward Arnold (Ed) Plant Virology The Principles**. London. Butler and Tanner Ltd. pp.110-128.
- GINGERY, R.E. & NAULT, L.R. Severe maize chlorotic dwarf disease caused by double infection of mild virus strains. **Phytopathology** 80, 687-691. 1990.
- GINGERY, R.E. Properties of maize chlorotic dwarf virus and its ribonucleic acid. **Virology** 73, 311-318. 1976.
- GROGAN, R. G. Control of lettuce mosaic with virus-free seed. **Plant Disease** 64, 446-449. 1980.
- HEMIDA, K.S. & MURANT, A.F. Particle properties of *Parsnip yellow fleck virus*. **Annals of Applied Biology** 114, 87-100. 1989.
- HEMIDA, K.S., MURANT, A.F., DUNCAN, G.H. purification and some particle properties of *Anthriscus yellows virus*, a phloem-limited semi-persistent aphid-borne virus. **Annals of Applied Biology** 114, 71-86. 1989.

HIBINO, H., ROECHAN, M., SUDARISMAN, S. Association of two types of virus particles with penyakit habang (tungro disease) of rice in Indonesia. **Phytopathology** 68, 1412-1416. 1978.

HULL, R. **In: Plant Virology**. Ed. Academic Press. London. 2001.

JADÃO A.S., PAVAN M.A., KRAUSE-SAKATE, R., ZERBINI, F.M. Efeitos na fotossíntese e área foliar de cultivares de alface inoculadas mecanicamente por patótipos do *Lettuce mosaic virus* (LMV) e Lettuce mottle virus (LeMoV). **Fitopatologia Brasileira** 29, 11-15. 2004.

JADÃO, A.S., PAVAN, M.A., KRAUSE-SAKATE, R., ZERBINI, F.M.. Transmissão via semente do *Lettuce mosaic virus* (LMV) patótipos II e IV em diferentes genótipos de alface. **Summa Phytopathologica**, Sao Paulo, 28, 58-61. 2002.

JAGGER, I.C. A transmissible mosaic disease of lettuce. **Journal of Agricultural Research** 20, 737-741. 1921.

JONES, M.C., GOUGH, K., DASGUPTA, I., SUBBA-RAO, B.L., CLIFFE, F., QU, R., SHEN, P., KANIEWSKA, M., BLACKBROUGH, M., DAVIES, J.W., BEACHY, R.N., HULL, R. Rice tungro disease is caused by an RNA and a DNA virus. **Journal of General Virology** 72, 757-761. 1991.

KASSANIS B., WHITE R.F., WOODS R.D. *Beet crypt virus*. **Phytopathology Zeit** 90, 350-360. 1977.

KASSANIS, B. Studies on dandelion yellow mosaic and other virus diseases of lettuce. **Annals of Applied Biology** 34, 412-421. 1947.

KASSANIS, B. A virus attacking lettuce and dandelion. **Nature** 154, 6. 1944.

KITAJIMA, E.W. et al. Mosaico necrótico da alface - Um vírus isométrico transmitido por afídeos. **Fitopatologia Brasileira** 5, 409. 1980.

- KRAMER, M., ORLANDO, A., SILBERSCHMIDT. Estudos sobre uma grave doença de vírus, responsável pelo depreciação de nossas culturas de alface. **Biológico** 11, 121-134. 1945.
- KRAUSE, R., LE GALL, O., PAVAN, M.A., MACIEL-ZAMBOLIM, E., CARVALHO, M.G., ZERBINI, F.M. Systemic necrosis caused by two isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV) in lettuce (*Lactuca sativa*) cultivars possessing the *Mo2* gene. **Virus Reviews and Research**, (Supplement) 4, 153. 1999.
- KYRIAKOPOULOU, P.E. A lethal strain of lettuce mosaic virus in Greece. **Phytoparasitica** 13, 271. 1985.
- LE GALL O. Lettuce mosaic virus. In: **Jones A.T., Robinson D.J., Boonham N. E Mumford R.** (eds) CMI/AAB description of Plant Viruses. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK, pp.399. 2003.
- LOT, H., MARROU, J., QUIOT, J.B., ESVAN, C. Contribution a l'étude du virus de Mosaic du Concombre (CMV). I. Méthode de purification rapide du virus. **Annales de Phytopathologie** 4:25-38. 1972.
- LOUIE, R., KNOKE, J.K., GORDON, D.T. Epiphytotic of maize dwarf mosaic and maize chlorotic dwarf diseases in Ohio. **Phytopathology** 64, 1455-1459. 1974.
- MARINHO, V.L.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T; COSTA, C.L. Caracterização do vírus do mosqueado da alface. **Fitopatologia Brasileira** 7, 543. 1982.
- MARINHO, V.L.A., LIN, M.T; KITAJIMA, E.W. Purificação e sorologia do vírus do mosqueado da alface. **Fitopatologia Brasileira** 11, 937-935. 1986.
- MURANT A.F. & GOOLD R.A.. Purification, properties and transmission of *parsnip yellow fleck*, a semi-persistent, aphid-borne virus. **Annals of Applied Biology** 62, 123-137. 1968.

MAROON, C.M., GORDON, D.T., GINGERY, R.E. Serological relationships of the capsid protein of the type isolate of *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV-T). **Phytopathology** 79, 1157. 1989.

MOSSOP DW, FRANCKI RI, GRIVELL CJ. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. V. Purification and properties of a *Cucumber mosaic virus* inducing severe chlorosis. **Virology**. 15, 74(2):544-6. 1976.

NEWHALL A.G. Seed transmission of lettuce mosaic virus. **Phytopathology** 13, 104-106. 1923.

REDDICK, B.B., HABERA, L.F., LAW, M.D. Nucleotide sequence and taxonomy of *Maize chlorotic dwarf virus* within the family *Sequiviridae*. **Journal of General Virology** 78, 1165-1174. 1997.

RESENDE, J.A.M. & CUPERTINO, E.P. Doenças em hortaliças. **Informe Agropecuário** 18, 18-27. 1995.

REVERS, F., LOT, H, SOUCHE, S., LE GALL, O., CANDRESSE, T., DUNEZ J. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. **Phytopathology** 87, 397-403. 1997.

ROOT M.E. & JELKMANN W. Complete nucleotide sequence of *Cherry necrotic rusty mottle virus*. **Archives of Virology** 146, 395-401. 2001.

SCOOT H.A. Purification of *Cucumber mosaic virus*. **Virology** 20, 103-106. 1963.

SHEN, P., KANIEWSKA, M., SMITH, C., BEACHY, R.N. Nucleotide sequence and genomic organization of *Rice tungro spherical virus*. **Virology** 193, 621-631. 1993.

STEERE R.L. Purification and properties of *Tobacco ringspot virus*. **Phytopathology** 46, 60-69. 1956.

STANGARLIN, O. S., PAVAN, M. A. & SILVA, N. Occurrence of a new pathotype of *Lettuce mosaic virus* on Lettuce in Brazil. **Plant Disease** 8, 490. 2000.

STANGARLIN, O.S. **Variabilidade do vírus do mosaico da alface e comportamento de cultivares tolerantes de alface (*Lactuca sativa* L.)**. (Tese de Doutorado). Botucatu. Faculdade de Ciências Agrônômicas-Universidade Estadual Paulista-UNESP. 1997.

STANGARLIN, O.S. **Identificação dos vírus causadores de mosaico em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistente ao vírus do mosaico da alface nas regiões produtoras do Estado de São Paulo**. (Dissertação de Mestrado). Botucatu. Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP. 1995.

THOLE, V. & HULL, R. Characterization of a protein from *Rice tungro spherical virus* with serine 'Proteinase'-like activity. **Journal of General Virology** 83, 3179-3186. 2002.

THOLE, V. & HULL, R. *Rice tungro spherical virus*: nucleotide sequence of the 3' genomic half and studies on the small open reading frames. **Virus Genes** 13, 239-246. 1996.

THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J., HIGGINS D.G. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22, 4673-4680. 1994.

TOMLINSON J.A. Purification, properties and serology of *Cucumber mosaic virus*. **Phytopathology** 49, 293-299. 1959.

TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Page RDM. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358. 1996.

TURNBULL-ROSS,A.D., MAYO,M.A., MURANT,A.F. Sequence analysis of the *Parsnip yellow fleck virus* polyprotein: evidence of affinities with picornaviruses. **Journal of General Virology** 74, 555-561. 1993.

TURNBULL-ROSS,A.D., REAVY,B, MAYO,M.A., MURANT,A.F. The nucleotide sequence of *Parsnip yellow fleck virus*: a plant picorna-like virus. **Journal of General Virology** 73, 3203-3211. 1992.

TWARDOWICZ-JAKUSZ,A.Z.; ZIELINSKA, L.; KANIEWSKI, W. Occurrence and identification of viruses affecting lettuce in Poland II. *Dandelion yellow mosaic sequivirus* (DYMV). **Journal of Plant Protection Research** 37, 18-26. 1996.

TWARDOWICZ-JAKUSZ,A.Z. Occurrence and identification of viruses affecting lettuce in Poland I. **Journal of Plant Protection Research** 37, 7-13. 1997.

VAN REGENMORTEL,M.H., FAUQUET,C.M., BISHOP,D.H.L., CARSTENS,E.B., ESTES,M.K., LEMON,S.M., MANILOFF,J., MAYO,M.A., McGEOCH,D.J., PRINGLE,C.R., WICKNER,R.B. **Virus Taxonomy**. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. Academic Press. 2000.

VETTEN,H.J., BREYEL,E., LESEMAN,D.E., MAIB,E., WEIDEMANN,H.L. Properties of an isometric lettuce virus resembling *Dandelion yellow mosaic virus*. **Phytoparasitica** 13: 3-4. 1985.

APÊNDICE

Apêndice 1: Protocolo de extração de RNA total**Bertheau *et al.*, 1998.**

- 1) Triturar a amostra (1:5 p/v) em tampão PBS-Tween contendo PVP K25 a 2 % (p/v) e Na-DIECA 20mM;
- 2) Centrifugar em tubos de microcentrífuga por 10 minutos a 13.000 rpm;
- 3) Recolher 200µl do sobrenadante e transferir para um novo tubo (1000µl);
- 4) Acrescentar SDS a 1 % (20µl SDS 10%);
- 5) Incubar a 55°C por 15 minutos;
- 6) Adicionar 100µl de solução de acetato de potássio a 3 M e agitar bem;
- 7) Incubar em gelo por 5 minutos;
- 8) Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm;
- 9) Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- 10) Adicionar 700µl de NaI 6M e 5µl de uma solução contendo silício, previamente agitada para que o silício fosse ressuscitado;
- 11) Agitar bem e manter a solução por 10 minutos a temperatura ambiente;
- 12) Centrifugar por um minuto a 5.000rpm;
- 13) Descartar o sobrenadante e lavar o 'pellet' duas vezes com 500 µl de solução de lavagem;
- 14) Centrifugar por 1 minuto a 5.000rpm;
- 15) Secar o 'pellet' a vácuo;
- 16) Ressuspender o RNA em 400 µl de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de incubação por 5 minutos a 55°C;
- 17) Centrifugação por 5 minutos a 13.000rpm;
- 18) Transferir o sobrenadante (300 µl) para um novo tubo e armazenar a -20°C. Utilizou-se uma alíquota de 5µl para a PCR.

Preparo das soluções

NaI 6M

Dissolver 0,75 g de Na_2SO_3 em 40 ml de água

Adicionar 36 g/40ml de NaI

Agitar até dissolver bem

Filtrar em papel Whatman numero 1

Armazenar no escuro a 4°C

Solução de lavagem

20 mM Tris-HCl pH 7,5,

1 mM EDTA

100 mM NaCl

igual volume de etanol absoluto

Solução de silício

Em uma proveta de 500 ml adicionar 60 g de silício e 500 ml de água ultrapura,

Deixar sedimentar 24 horas temperatura do ambiente;

Aspirar 430 ml de sobrenadante e jogá-lo;

Adicionar ao sílico água até completar 500ml;

Agitar bem e deixar sedimentar por mais 5 horas;

Aspirar 440 ml de sobrenadante e jogar;

Ajustar o pH para 2 nos 60 ml de solução que restaram (em torno de 600µl HCl 32 %);

Aliquotar em pequenos volumes (4-5 ml) e autoclavar 20 minutos a 120 °C e guardar no escuro a 4°C).

Apêndice 2: Protocolo de extração de RNA fita dupla (dsRNA) utilizando a celulose CF11.

Material necessario:

STE 10x NaCL 1M , Tris 500mM, EDTA 10mM, ph 8,0
 STE 1x 16,5% ethanol -100ml de STE 10x + 173,6ml ethanol 95% e completar para 1litro
 Bentonita 40 mg/ml
 Fenol Tris saturado Tris HCl, ph 7,4
 Isopropanol
 Acetato de sodio 3M, ph5,2 autoclavado
 Agua depc

Procedimento

1. Macerar o tecido vegetal (5g de folhas) em nitrogenio liquido (cadinho e pistilo)
 acrescentar: 10ml (para cada 5g) de STE 2x
 0,7ml SDS 20%
 200ul de bentonita a 40mg/ml

Macerar bem o material e tranferir o extrato vegetal para tubos de centrifugação (25 a 30ml);
 Acresccentar 14,25 ml de phenol-tris

1. Agitação lenta 30min
 Centrif. 10000g/20min
2. Transferir a fase aquosa para tubos novos;
 Equilibrar os tubos com STE1x;
 Acrescentar ethanol 95% para ficar a 16,5%
 Ethanol
vol. a acrescentar = 0,208*vol. fase aquosa

*Durante este tempo:
 Preparação da celulose CF11 em tubos
 Falcon de 50ml;
 1g CF11/ amostra em 25ml STE1x 16,5%
 ethanol;
 Agitação manual 15min;
 Repouso 15min. E descartar o
 sobrenadante;

Misturar bem e deixar os tubos no gelo;
 Passar o conteudo dos tubos para os tubos preparados com a celulose (falcon);
 Agitar bastante; **Ps: aqui vc pode parar e deixar O.N. a 4°C**
 Deixar 30 min em agitação lenta (plateau agitant);
 Centrif. 3000g/10min

Descartar o sobrenadante

3. Lavar a celulose com 25ml de STE1x 16,5% ethanol;
 Agitação manual 5 min;
 Centrif. 3000g/10min;
 Descartar o sobrenadante
 Refazer este procedimento outras duas vezes

Eliminar todo o sobrenadante com uma pipeta esteril de 10ml e secar a (colocando a pipeta dentro da celulose e pipetando todo o tampão)

4. Ressuspender o pellet de celulose em 5ml de STE 1x;
 Agitação manual de 5min;
 Centrif. 3000g/10min.;
 Coletar o sobrenadante com uma pipeta de 10ml esteril “en plantant la pipette dedans”
 Ressuspender o pellet em 5ml de STE 1x;
 Agitação manual de 5 min
 Centrif. 3000g/10min;
 Coletar o sobrenadante;
 Coletar o sobrenadante no mesmo tubo,
 Centrif. dos tubos contendo o sobrenadante 10min a 10000g
 Coletar o sobrenadante em tubos COREX estereis (não esquecer de medir o volume coletado);

5. Precipitação dos ácidos nucleicos

1/9 vol. (v/v) com acetato de sódio 3M pH= 5,2
 0,8 vol. (v/v) de isopropanol
 Colocar a -20°C O.N. ou 2hs a -80°C

6. Tratamento enzimático de ácidos nucleicos

Centrifugação 10000g/30min;
 Secar o pellet (speed vac)
 Ressuspender o pellet em 15ul de água depc (variável, neste caso está bem concentrado)

Tratamento DNase

RNA	6µl	
Acetato de magnésio 1M	1µl	60min /37°C
DNase	0,5µl	
Água depc	2,5ml	

Tratamento RNase

RNase (1µg/µl)	1µl	
10x SSC	3µl	30min /37°C
água depc	1µl	

Tratamento *Proteinase K*

<i>Proteinase K</i> (1mg/ml)	1µl	60min /37°C
SDS 2%	1.6µl	
Água depc	2,4µl	

Tampão STE 10x (estoque) para 1L

200ml de NaCL 5M

100ml de Tris 1M

20ml de EDTA 0,5mM

680ml de água MilliQ

autoclavar

Apêndice 3: Protocolo de extração de RNA fita dupla (RNAds) utilizando a micro-celulose MN301.

1. Macerar tecido vegetal (3g de folhas) em nitrogênio líquido;
2. Add 4 vol. (p/v) de STE1x (0,1M Tris HCl, pH 8,0, 0,1M NaCl e 10mM EDTA)*(tampao diferente do utilizado no protocolo com CF11), contendo 1% de SDS e 1% β mercapto ethanol;
3. Deixar a mistura 30 min em temperatura ambiente;
4. Add 0.5 vol de phenbol / chloroformio (1:1) e emulsificar 30 min;
5. Centrif. 10000g/10min, coletar o sobrenadante e precipitar os ácidos nucléicos com 0.8vol de isopropanol O.N. -20°C ou 2hs -80°C ;
6. Centrif. 10000g / 30min;
7. Ressuspender o pellet em 0.8ml de SDS1 3%/ cada 3g de folhas e fazer a clarificação em centrif. 10000g/20min * passar para tubos eppendorf;
8. Add microgranular celulose MN 301 ao sobrenadante (10mg/3g de folha) e deixar em agitação lenta 30 min;
9. Add ethanol a 20%, lentamente sob agitação (vortex) e deixar em agitação 30min;
10. Centrif. 10000g/3min e coletar o pellet;
11. Lavar a microcelulose com STE 16,5% ethanol
Lavar 5x com centrifugações de 30s
Lavar/ centrif./descartar sobrenadante/lavar
12. Secar o pellet em temperatura ambiente;
13. Ressuspender o pellet em STE 1x (200 μ l);
14. Precipitação ácidos nucléicos:
1/9 vol. Acetato Mg
0,8vol. Isopropanol
O.N. -20°C ou 2hs -80°C
15. Centrif. 14000rpm/30min;
16. Secar o pellet (speed vac);

17. Ressuspender o pellet em 15µl de água depc.

Tratamento *DNase*

RNA	6µl	
Acetato magnesio 1M	1µl	60min /37°C
DNase	0,5µl	
Água depc	2,5ml	

Tratamento *RNAse*

RNAse (1ug/ul)	1µl	
10x SSC	3µl	30min /37°C
água depc	1µl	

Tratamento *Proteinase K*

Proteinase K(1mg/ml)	1µl	
SDS 2%	1.6µl	60min /37°C
água depc	4µl	

Tampão STE 10x (estoque) para 1L

200ml de NaCL 5M

100ml de Tris 1M

20ml de EDTA 0,5mM

680ml de água MilliQ

autoclavar

Apêndice 4: Protocolo de ‘Degenerated oligonucleotide primer’ DOP-PCR após extração de dsRNA

1. desnaturação química do dsRNA

3ul de dsRNA

+1.2ul metil mercurato (0.1M)/ 10min temperatura ambiente

+ 0,3ul de 2βmercapto etanol (0.1M)/ 10min temperatura ambiente

2. Síntese de DNA

+0.5μl oligo d(T)₁₂₋₁₈ (0.5ug/μl)

+0.5μl ‘randon primer’ oligo (N)₆ (1mM)

+5.5μl Agua MilliQ¹ estéril

+4μl tampao *MLV* ‘Superscript II’

+2μl DTT (10mM)

10min / 25°C

+2μl *MLV* ‘Superscript II’

10min/ 37°C

50min 42°C

15min/ 72°C

3. PCR

5μl de cDNA

5μl tp Eurobio 10x

1.5μl MgCl₂ (50mM)

0.5 μl dNTPs (25mM)

1μl primer DOP (100μM)

0.25μl *Taq* polimerase Eurobio (5U/μl)

36,75μl agua MilliQ¹ esteril

¹água filtrada com cartucho de carbono ativo, clorada, tratada em membrana à osmose inversa para eliminar os ions minerais e todos traços de materia organica oxidada.

4. Programa do termociclador

95°C / 5min

5 ciclos 94°C/1min

27°C/1min

ramping 27°C a 72°C/ 3min

72°C/3min

50 ciclos 94°C/1min

62°C/1min

72°C/2min

72°C / 10min

4°C

Análise em gel de agarose 0,8%, corado com 'sybergreen'

**Apêndice 5: Protocolo de purificação do *Cucumber mosaic virus* (CMV)
Lot *et al.*, 1992**

1. Extração realizada com as folhas infectadas e igual volume de tampão citrato de sódio 0,5M, pH 6,5, contendo 0,5% de ácido tioglicólico;
2. Clarificação com 1 volume de clorofórmio (v:v) e centrifugação a 12.000g por 10 min;
3. O sobrenadante é recuperado e precipitado adicionando-se 10% de polietilenoglicol PEG 8000 (p/v) sob agitação lenta durante 30-45min a 4°C e centrifugando-se a 7.000g por 20min;
4. O pellet é ressuspendido em tampão citrato de sódio 50mM, pH 7,0, contendo 2% de Triton X-100 e ‘stirred’ por 30 min antes da centrifugação a 19.000g por 15min;
5. A purificação parcial é realizada com 3 sucessivas centrifugações diferenciais ;
6. O pellet é ressuspendido em tampão citrato de sódio 50mM pH 7,0 e submetido a um gradiente de sacarose de 5-25%;

Apêndice 6: Protocolo de purificação do *Tomato black ring nepovirus* (TBRV), cedido por Marie-Josée Dulucq (INRA-Bordeaux).

1. Extração com folhas infectadas, tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,5 e *n*-butanol-clorofórmio na proporção de 1:3:0,5 (p/v/v);
2. Centrifugação durante 20 minutos a 10.000g. O sobreandante é recuperado adicionando-se 10% de PEG6000 e 1% de NaCl, deixado sob agitação lenta durante 30 minutos a 4°C e centrifugado a 10.000g durante 15 minutos;
3. Recupera-se o sobrenadante;
4. Ultracentrifugação durante 2 horas a 40.000rpm (rotor 60Ti-Beckman) e o 'pellet' ressuspendido em tampão fosfato de sódio 0,05M pH7,5 durante 48 horas a 4°C;
5. Centrifugação de 15min a 10.000g. O sobrenadante é recuperado;
6. Ultracentrifugação durante 2 horas a 40.000rpm (rotor 60Ti-Beckman);
7. Ressuspensão do 'pellet' em 2ml de tampão fosfato de sódio 0,05M pH7,5 e armazenamento a 4°C.

Preparação de soluções de sacarose 10 a 40% (p/v) em tampão fosfato 0,05M, pH 7,5, usando tubos de 13,2ml para o rotor SW41Ti Beckman. Repouso durante uma noite a 4°;

Adiciona-se a solução semi-purificada cuidadosamente em cada um dos tubos de gradiente (300µl/tubo);

Ultracentrifugação do gradiente durante 90 minutos a 35000rpm.

Apêndice 7: Protocolo de purificação do *Parsnip yellow fleck sequivirus* (PYFV)**Hemida & Murant, 1989**

1. Extração em tampão fosfato de sódio 60mM, contendo 10mM de EDTA e 0,1% de ácido tioglicólico (solução a 90%), na proporção de 1g de folhas para 3 ml de tampão;
 2. Filtrar o extrato utilizando gaze e para clarificação (i) adicionar o mesmo volume de di-etil éte, misturar bem e deixar a solução em repouso por 30min à temperatura ambiente (18-22°C) ou (ii) adicionar *n*-butanol para uma concentração final de 8,0% e agitar a solução durante 30 min com a ajuda de uma barra magnética (4°C).
 3. Centrifugação de 15min a 10.000g e coletar o sobrenadante;
 4. Precipitação com 10% de PEG6000 (p/v) e 1% de NaCl;
 5. Agitar a solução com a ajuda de uma barra magnética durante 60min a 4°C;
 6. Centrifugar 20min a 10.000g e ressuspender o pellet a 4°C em tampão fosfato de sódio 60mM, pH7,0 durante uma noite;
 7. Ultra-centrifugar a 250.000g por 1h e ressuspender os pellets em tampão fosfato de sódio 60mM, pH7,0;
 8. Preparar gradiente de sacarose 25% (p/p) em tampão fosfato de sódio 60mM, pH7,0, utilizando tubos para os rotores SW27 ou SW28 Beckman e deixar as soluções em repouso durante uma noite;
- Adicionar de 0.5-1ml da solução semi-purificada no topo do gradiente e ultra-centrifugar durante 2,5h a 90.000g

Apêndice 8: Protocolo de purificação do isolado BR11, cedido por Hérve Lot (INRA-Avignon)

1. Fazer a extração das folhas coletadas em tampão fosfato de sódio 0,3M , pH 7,4, na proporção 1:1 (p/v) contendo 0,01% de DIECA e 0,1% de 2 β mercapto etanol ;
2. Filtrar a solução em gaze;
3. Clarificar com clorofórmio 1:1 (v/v), agitar bem e centrifugar 10min a 10.000g;
4. Adicionar 10% de PEG6000 e 1% de NaCl ao sobrenadante e deixar de 40-60min em repouso a 4°C;
5. Centrifugação a 10.000g durante 20min;
6. Ressuspender cada um dos ‘pellets’em aproximadamente 20ml de tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,4 + 2% de Triton X-100;
7. Juntar todas as soluções ressuspendidas em um mesmo recipiente e agitar durante 2,5h/4°C (shaker); *nesta etapa podemos deixar a solução após agitação, durante uma noite a 4°C.
8. Centrifugação durante 5 minutos a 7.000g;
9. Recuperar o sobrenadante e ultracentrifugar durante 2h a 38.000rpm(rotor 60Ti, Beckman);
10. Ressuspender os ‘pellets’ em tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,4 (+-10ml). Ressuspender bem os ‘pellets’, e se necessário deixar ON a 4°C;
11. Ultracentrifugação durante 2h a 38.000rpm(rotor 60Ti, Beckman);
12. Ressuspender os ‘pellets’em tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,4 (+-1ml);
13. Centrifugar durante 5min a 7.000g e recuperar o sobrenadante e armazená-lo a 4°C.

Gradiente de sulfato de céσιο

Preparar uma solução de sulfato de céσιο a 60%, em tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,4 utilizando tubos de 5ml para rotor SW50.1 Beckman;

Solução: 3g de sulfato de céσιο + tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,4 + 1ml semi-purificado, para uma solução final de 5ml;

Ultracentrifugação de 17h a 35.000rpm;

Recuperar a banda viral com a ajuda de uma seringa e diluir de 4-5x em tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,4;

Ultracentrifugar a 38.000rpm durante uma noite (rotor 60Ti Beckman);
Ressuspender o pellet em aproximadamente 400µl de tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,4 e armazenar o purificado viral a 4°C.

**Apêndice 9: Protocolo de purificação do *Dandelion yellow mosaic sequivirus* (DaYMV)
Bos *et al.*, 1983**

1. Extração das folhas coletadas em tampão fosfato de sódio 0,5M , pH 7,0, 1:2 (p/v), contendo 0,1% de ácido tioglicólico;
2. Filtrar a solução em gaze e deixar a solução durante uma noite a -20°C;
3. Clarificar com n-butanol para uma concentração final de 8% e centrifugar;
4. Deixar a solução sob agitação com a ajuda de uma barra magnética, durante 45min/4°C e em repouso 30min/4°C;
5. Centrifugar por 10min a 16.000g;
6. O sobrenadante é recuperado e ultracentrifugado por 2,5h a 116.000g;
7. Ressuspender os 'pellets' em 210ml de tampão Tris-HCl 0,01M, pH9,0 e deixado sob agitação, com a ajuda de uma barra magnética, durante uma noite a 4°C, para uma boa ressuspensão;
8. Centrifugação por 10min a 7.700g;
9. O sobrenadante é recuperado e ultracentrifugado por 2,5h a 116.000g;
10. Ressuspender os 'pellets' em 6ml de tampão Tris-HCl 0,01M, pH9,0 e deixar sob agitação (com barra magnética) durante 3h/4°C;
11. Centrifugação por 10min a 7.700g;

Recuperar o sobrenadante (semi-purificado) e armazenar a 4°C.

Gradiente de sulfato de cézio

Um ml de solução semi-purificada deve ser misturada em tubos para rotor SW41 Beckman com 2,5ml de uma solução de sulfato de cézio em tampão Tris-HCl 0,01M, pH9,0 (37,26g/50ml);

Ultracentrifugação de 17-20h a 30.000rpm;

Recuperar a banda viral com a ajuda de uma seringa e diluir e dialisar a fração recuperada em tampão Tris-HCl 0,01M, pH9,0 durante 24h, a 4°C

Apêndice 10: Protocolo de minipurificação viral

1. Macere 2g de folha em 15 ml de tampão citrato de amônia, 150 µl de Iodoacetamida 0.25 M e 150 µl de NaDieca 1 M.
2. Filtrar o macerado em gaze e passe para tubos corex (30 ml). Centrifugue 10 min a 10.000 G. Rotor F0650.
3. Recolher o sobrenadante em tubos de polycarbonato, adicionar 1 ml de triton X-100, agitar em vortex até dissolver todo o triton
4. Formar uma almofada com 5 ml de sacarose 20% no fundo do tubo.
5. Centrifugar por 90 min a 35.000 G (rotor Ti 70)
6. Descartar o sobrenadante e lavar o tubo, sem remover o precipitado, deixar escorrer.
7. Adicionar 1 ml de tampão fosfato de potássio 0,05 M e deixar a 4°C por uma noite.
8. Centrifugar por 5 min a 8.000 g, descartar o ´pellet´ e recolher o sobrenadante, estocar a 4°C.

Tampão de extração:

0,1 M NH₄ citrato pH 6.5

NH₄ citrato 3.4 g

H₂O 150 ml

Ajustar o pH com (NH₄)OH)

Apêndice 11: Protocolo de extração de RNA a partir de soluções virais purificadas

1. Pegue 200µl de vírus mini-purificado ou purificado adicionar 50µl de tampão de extração 20µl de SDS 20% e 2,7µl proteinase K 20mg/ml (concentração final da enzima = 100 µg/ml).
2. Colocar a 37°C por 1 hr.
3. Adicionar 1 volume (272,7 µl) de fenol/cloroformio
4. Vortex 30 segundos. Centrifugar por 15 min a 14.000 rpm.
5. Manter os tubos no gelo.
6. Transferir a fase aquosa (250 µl) para tubos novos e repetir a extração com fenol/cloroformio.
7. Transferir a fase aquosa (200 µl) para tubos novos. Adicionar 1/20 vol. (10 µl) de NaOAc 3M pH 5.5 e 2,5 vol. De EtOH. Manter a -20°C por no mínimo 1 h.
8. Centrifugar por 30 min a 14.000 rpm, descartar o sobrenadante. Deve ser observado um pequeno 'pellet' branco no fundo do tubo.
9. Lavar o 'pellet' com 1 ml de EtOH 70%, centrifugar por 2 min, descartar o sobrenadante e secar.
10. Ressuspender o "pellet" em 20 µl de água estéril (DEPC) e estocar a -80°C.

Tampão de extração de RNA:

Glicina 0.2 M, NaCl 0.2 M, EDTA 20 mM, pH 9.5

Glicina 0,75g

NaCL 0.56g

Na-EDTA 0.372g

H₂O volume final 50 ml

Ajustar o pH com NaOH

Apêndice 12: Protocolo para gel de RNA em condições desnaturantes

1. 10x FA gel buffer

200mM de MOPS ('free acid')

50mM acetato de sódio

10mM de EDTA

ajustar o pH para 7,0 com NaOH

2. 1x FA gel running buffer

100ml de 10x FA gel buffer

20ml de 37% formaldeído (12,3M)

880ml de água *RNAse* free

3. 1,2x FA gel (100ml)

1,2g de agarose

10ml de 10x FA gel buffer

água depc para 100ml

Dissolver a agarose em microondas;

Esfriar a 65°C em banho-maria;

Adicionar 1,8ml de 37% formaldeído (12,3M);

Misturar e verter em forma *RNAse* free;

Depois de gelificado, equilibrar o gel em 1x FA gel running por pelo menos 30min.

4. 5x RNA loading buffer

16µl de bromophenol blue saturado

80µl de EDTA 500mM pH 8,0

720µl de 37% formaldeído (12,3M)

2ml de glicerol 100%

3.084ml de formamida

4ml de FA gel buffer

água *RNAse* free para 10ml

5. RNA sample

1 volume de 5x loading buffer para 4 volumes da amostra;

Incubar por 3-5 minutos a 65°C e colocar imediatamente no gelo;

Aplicar as amostras no gel equilibrado (60V).

6. Preparo da cuba de eletroforese para RNA

Lavar com SDS 0,5%;

Enxaguar com água depc;

Secar com etanol 100%

Colocar H₂O₂ 3% e incubar por 10min a temperatura ambiente;

Lavar com água depc.

Apêndice 13: Protocolo para preparação de gel de poliacrilamida

1. Concentration Gel –SDS PAGE gel para 10ml ou 2 mini-géis

Soluções mães	5%	7,5%	10%	12,5%	15%
	60-212KDa	30-120KDa	18-75KDa	15-60KDa	15-45KDa
Mix acrilamida/bis-acrilamida (30%/0,8%, w/v)	1,7ml	2.5ml	3.3ml	4,2ml	5,0ml
Tris 1,5M, pH 8,0, SDS 0,4%	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
Água	5.8ml	5,0ml	4,2ml	3,3ml	2,5ml
TEMED	10µl	10µl	5µl	5µl	5µl
APS 10% *	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl

2. Stacking Gel- SDS PAGE -gel para 10ml ou 4 mini-géis

0,85ml de Mix acrilamida/bisacrilamida (30%/0,8%, w/v);

1,25ml de Tris 1,5M, pH 6,8, SDS 0,4%;

2,9ml de água;

5µl de TEMED;

30µl de APS 10% *

*preparar minutos antes de adicioná-lo e este deve ser sempre o último reagente a ser adicionado.

Apêndice 14: Protocolo de 'Western Blot' utilizando o aparelho 'Biorad semi dry transfer'

1. Cortar um pedaço de folha de nitrocelulose e 6 pedaços de folhas de papel 'Wattman' do tamanho aproximado do gel e incubá-las juntamente com o gel após eletroforese, em tampão de transferência (T1);
2. Fazer uma espécie de 'sandwich' sobre o aparelho de transferência, colocando primeiramente 3 folhas de papel 'Wattman', em seguida a membrana de nitrocelulose, sobre a membrana coloca-se o gel de poliacrilamida após eletroforese e finalmente cobre-se o gel com outras 3 folhas de papel 'Wattman';
3. Eletroforese com corrente de 15-20V (nunca mais que 25V) durante 45-60min
4. Revelação: depositar a membrana em uma placa de petri contendo 10-20ml de solução de 'block'T3 com 1% de gelatina. Deixar de 1-2h sob agitação leve (shaker) em temperatura ambiente. Esta etapa permite a saturação da superfície da membrana para se evitar reação inespecífica dos anticorpos;
5. A solução de saturação é eliminada e a membrana deve ser lavada 3x durante 10min cada, com 10-20ml de tampão T4;
6. Incubar a membrana de 1-2h em 10-20ml de T4 contendo os anticorpos específicos. A quantidade vai depender do título do anticorpo utilizado;
7. Lavar a membrana 3x durante 10min cada, com 10-20ml de tampão T4;
8. Incubar a membrana de 1-2h em tampão T4 contendo o conjugado. (anti-coelho normalmente utiliza-se 1:5000);
9. Lavar a membrana 2x durante 10min cada, com 10-20ml de tampão T4;
10. Lavar a membrana 1x durante 10min em tamp T5;
11. Revelação: Incubar a membrana em 10ml de T5 contendo 100µl de NBT-BCIP (substrato da fosfatase alcalina) até que o sinal apareça. 5min-45min, dependendo da quantidade de proteínas presentes.

Tampões utilizados

A. Tampão de transferência T1 (para 1litro)

3g de Tris base

14,4g de glicina

200ml de metanol

800ml de água

B. Solução de saturação (Block) 10x- T2

NaCl 3,5M

Tris-HCl, pH 7,4 100mM

Preparo: 10ml de T2 + 40ml de água MilliQ aquecidos em microondas. Depois adicionar 500mg de gelatina (1% final) e agitar- solução T3

C. Tampão de lavagem T4 (ou RIA) para 2 litros

20ml de Tris 1M pH 7,5

64ml de NaCl 5M

10ml de SDS 20%

20ml de Triton X-100

1886ml de água MilliQ

Acrescentar os reagentes sob agitação

D. Tampão de revelação T5 para 200ml

20ml de Tris 1M, pH 9,0

4ml de NaCl 5M

1ml de $MgCl_2$ 1M

175ml de água MilliQ