

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE MOLECULAR DA PROTEÍNA HC-Pro
(Helper Component-Proteinase) E SEU PAPEL NA RELAÇÃO
PATÓGENO-HOSPEDEIRO**

DESIRÉ SPADA DOS SANTOS FRANGIONI

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

BOTUCATU - SP
Novembro - 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE MOLECULAR DA PROTEÍNA HC-Pro
(Helper Component-Proteinase) E SEU PAPEL NA RELAÇÃO
PATÓGENO-HOSPEDEIRO**

DESIRÉ SPADA DOS SANTOS FRANGIONI

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan
Co-orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia
– Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP
Novembro - 2006

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

Frangioni, Desiré Spada dos Santos, 1968-
F827a Análise molecular da proteína HC-Pro (Helper Component-Proteinase) e seu papel na relação patógeno-hospedeiro / Desiré Spada dos Santos Frangioni. - Botucatu : [s.n.], 2006.

xiii, 79 f. : il. color.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2006

Orientador: Marcelo Agenor Pavan

Co-orientador: Ivan de Godoy Maia

Inclui bibliografia

1. Relação hospedeiro vírus. 2. Mutação (Biologia). 3. Proteína - Aspectos moleculares. 4. Recombinação (Genética). 5. HC-Pro. I. Pavan, Marcelo Agenor. II. Maia, Ivan de Godoy. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ANÁLISE MOLECULAR DA PROTEÍNA HC-Pro (Helper Component-Proteinase) E SEU PAPEL NA RELAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO"

ALUNA: DESIRÊ SPADA DOS SANTOS FRANGIONI

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. IVAN DE GODOY MAIA

Aprovado pela Comissão Examinadora



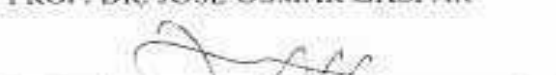
PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN



PROF. DR. RENATE KRAUSE SAKATE



PROF. DR. JOSÉ OSMAR GASPAR



PROF. DR. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES



DRA. ADDOLORATA COLARICCIO

Data da Realização: 29 de novembro de 2006.

Dedico este trabalho

À minha filha Maria Beatriz, o grande presente
que recebi,

Ao meu sobrinho Tabari por iluminar a minha
vida com seu sorriso,

Aos meus pais Heitor (*in memoriam*) e Aracy,

Ao meu marido Renato,

À minha tia Gledy.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram e possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Marcelo Agenor Pavan, pela oportunidade de aperfeiçoamento, pela orientação paciente e incentivo, pelo apoio e compreensão durante as etapas deste trabalho e, acima de tudo, por sua amizade e confiança durante todo esse período de convívio.

Ao Professor Dr. Ivan de Godoy Maia, por todas as oportunidades que me proporcionou, pela co-orientação deste trabalho e, principalmente pelo apoio e amizade.

À Pesquisadora Científica Dra. Renate Krause Sakate, por sua amizade, apoio e grande incentivo para a realização deste trabalho.

Ao Pesquisador Científico do INRA-Bordeaux (France), Dr. Olivier Le Gall, por permitir a utilização dos clones LMV utilizados nesse trabalho e por seu auxílio sempre que necessário.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação, em especial aos Professores Dr. Antonio C. Maringoni, Dra. Carmen Silvia F. Boaro, Dr. Celso Luis Marino, Dr. Edson Luis Furtado, Dra. Elizabeth Orika Ono, Dr. Ivan de Godoy Maia, Dr. João Domingos Rodrigues, Dra Lúcia Souza Lima S. da Mota, Dr. Marcelo A. Pavan, Dra. Maria Elena Aparecida Delachave, Dr. Nelson Sidnei Massola Junior, Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, Dra. Renate Krause Sakate pelos ensinamentos, apoio e dedicação durante o desenvolvimento do curso.

À Pesquisadora Científica do Instituto Biológico de São Paulo, Dra. Addolorata Colariccio, por ter me iniciado no universo da virologia, por sua amizade inestimável e constante apoio.

À direção da empresa Alellyx por permitir a realização dos ensaios de inoculação via biobalística em seu laboratório e a todos que nos auxiliaram durante os experimentos.

À Regiane Degan Fávaro, pela grande amizade e inestimável auxílio durante a elaboração deste trabalho e, principalmente por todos os momentos que passamos juntas.

Ao Flávio Tetsuo Sasaki, pela amizade, apoio, constante auxílio durante a realização deste trabalho e pelo convívio que tornou o trabalho uma diversão.

À Débora Colombi, por sua amizade, auxílio durante a realização deste trabalho e pela imensa ajuda que está me proporcionando.

Aos estagiários Denise Miyuki Sato e Sérgio Akira Adachi, por sua ajuda e amizade.

Aos amigos e colegas Adriana, César, Christiane, Denise, Jorge, Márcia, Márcia Cezar, Viviane, do curso de pós-graduação, pelos momentos divertidos de convívio e amizade.

Aos amigos e todos os colegas do Laboratório Biogem, Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP), em especial, Andréa Akemi Hoshino, Andréa V. Gobbi Barbosa, Antonio Sérgio Kimuz Brás, Dario Abel Palmieri, Edna Maria Zelandi, Mariana Saragiotto da Silva, Marcos Brandalise, Paula Macedo Nobile,

Roberto de Almeida Camargo, Tatiany E. Barata Pereira, Thaís de Lima Carvalho e Virgínia Elias Coscrato, pela colaboração, amizade e bons momentos que passamos juntos.

Aos funcionários, da Biblioteca e dos Departamentos de Proteção de Plantas e Genética, pela colaboração e auxílio sempre que necessários.

À Marilena, Kátia e Marlene da Seção de Pós-graduação, pela constante atenção e esclarecimentos.

À minha mãe por seu apoio, amizade e auxílio indispensável durante a realização deste trabalho.

À minha irmã Patrícia e seu esposo Armando pelo constante auxílio e amizade.

Aos meus queridos sobrinhos Iadasa, Halide e Tabari por todas as alegrias que me proporcionam.

Aos queridos amigos, Anna Maria e Rafael, pela preciosa amizade e constante auxílio.

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrônômicas e Instituto de Biociências de Botucatu, pela oportunidade de aperfeiçoamento e aprimoramento científico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	XI
1. RESUMO.....	01
2. SUMMARY.....	03
3. INTRODUÇÃO.....	05
4. OBJETIVO.....	08
5. REVISÃO DE LITERATURA.....	09
5.1 Taxonomia e aspectos gerais da partícula viral (vírion).....	09
5.2. Proteína fator assistente ou <i>Helper component-proteinase</i> (HC-Pro).....	11
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
6.1. Clones e DNAs complementares (cDNA) utilizados nos experimentos.....	24
6.2.Preparo prévio e manutenção dos clones.....	26
6.2.1 Produção de células competentes de <i>E. coli</i>	26
6.2.2 Transformação das células competentes de <i>E. coli</i>	27
6.2.3.Minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina (miniprep).....	27
6.2.4 Preparo das culturas permanentes	28
6.3 Construção do LMV recombinante contendo a HC-Pro do PVY.....	28
6.3.1 Estratégia de clonagem.....	28
6.3.2 Digestão dos produtos amplificados e do LMVinc com enzima de restrição.....	30

6.3.3 Isolamento e purificação dos fragmentos digeridos.....	30
6.3.4 Reação de ligação.....	31
6.3.5 Verificação da orientação do inserto através de digestão <i>DraI/XbaI</i>	31
6.3.6 Sequenciamento dos clones recombinantes LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut.....	32
6.3.7 Inserção do LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut no Exba199 para obtenção do clone infeccioso.....	32
6.3.8 Reação de ligação.....	33
6.3.9 Verificação da orientação do inserto através de digestão <i>BamHI/XhoI</i>	33
5.3.10 Terminologia utilizada para os clones recombinantes obtidos.....	34
6.4 Inoculação dos vírus e análise da progênie RNA viral.....	34
6.4.1 Inoculação via biobalística dos isolados em alfaces (<i>Lactuca sativa</i>) cv Trocadero.....	34
6.4.1.1 Obtenção do DNA plasmidial para a realização dos experimentos de biobalística.....	34
6.4.1.2 Precipitação do DNA sobre as micropartículas de ouro.....	35
6.4.1.3 Precipitação das micropartículas de ouro cobertas com DNA no tubo de teflon.....	35
6.4.2. Avaliação da infectividade das plantas inoculadas.....	36
6.4.2.1 Extração de RNA total dos tecidos foliares.....	36
6.4.2.2. Amplificação por transcrição reversa/reação em cadeia pela polimerase – RT/PCR.....	37

6.4.2.3 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	37
6.4.2.4. Oligonucleotídeos específicos usados na amplificação das regiões de recombinação entre LMV e a HC-Pro do PVY.....	38
6.4.2.5 Reação de PCR.....	39
6.4.2.6 Isolamento, purificação e seqüenciamento dos fragmentos amplificados.....	39
6.4.2.7. Avaliação biológica dos vírus recombinantes.....	40
6.4.2.8 Análise por RT-PCR dos vírus recombinantes nas plantas inoculadas..	40
6.4.2.9 Análise do acúmulo viral dos vírus recombinantes.....	41
6.4.2.10 Extração e desnaturação de proteínas totais das folhas.....	41
6.4.2.11 Análise do acúmulo da proteína viral através de “Western blot”.....	41
7. RESULTADOS.....	43
7.1 Construção do LMV recombinante contendo a HC-Pro de PVY.....	43
7.1.1 Digestão do isolado LMVinc com a endonuclease de restrição <i>AatII</i>	43
7.1.2 Amplificação das regiões codificadoras da HCwt e Hcmut e inserção no LMVinc.....	44
7.1.3 Identificação dos clones recombinantes dos isolados LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut com a posição do inserto 5’-3’ através da digestão <i>DraI/XbaI</i>	45
7.1.4 Análise dos recombinantes incompletos LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut.....	46
7.1.5. Inserção do LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut em Exba199 através de digestão com a endonuclease de restrição <i>XbaI</i>	47

7.1.6 Análise do perfil eletroforético dos clones infecciosos Exba199+HCwt e Exba199+Hcmut através de digestão com as endonucleases de restrição <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I.....	48
7.2 Sintomatologia das plantas bombardeadas.....	49
7.3 Confirmação da presença dos vírus nas plantas inoculadas via biobalística através de RT-PCR.....	54
7.4. Confirmação da identidade dos recombinantes Exba199+HCwt e Exba199+HCmut através de RT-PCR empregando os oligonucleotídeos LMV/PVY I e II.....	55
7.5. Análise da sequência dos produtos amplificados.....	56
7.6. Sintomatologia das plantas de alface cv. Trocadero inoculadas com os extratos das plantas bombardeadas com os vírus híbridos Exba199+HCwt e Exba199+HCmut e o Exba199.....	57
7.7 Análise do acúmulo de RNA viral nas 4 semanas pós-inoculação.....	57
7.8 Avaliação do acúmulo de RNA viral em função do número de ciclos de PCR	58
7.9 Detecção da proteína do capsídeo do LMV através de “Western blot”.....	59
8. DISCUSSÃO.....	61
9. CONCLUSÕES.....	68
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1 – Representação esquemática do genoma dos <i>Potyvirus</i>	10
FIGURA 2 – Representação esquemática das regiões da proteína HC-Pro e suas respectivas funções.....	11
FIGURA 3 - Representação esquemática da proteína HC-Pro e de seus domínios de ligação a RNA.....	25
FIGURA 4 - Representação esquemática do genoma completo do <i>Lettuce mosaic virus</i> Exba 199 e do LMVinc utilizados para a construção dos vírus LMV recombinantes.....	29
FIGURA 5 - Análise da digestão do isolado LMVinc pela endonuclease de restrição <i>AatII</i>	44
FIGURA 6 - Análise dos produtos de amplificação correspondentes às regiões codificadoras da HCwt e HCmut.....	45
FIGURA 07 - Análise em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo do DNA plasmidial dos clones recombinantes através de digestão <i>DraI/XbaI</i>	46
FIGURA 08 - Análise em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo (0,1 µg/ml) dos fragmentos amplificados com os oligonucleotídeos específicos para a HC-Pro do PVY.....	47

FIGURA 09. Análise em gel de agarose 1%, corado em brometo de etídeo da digestão do Exba199, LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut com a endonuclease de restrição <i>Xba</i> I.....	48
FIGURA 10. Análise em gel de agarose 1%, corado em brometo de etídeo do perfil eletroforético dos clones digeridos pelas endonucleases de restrição <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I.....	49
FIGURA 11A. Alface (<i>Lactuca sativa</i>) cultivar Trocadero, bombardeada com o Exba199 (7 d.p.i), apresentando sintomas sistêmicos de mosaico, clareamento de nervura, pontos cloróticos.....	50
FIGURA 11B. Alface (<i>Lactuca sativa</i>) cultivar Trocadero, bombardeada com o Exba199 (16 d.p.i), apresentando sintomas sistêmicos de mosaico, clareamento de nervura, deformação foliar, pontos cloróticos, bolhosidades e necrose.....	51
FIGURA 12. Alface (<i>Lactuca sativa</i>) cultivar Trocadero, bombardeada com o Exba199+HCwt (14 d.p.i), apresentando sintomas sistêmicos de mosaico, clareamento de nervura, pontos cloróticos e mancha clorótica.....	52
FIGURA 13. Alface (<i>Lactuca sativa</i>) cultivar Trocadero, inoculada via biobalística com o Exba199+HCmut (18 d.p.i), apresentando sintomas sistêmicos de clareamento de nervura e pontos cloróticos.....	53
FIGURA 14. Análise por RT-PCR dos isolados inoculados via biobalística nas plantas de alface originando um fragmento de 278 pb.....	54

FIGURA 15. Confirmação da identidade dos recombinantes Exba199+HCwt e Exba199+HCmut através de RT-PCR.....	55
FIGURA 16. Seqüência parcial da região central da HC-Pro PVY inserida no LMVExba199.....	56
FIGURA 17. Avaliação do acúmulo de RNA viral nas plantas de alface inoculadas com os vírus híbridos e o Exba199 durante o período de amostragem (7, 14, 21, 28 d.p.i) empregando RT-PCR.....	58
FIGURA 18. Análise do acúmulo de RNA viral em função do número de ciclos de PCR.....	59
FIGURA 19. Detecção do acúmulo da proteína do capsídeo do Exba199.....	60

1. RESUMO

O gênero *Potyvirus* é um dos maiores dentre os vírus de planta com genoma composto por RNA. O genoma dos potyvirus codifica um único polipeptídeo que é processado por três proteinases virais que originam todas as proteínas necessárias para complementar o ciclo da infecção. A proteína HC-Pro (Helper Component proteinase) é uma dessas proteínas multifuncionais que está envolvida na amplificação do genoma, transmissão por afídeo, movimento sistêmico e local, supressão do silenciamento gênico e proteólise. Nesse trabalho, foi realizada a substituição funcional de parte da região codificadora da HC-Pro do *Lettuce mosaic virus* (LMV) com a porção correspondente à HC-Pro do *Potato virus Y* (PVY), com o objetivo de melhor compreender os papéis dessa proteína no ciclo de infecção dos potyvirus. O LMV e o PVY diferem tanto em patogenicidade quanto em círculo de hospedeiros. O LMV infecta, principalmente, espécies da família *Asteraceae* (alface) enquanto o PVY infecta *Solanaceae*. Para avaliar o efeito de tal substituição na infectividade, dois vírus quiméricos foram construídos: um clone infeccioso de LMV contendo a HC-Pro selvagem do PVY (estendendo-se dos aminoácidos 1 a 352) e um segundo clone contendo a HC-Pro de PVY com mutação no motivo conservado IGN (mutado para RPN). Os vírus recombinantes e o LMV selvagem foram inoculados via biobalística em folhas de plântulas de alface cv. Trocadero (suscetível ao LMV). A presença e a natureza das progênies virais foram avaliadas por RT-PCR e sequenciamento. Todos os vírus recombinantes foram infectivos causando infecção

sistêmica, embora os sintomas tenham sido atenuados se comparados com o LMV selvagem. O acúmulo desses vírus nessas plantas foi avaliado indiretamente através de ciclos diferenciais de RT-PCR. Tais análises demonstraram que enquanto o LMV selvagem foi amplificado a partir de trinta ciclos, os recombinantes só foram amplificados com quarenta ciclos, sugerindo um título mais baixo desses vírus nas plantas infectadas. Esses resultados sugerem que as principais funções biológicas da HC-Pro podem ser complementadas por proteínas heterólogas.

MOLECULAR ANALYSIS OF THE HC-Pro (Helper Component-proteinase) PROTEIN AND ITS ROLE IN THE RELATIONSHIPS BETWEEN PATHOGENS-HOST. Botucatu, 2006. 79p. Tese (Doutorado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: DESIRÉ SPADA DOS SANTOS FRANGIONI

Adviser: MARCELO AGENOR PAVAN

Co-adviser: IVAN DE GODOY MAIA

2. SUMMARY

The genus *Potyvirus* is one of the largest genera of plant RNA viruses. The potyvirus genome encodes a single polypeptide that is processed by three viral proteinases to yield all viral proteins needed for the infection cycle. One of these proteins is the multifunctional helper component proteinase (HC-Pro), which is involved in genome amplification, aphid transmission, local and systemic movement, suppression of gene silencing and proteolysis. To gain further understanding of the roles of this protein in the *Potyvirus* life cycle, the functional replacement of the HC-Pro coding region of *Lettuce mosaic virus* (LMV) with its corresponding counterpart of *Potato virus Y* (PVY) was performed. These viruses differ both in pathogenicity and in host range. LMV infects mainly *Asteraceae* while PVY infects *Solanaceae*. To assess the functional requirement of a homologous HC-Pro in infectivity, two different chimeric viruses were constructed *i. e.*: a full-length LMV containing a wild type PVY HC-Pro (1aa to 352aa) and a full-length LMV containing a PVY HC-Pro with a mutation in the IGN motif (exchanged to RNP). The chimeras, and wild type LMV, were inoculated by biolistic in young lettuce plants. The presence and nature of viral progenies were checked by RT-PCR amplification followed by sequencing. All recombinant viruses were infectious and displayed systemic infection although the symptoms were weak when compared to the wild type LMV. The viruses accumulation were evaluated by differential cycles in the RT-PCR. The LMV wild type was amplified by 30 cycles while the chimerics viruses needed 40 cycles. Therefore this result indicating that the chimeric viruses titer were lower than LMV wild type. The results

described here demonstrated that the main biological functions of HC-Pro can be accomplished by heterologous protein.

3. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família botânica *Asteraceae*. É originária da região do Mediterrâneo, e vem sendo cultivada há mais de 2000 anos (Lindqvist, 1960). Entre as hortaliças folhosas é a de maior importância econômica (Camargo, 1993), sendo uma das mais apreciadas para consumo *in natura* no Brasil e no mundo.

Dentre os principais produtores mundiais encontram-se os Estados Unidos, a Espanha, França e Itália (Subbarao, 1998). O Brasil é o maior produtor da América do Sul, sendo o Estado de São Paulo um dos maiores responsáveis por esta produção, com uma área cultivada de aproximadamente 7859 hectares, produzindo 137 mil toneladas/ano e gerando mais de 6000 empregos (www.ceagesp.gov.br), além do cultivo hidropônico que vem aumentando nos últimos anos. Sua produção ocorre, basicamente, nos cinturões-verdes das grandes cidades envolvendo uma grande demanda de mão-de-obra possuindo, portanto, um relevante papel sócio-econômico, além da movimentação de capital, gerado nessa cadeia produtiva.

A cultura de alface apresenta vários problemas fitossanitários, destacando-se as doenças causadas por vírus que são transmitidas por diferentes vetores e por sementes. De acordo com as condições ambientais e os cuidados dispensados a cultura, as viroses podem causar perdas que chegam a 100%.

A doença viral mais importante da alface é o mosaico, causado pelo *Lettuce mosaic virus* (LMV). O LMV é transmitido tanto por sementes quanto por afídeos e

encontra-se disseminado no mundo inteiro devido ao comércio internacional de sementes. As plantas afetadas podem apresentar redução no crescimento, mosaico, mosqueado, deformação foliar e até necrose (Dinant & Lot, 1992). A ocorrência do LMV no Brasil é generalizada e sua incidência provoca significativas perdas econômicas (Stangarlin, 1995; Pavan & Kurozawa, 1997; Krause-Sakate, 2001).

O LMV pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* (Fauquet *et al.*, 2005). O *Potato virus Y* (PVY) é o membro tipo do gênero *Potyvirus* e infecta naturalmente solanáceas, causando danos qualitativos e econômicos em todo o mundo (Shukla *et al.*, 1994; Fauquet *et al.*, 2005, Walsh *et al.*, 2001). Esses vírus diferem tanto em patogenicidade quanto em círculo de hospedeiros. O LMV infecta naturalmente Asteraceae enquanto que o PVY infecta Solanaceae (Fauquet *et al.*, 2005).

O genoma dos potyvirus é constituído por uma molécula de RNA fita simples, cuja tradução origina uma poliproteína. Essa poliproteína é autoprocessada em proteínas funcionais do vírus através da atividade proteolítica de três proteases de origem viral (P1, HC-Pro e NIa), originando de 8 a 10 produtos finais (Carrington *et al.*, 1990; Maia *et al.*, 1996). As proteínas sintetizadas pelos potyvirus são multifuncionais, desempenhando várias funções durante o ciclo de infecção (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Dentre as proteínas multifuncionais dos potyvirus, a proteína “Helper Component-proteinase” (HC-Pro) é essencial em diferentes etapas do ciclo viral tais como, interação vírus-vetor, processamento da poliproteína, fator acessório para a replicação do genoma viral, disseminação célula-célula, movimento sistêmico do vírus na planta hospedeira, na transmissão do vírus por semente, no sinergismo viral e como determinante de sintomatologia e na inibição da resposta de defesa da planta atuando como supressor do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (Maia *et al.*, 1996; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Análises da molécula HC-Pro através de deleções revelaram uma organização dividida em domínios funcionais. Na transmissão do vírus por afídeos, por exemplo, o domínio envolvido está localizado na região N-terminal (Atreya & Pirone, 1993). O domínio envolvido com a replicação, movimento e supressão de silenciamento está presente na região central da proteína (Cronin *et al.*, 1995; Kasschau & Carrington, 1995; Kasschau & Carrington, 1998; Anandalakshmi *et al.*, 1998). Recentemente,

demonstrou-se que o papel da HC-Pro na replicação e no movimento são efeitos indiretos da atividade de supressão de silenciamento da proteína (Kasschau & Carrington, 2001). A região conservada C-terminal, considerada o terceiro domínio da proteína, está relacionada com a sua atividade proteolítica (Carrington *et al.*, 1989a). Adicionalmente, mutações na HC-Pro estão diretamente relacionadas com a diminuição da virulência e expressão de sintomas (Atreya *et al.*, 1992, Atreya & Pirone, 1993, Kasschau & Carrington, 1995, Tribodet *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que apesar da proteína HC-Pro apresentar funções bem definidas, os conhecimentos sobre os mecanismos moleculares envolvidos nas interações entre as referidas funções são ainda insipientes (Maia *et al.*, 1996; Plisson *et al.*, 2003). Além disso, seu papel relevante na patogenicidade durante as diversas etapas do ciclo da infecção viral, extrapola o mérito dessas funções, indicando que sua atuação interage ainda com fatores do hospedeiro, desencadeando processos que interferem na sintomatologia (Krause-Sakate, 2001).

A melhor estratégia de controle da doença viral é a sua prevenção, que somente se torna possível através da caracterização do vírus e do conhecimento de suas interações com a planta hospedeira. Estudos que elucidem essas relações são necessários pois, além de gerarem informações importantes sobre o ciclo viral, fornecem subsídios para a adoção de medidas de controle.

4. OBJETIVO

O objetivo geral desse trabalho foi investigar o papel da proteína HC-Pro na relação patógeno-hospedeiro através de análise funcional e biológica, utilizando o LMV como modelo. Dessa forma, investigou-se a viabilidade de um LMV recombinante contendo um cDNA codificando a região amino terminal e o domínio central da HC-Pro do PVY. Os efeitos da substituição dessas regiões na sintomatologia e virulência foram examinados, determinando a especificidade de ação dessa proteína entre os potyvirus.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Taxonomia e aspectos gerais da partícula viral (vírion)

O LMV e o PVY pertencem ao gênero *Potyvirus* da família *Potyviridae*, que possui outros cinco gêneros (*Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*) divididos de acordo com o número de componentes do genoma e o tipo de vetor. A família *Potyviridae* é integrante do supergrupo Picornavirus que possui vírus que infectam plantas e animais. Esse supergrupo engloba vírus cuja molécula de RNA está ligada em sua extremidade 5', de forma covalente, a uma proteína de origem viral denominada VPg ("viral protein – genome-linked") (Riechmann *et al.*, 1989, Koonin & Dolja, 1993; Ryan & Flint, 1997, Fauquet *et al.*, 2005).

O gênero *Potyvirus* possui partículas de estrutura filamentosa e flexuosa, medindo aproximadamente 750 nm de comprimento e 15 nm de largura. O genoma viral é constituído por uma única molécula de RNA fita simples de sentido positivo com cerca de 10.080 nucleotídeos, poliadenilado em sua extremidade 3', envolvido por um capsídeo (Fauquet *et al.*, 2005). O RNA genômico apresenta uma única fase aberta de leitura (open reading frame-ORF), localizada entre as duas regiões não codificadoras denominadas 5'NTR e 3'NTR (*non translated region*), cuja tradução origina uma poliproteína com peso molecular entre 340-370 kilodaltons (kDa). Essa poliproteína é autoprocessada em proteínas funcionais do vírus, através da atividade proteolítica de três proteases de origem viral (P1, HC-Pro e NIa), originando de 8 a 10 produtos finais

(Carrington *et al.*, 1990; Maia *et al.*, 1996; Ryan & Flint, 1997). A protease NIa (*Nuclear Inclusion a*) catalisa sua própria clivagem em *cis* e outras seis clivagens em *trans*, enquanto P1 e HC-Pro agem apenas em *cis*, efetuando suas próprias clivagens (FIGURA 1) (Carrington, *et al.*, 1989; Riechmann *et al.*, 1992; Kasschau & Carrington, 1995).

As proteínas sintetizadas pelos potyvirus são multifuncionais, desempenhando várias funções durante o ciclo de infecção (FIGURA 1) (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

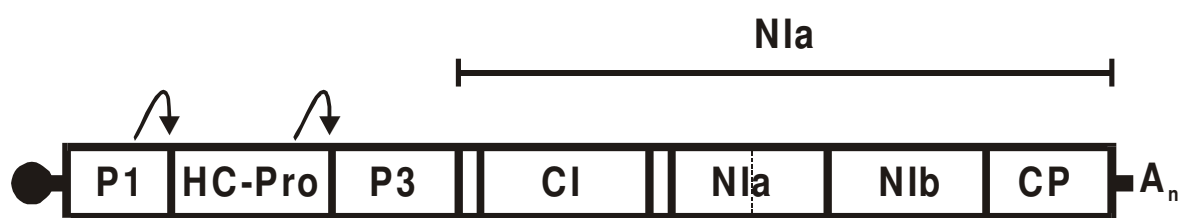


FIGURA 1. Representação esquemática do genoma dos *Potyvirus*. Em destaque a atividade proteolítica originando as proteínas necessárias para o ciclo viral, as setas demonstram a P1 e a HC-Pro atuando como proteinase em *cis*. A NIa age como proteinase em sua própria clivagem em *cis* e seis clivagens adicionais em *trans*. P1 → fator acessório para a replicação do genoma viral; HC-Pro → (funções descritas no próximo item); P3 → fator auxiliar para replicação do genoma viral; CI → (Inclusão cilíndrica) atua como helicase e ATPase na replicação e auxilia no movimento célula a célula; NIa → (Inclusão nuclear a / Pro-VPg) proteinase e fator iniciador para a replicação do RNA viral; NIb → (Inclusão nuclear b) atua como RNA polimerase dependente de RNA; CP (Capa protéica) → encapsidação do genoma, transmissão por afídeos, movimento célula a célula, movimento a longa distância e replicação.

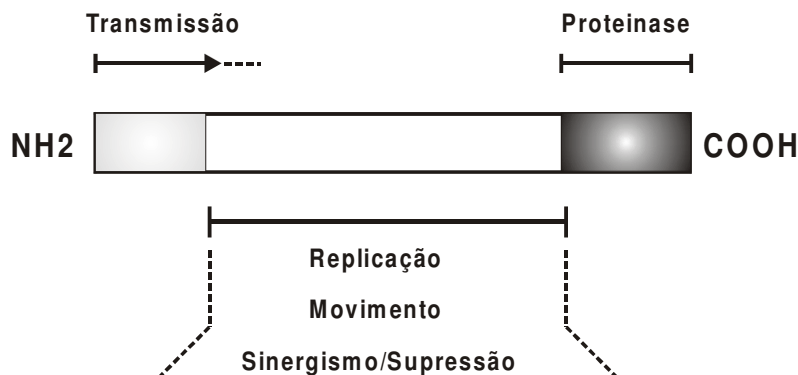


FIGURA 2: Representação esquemática das regiões da proteína HC-Pro e suas respectivas funções. NH₂ → porção amino-terminal (em cinza claro) e COOH → porção carboxi-terminal (cinza escuro). O restante corresponde à região central da proteína (em branco).

5.2 Proteína fator assistente ou *Helper component-proteinase* (HC-Pro)

Dentre as proteínas multifuncionais dos potyvirus, a proteína “Helper Component-Proteinase” (HC-Pro) é essencial em diferentes etapas do ciclo viral (Maia *et al.*, 1996; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

A proteína HC-Pro pode ser esquematicamente dividida em três regiões funcionais, a região N-terminal essencial no processo de transmissão, a região C-terminal responsável pela atividade proteolítica e a região central envolvida em todas as outras funções descritas (FIGURA 2). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que na realidade a maioria das funções se sobrepõe ao longo da seqüência de aminoácidos da proteína (Plisson *et al.*, 2003).

A região central da HC-Pro (aminoácidos 100-300) é geralmente apontada como importante para a replicação através do motivo funcional IGN (aminoácidos 260-262), no sinergismo com outros vírus e movimento sistêmico dentro da planta hospedeira (motivo funcional CC/SC; aminoácidos 292-295) (Cronin *et al.*, 1995; Kasschau *et al.*, 1997). Esta região apresenta ainda uma atividade de ligação não específica com ácidos nucleicos, preferencialmente RNA fita simples (Maia & Bernardi, 1996).

Estudos preliminares demonstraram que a HC-Pro atua na interação vírus-vetor como fator assistente de transmissão, indispensável durante a disseminação do vírus pelo afídeo (Pirone, 1981). O desenvolvimento do conceito de um componente auxiliar na transmissão (*helper component*), que resultou no nome dessa proteína, começou com o estudo sobre o *Potato virus C* (PVC), um *Potyvirus*, e o *Potato aucuba mosaic* (PAMV), um *Potexvirus*, ambos transmitidos por afídeos apenas na presença de infecção mista com o PVY (Kassanis, 1961).

Posteriormente, Kassanis & Govier (1971) observaram que a transmissão ocorria mesmo quando os afídeos adquiriam os vírus em plantas infectadas pelo PVC e PAMV, com a condição de que fossem previamente alimentados em plantas infectadas com PVY, portanto a infecção mista não era estritamente necessária. Além disso, o experimento demonstrou que a inversão de aquisição inviabilizou a transmissão do PVC e do PAMV. Dessa forma, firmou-se o conceito da necessidade de um componente auxiliar não estrutural, além da partícula viral, na transmissão dos potyvirus por afídeos (Govier & Kassanis, 1974).

Esse fato, juntamente com outros dados experimentais, sugeriram que a HC-Pro pode atuar como uma ponte ou conexão entre a partícula viral e o estilete do afídeo, onde os vírus são retidos e posteriormente inoculados nas plantas (Ammar *et al.*, 1994; Pirone & Blanc, 1996, Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005).

Dois motivos conservados foram mapeados por mutações pontuais na HC-Pro, cujas modificações foram associadas com a perda da capacidade de transmissão. O primeiro motivo, denominado KITC, lisina-isoleucina-treonina-cisteína (Lys-Ile-Thr-Cys), localizado na região N-terminal da proteína está relacionado com a retenção do vírus no estilete do afídeo. Experimentos com clones infecciosos mutantes do *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) e do *Tobacco etch virus* (TEV), revelaram que a mudança do aminoácido Lys (K) para Glu (E - ácido glutâmico) suprimiu a capacidade da HC-Pro em auxiliar a transmissão (Atreya *et al.*, 1992, Blanc *et al.*, 1998).

O segundo motivo conhecido como PTK, prolina-treonina-lisina (Pro-Thr-Lys), está localizado na porção C-terminal da região central da proteína. Sua alteração para PAK (A - alanina) na HC-Pro do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), resultou na perda da capacidade de transmissão do vírus e aboliu a ligação *in vitro* da

referida proteína com os vírions (Peng *et al.*, 1998). Portanto, o motivo KITC está envolvido na interação com o estilete do afídeo enquanto o PTK parece interagir com a CP (capa protéica) da partícula viral.

Há na região N-terminal da CP o motivo DAG (ácido aspártico-alanina-glicina), altamente conservado, considerado essencial nos potyvirus transmitidos por afídeos. Esse motivo foi caracterizado por comparações da sequência de aminoácidos entre isolados transmitidos por afídeos e os não transmitidos. Mutações pontuais nessa tríade de aminoácidos, ou nos aminoácidos adjacentes, resultaram em perda ou diminuição drástica da capacidade de transmissão (Atreya *et al.*, 1990, 1991, 1995).

Segundo López-Moya *et al.* (1999), o que realmente influencia a eficiência da transmissão não é a simples presença do motivo DAG ou equivalente, mas o contexto em que é encontrado próximo da região N-terminal da CP. Para os autores isso elucidaria porque vários potyvirus transmitidos por afídeos apresentam motivos de aminoácidos diferentes do DAG. Uma das razões poderia ser o fato de que mutações nos aminoácidos em torno do motivo DAG, ou equivalente, alteraria a conformação da proteína, afetando a exposição desses motivos e sua interação com a HC-Pro impossibilitando portanto a transmissão.

Blanc *et al.* (1997) demonstraram a existência de uma interação específica entre a HC-Pro e a CP do TVMV. Comparações entre variantes desse vírus, contendo mutações no DAG da CP, indicaram uma estreita relação entre a transmissão por afídeo e a capacidade de se ligar a HC-Pro. Estirpes não transmissíveis do TVMV não apresentaram essa ligação. A expressão da CP do TVMV em bactérias permitiu a identificação precisa da sequência de aminoácidos que determina a ligação com a HC-Pro, estando os mesmos (DTV DAGK) localizados na porção N-terminal da proteína (aminoácidos de 2 a 8).

Os potyvirus são transmitidos com eficiência variável por diversas espécies de afídeos e o motivo CCC presente na HC-Pro, além dos já conhecidos, parece estar diretamente relacionado com essa interação específica entre HC/CP (Flasinski & Cassidy, 1998). A variabilidade de sequências nessas regiões da HC-Pro parece ser responsável por regular a especificidade da transmissão (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Posteriormente, a atividade da HC-Pro como proteinase agindo em *cis* na sua porção C-terminal foi determinada, implicando a mesma no processamento da poliproteína viral (Carrington *et al.*, 1989a, Kasschau & Carrington, 1995). O domínio ativo da proteinase foi mapeado através de análises de deleção e mutações pontuais em cisteínas conservadas da porção C-terminal da HC-Pro do (TEV) (Carrington *et al.*, 1989b).

A proteína que anteriormente era denominada “Helper component”, passa então a ser chamada de HC-Pro (proteinase). O sítio de clivagem no TEV ocorre entre dois resíduos de glicina presentes na região C-terminal da HC-Pro, na junção com a P3, sendo esse cercado por aminoácidos conservados (Tyr-Val-Gly-Gly) essenciais no reconhecimento do sítio de clivagem (Carrington & Herdon, 1992). Várias evidências demonstraram que a HC-Pro age como uma proteinase do tipo papaína, onde uma cisteína ocupa o lugar de uma serina no sítio ativo (Oh & Carrington, 1989).

Outra função atribuída a HC-Pro é sua capacidade de auto-interação determinando sua conformação. Vários estudos demonstraram que a forma biologicamente funcional da HC-Pro em solução é um dímero e mesmo sendo a proteína capaz de formar complexos maiores (oligômeros), essa é a forma que prevalece (Thornbury *et al.*, 1985, Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999a, Plisson *et al.*, 2003, Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005). Por exemplo, para o TEV, o estudo em gradiente de sedimentação demonstrou estados heterogêneos da proteína compatíveis com dímeros, tetrâmeros, hexâmeros e octômeros, e em solução foram detectados cerca de 50% de dímeros, 20% de tetrâmeros e os restantes hexâmeros e octômeros (Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005). Dímeros foram observados na forma ativa da HC-Pro do TEV em plantas infectadas (Thornbury *et al.*, 1985), do PVY e do LMV em sistema duplo híbrido de levedura (Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999a) e para o PVA (Guo *et al.*, 1999).

Há controvérsias nos estudos sobre que partes da HC-Pro estariam envolvidas nessa auto-interação. Segundo Urcuqui-Inchima *et al.* (1999a,b) somente a região N-terminal estaria envolvida já que mutações nessa região na HC-Pro do LMV e do PVY demonstraram que os aminoácidos 83 e 72 respectivamente, são responsáveis pela interação. Por outro lado, Guo *et al.* (1999) apontam que tanto a região N-terminal quanto a C-terminal associadas promoveriam essa interação, como no caso do PVA em que estão envolvidos 24 aminoácidos do extremo da região N-terminal, e o domínio proteinase da porção C-terminal.

A ação da HC-Pro durante a transmissão parece ser a função mais influenciada pela estrutura dessa proteína, como foi demonstrado para diversas espécies de *Potyvirus* (Plisson *et al.*, 2003, Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005, Wang & Pirone, 1999). De acordo com o modelo de interação proposto por Ruiz-Ferrer *et al.* (2005), os motivos KITC e PTK poderiam estar separados em monômeros, cada um próximo de um dos extremos da molécula, e seus arranjos geométricos poderiam explicar como o dímero da HC-Pro interage com o vírion de um lado e com o estilete do afídeo do outro durante a transmissão, corroborando a hipótese da ponte.

A HC-Pro atua também durante a replicação viral como um fator acessório. Inicialmente a identificação de aminoácidos da HC-Pro envolvidos na replicação foi uma consequência de ensaios que procuravam elucidar os mecanismos envolvidos na transmissão por afídeos (Maia *et al.*, 1996). Como exemplo podemos citar a redução do acúmulo do TVMV com a substituição do aminoácido Lys por Glu (ácido glutâmico) na região N-terminal da HC-Pro, causando significativa atenuação de sintomas, quando comparado com o tipo selvagem. Além disso, houve recuperação da virulência quando se reverteu a substituição do referido aminoácido (Atreya *et al.*, 1992).

De acordo com Legavre *et al.* (1996), a mesma mutação pontual estava associada com a baixa taxa de acúmulo de uma estirpe do PVY fracamente transmitida por afídeo (PAT). Klein *et al.* (1994) apontam um mutante do TVMV com replicação defectiva devido à inserção de quatro aminoácidos na região N-terminal da HC-Pro. Ao contrário do TVMV, a região N-terminal da HC-Pro parece não ser fundamental para a replicação do TEV, que requer nesse caso a porção C-terminal e central da proteína.

Segundo Kasschau & Carrington (1995) a supressão da capacidade proteolítica da proteína inviabiliza a replicação do vírus. Mutantes do TEV que perderam a capacidade proteolítica não foram viáveis e a impossibilidade de complementar essa atividade, através da expressão em plantas transgênicas de uma HC-Pro selvagem, corroboraram sua atuação exclusiva em *cis*. Não apenas a capacidade proteolítica é importante para a amplificação do genoma, já que mutantes da região central da HC-Pro também apresentaram um quadro fenotípico de supressão da replicação. Esses mutantes, ao contrário dos mutantes da região C-terminal, puderam ser complementados em *trans* (Cronin *et al.*, 1995, Kasschau *et al.*, 1997).

Cronin *et al.* (1995) demonstraram que o papel da HC-Pro na replicação viral é distinto ao desempenhado para o movimento sistêmico e envolvem diferentes seqüências conservadas de aminoácidos da proteína. Ensaio com vírus defectivos com mutações na região central da proteína indicaram que alterações no motivo conservado CCCE afetam o movimento a longa distância, mas conservam uma taxa de 25% de replicação quando comparado com o vírus selvagem. Por outro lado, mutantes com alterações no motivo conservado IGN apresentaram taxa de replicação menor que 1%, com limitado movimento sistêmico. Portanto, pode-se concluir que o motivo IGN está envolvido com a amplificação do genoma e o CCC com o movimento sistêmico do vírus na planta hospedeira (Cronin *et al.*, 1995, Kasschau *et al.*, 1997). Além disso, o fato de uma HC-Pro funcional expressa em plantas transgênicas ser capaz de restaurar o movimento a longa distância do mutante defectivo (CCCE) sem conseguir estimular a sua replicação *em trans*, indicam que o movimento e a replicação são funções distintas.

O envolvimento da HC-Pro na amplificação do genoma implica na possibilidade de afinidade da proteína pelo RNA viral. A capacidade de se ligar ao ácido nucléico foi demonstrada para os vírus PVY e PVA (Maia & Bernardi, 1996, Merits *et al.*, 1998). Posteriormente, foram identificados na HC-Pro do PVY, através de deleções, dois domínios independentes de ligação ao RNA na região central da proteína, o domínio A (aminoácidos 89-230) e o domínio B (aminoácidos 234-321) (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000). O domínio B apresenta um motivo ribonucleoprotéico (RNP) encontrado em uma grande família de proteínas, as ribonucleoproteínas, envolvidas em processamento e transporte de RNA, expressão gênica e desenvolvimento celular (Maia & Bernardi, 1996; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000). Mutações no motivo RNP demonstraram que uma tirosina na posição 288 é indispensável para a ligação ao RNA (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000).

A infecção sistêmica das plantas por vírus envolve três etapas, a replicação inicial do vírus no interior das células infectadas, depois ocorre o movimento a curta distância (célula a célula), onde o vírus se move para as células adjacentes passando pelos plasmodesmas e posteriormente se estabelece o transporte a longa distância, em que o vírus se dissemina através do sistema vascular e infecta células e órgãos distantes do sítio primário da infecção (Rojas *et al.*, 1997). É importante salientar que para atingir o sistema vascular o vírus passará do mesófilo para a bainha, seguirá pelo parênquima floemático,

células companheiras até atingir o elemento de tubo crivado, incorporando-se aos fotoassimilados no floema, cujo fluxo ocorre de forma passiva no sentido fonte-dreno (Carrington *et al.*, 1996).

Estudos indicam que o limite de exclusão de tamanho dos plasmodesmas (SEL) entre as células do mesófilo está entre 0,75-1.0 kDa e que a proteína de movimento (MP) do *Tobacco mosaic virus* (TMV) aumenta esse limite para 9.4-17.2 kDa (Wolf, *et al.*, 1989).

Embora esse mecanismo seja similar para a maioria dos vírus vegetais, vale citar que os potyvirus não possuem uma proteína específica de movimento, mas possuem proteínas multifuncionais envolvidas nesse mecanismo. Já foram experimentalmente identificadas algumas proteínas envolvidas no movimento dos potyvirus, como a CP (capa protéica), a HC-Pro, a CI (inclusão cilíndrica protéica), a VPg e o peptídeo 6K₂ (revisado por Revers *et al.*, 1999a). Além disso, tanto a 6K₂ quanto a VPg são determinantes de especificidade do hospedeiro para o movimento dos potyvirus (Nicholas *et al.*, 1997, Rajamäki *et al.*, 1999, Schaad *et al.*, 1997).

A primeira evidência experimental do potencial papel da HC-Pro no movimento dos potyvirus foi demonstrado através da inserção de quatro aminoácidos na região N-terminal da proteína, resultando em um mutante do TVMV deficiente para o movimento, incapaz de se disseminar nas folhas inoculadas (Klein *et al.*, 1994). Vários mutantes de TEV contendo alterações na HC-Pro apresentaram um movimento célula-célula menos eficiente que o vírus selvagem (Kasschau *et al.*, 1997).

Estudos utilizando transcritos quiméricos do TEV carregando o gene repórter *uidA* que codifica a β -glucuronidase (GUS) e contendo mutações na HC-Pro, permitiram desvendar os efeitos de algumas das mutações citadas anteriormente no movimento a longa distância (Cronin *et al.*, 1995, Kasschau *et al.*, 1997). A avaliação das etapas do movimento viral dentro das folhas inoculadas, por localização *in situ* do gene repórter GUS, sugeriram que o mutante TEV-GUS/CCCE foi bloqueado em uma etapa avançada da via de movimento, provavelmente no deslocamento dentro dos elementos de tubo crivado ou na saída do sistema vascular (Kasschau *et al.*, 1997).

A expressão das proteínas CP e HC-Pro do *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) e do LMV em *Escherichia coli* e a análise das mesmas em

estudos de microinjeção *in planta*, demonstraram que essas proteínas se movimentam célula-a-célula, aumentam o limite de exclusão dos plasmodesmas e facilitam o movimento do RNA viral. Mutações na região central da CP e deleções na região C-terminal da HC-Pro inviabilizaram o movimento célula-a-célula dos vírus mutantes (Rojas *et al.*, 1997). Segundo os autores, esses resultados indicam que os potyvirus codificam ao menos duas proteínas de movimento (MP), a CP e a HC-Pro, sugerindo uma interação entre a CP, HC-Pro e os plasmodesmas. Discutem ainda, que a HC-Pro desempenha de forma mais eficiente que a CP a função de MP, pois se move célula-a célula com mais frequência e mais rápido, além de aumentar o limite de exclusão dos plasmodesmas em torno do quádruplo do valor observado para a CP.

Segundo Sáenz *et al.* (2002), a HC-Pro poderia ser um fator relevante no controle do círculo de hospedeiros dos potyvirus, como fator de especificidade. Vários estudos demonstraram que uma HC-Pro defectiva está relacionada com um movimento sistêmico deficiente. Por outro lado, os experimentos demonstraram que a deficiência de movimento do *Plum pox virus* (PPV) em algumas espécies de tabaco pode ser superada por vírus relacionados, através da complementação com a HC-Pro do TEV por exemplo, ou com vírus não relacionados, como o *Cucumber mosaic virus* (CMV), que provavelmente compensou a deficiência de movimento do PPV com a proteína 2b. Tais resultados demonstram que alguns determinantes do movimento a longa distância dos potyvirus não são estritamente vírus-específicos.

Recentemente, foi construído um clone infeccioso do *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) sem o gene correspondente à HC-Pro que, contrário a todas as evidências, infectou sistemicamente trigo, aveia e milho, indicando que a HC-Pro foi dispensável para a replicação e o movimento do vírus nas plantas. Estudos demonstraram que a P1 foi responsável pela clivagem entre P1/P3 do vírus defectivo. Embora o referido WSMV defectivo tenha completado a formação do vírion, seu título comparado com o vírus selvagem foi 4,5 vezes menor (Stenger *et al.*, 2005a).

Uma evidência adicional para o envolvimento da HC-Pro no movimento dos potyvirus pode estar relacionada à sua capacidade de se ligar ao RNA, como foi demonstrado por Maia & Bernardi (1996). Por outro lado, o papel na amplificação do genoma e no movimento viral podem ser duas facetas da ação da HC-Pro como

supressora da resposta de defesa da planta, mais especificamente da sua capacidade de suprimir o silenciamento gênico nas plantas (Pruss *et al.*, 1997; Kasschau & Carrington, 1998).

A natureza e a extensão dos sintomas em um hospedeiro específico depende tanto do vírus ou da estirpe do mesmo, como das condições ambientais que influenciam sua fisiologia e seu desenvolvimento. Os sintomas são o resultado de uma complexa interação celular do hospedeiro com o vírus. Os efeitos podem ser a consequência do desvio dos recursos da planta para a síntese de proteínas e ácido nucléico vírus-específico e/ou do transtorno que os produtos virais causam nos processos celulares (Revers *et al.*, 1999a).

Várias regiões do genoma e proteínas dos potyvirus estão envolvidas na sintomatologia, inclusive a HC-Pro. De um modo geral, os sintomas induzidos pelos potyvirus, compreendem mosaico, clorose, clareamento de nervura, mosqueado, deformações foliares, pontos necróticos e necrose generalizada causando a morte da planta, podendo atingir flores, frutos e sementes (Shukla *et al.*, 1994).

Análises das mutações do genoma do TVMV demonstraram que as regiões codificadoras da P1/HC-Pro estão envolvidas na expressão de sintomas em tabaco, principalmente a região 5' da HC-Pro cuja mutação resultou em atenuação de sintomas (Atreya *et al.*, 1992; Atreya & Pirone, 1993; Klein *et al.*, 1994).

German-Retana *et al.* (2000) investigaram o papel da HC-Pro na manifestação de sintomas através da inserção dos genes repórter *uidA*, que codifica para a β -glucoronidase (GUS), ou do *gfp* que codifica para a “green fluorescent protein” (GFP) na região codificadora dessa proteína no LMV E. Nesse caso foi observada uma atenuação dos sintomas nas cultivares suscetíveis e a perda da virulência na cultivar resistente, abolindo a capacidade do vírus quebrar a resistência. Semelhante atenuação de sintomas já havia sido observada quando o gene *uidA* foi inserido antes da região N-terminal da HC-Pro do TEV (Dolja *et al.*, 1992).

A análise de diferentes isolados do PPV demonstrou que a variação na intensidade dos sintomas é resultado de mutações na HC-Pro, reforçando o papel dessa proteína como determinante de sintomatologia. Apesar de possuírem alta identidade de seqüências, os isolados apresentaram ampla diferença de patogenicidade em plantas

perenes e herbáceas e a severidade de sintomas não estava relacionada com o acúmulo viral. A análise das seqüências e estudos com mutações pontuais demonstraram que a alteração de um simples aminoácido na HC-Pro causou efeitos drásticos na sintomatologia de plantas herbáceas e uma mudança na infectividade do vírus em plântulas de pêssago (Sáenz *et al.*, 2001).

Segundo Gal-On (2000), a mutação pontual no motivo conservado Phe-Arg-Asn-Lys (FRNK) da HC-Pro do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), através da substituição de uma arginina por uma isoleucina, alterou a expressão de sintomas em cucurbitáceas tornando-os mais moderados. Nesse contexto, a caracterização do determinante molecular envolvido no sintoma de necrose de nervura induzido pelo PVY^N em *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi, demonstrou que a porção C-terminal da HC-Pro, incluindo os aminoácidos lisina (K₄₀₀) e ácido glutâmico (E₄₁₉), está envolvida na determinação deste sintoma (Tribodet *et al.*, 2005).

A transmissão pela semente não é um mecanismo universal para os potyvirus. Dentre os vírus deste gênero que apresentam esse tipo de transmissão pode-se citar o LMV e o PSbMV (*Pea seed-borne mosaic virus*), sendo que o mecanismo melhor estudado foi para o PSbMV infectando ervilhas (Wang & Maule, 1992, 1994, Johansen *et al.*, 1996).

Os vírus realmente transmitidos pela semente são aqueles que infectam o tecido embrionário (Hull, 2002). Segundo Wang & Maule (1992), a transmissão ocorre através de uma interação em que o vírus infecta o embrião imaturo após a fertilização e não através de gametas infectados. De acordo com o modelo proposto, a infecção ocorre via suspensor embrionário e, como essa estrutura degenera rapidamente no início do desenvolvimento da semente, o vírus deve ser capaz de se movimentar de forma bastante eficiente. A HC-Pro é um dos determinantes virais que estão envolvidos nessa transmissão, embora seu papel não esteja muito claro (Johansen *et al.*, 1996). O nível de transmissão pela semente para o PSbMV infectando ervilhas parece estar relacionado com a interação entre os vários determinantes virais e os múltiplos genes expressos pelo hospedeiro (Wang & Maule, 1994; Johansen *et al.*, 1996).

Outra função atribuída a HC-Pro é o sinergismo e refere-se a infecções mistas de potyvirus com vírus não relacionados, ocasionando sintomas mais

drásticos do que na infecção de apenas um dos vírus. Observou-se que o vírus não relacionado apresenta um acúmulo maior de partículas virais, sem ocorrer diminuição do acúmulo dos potyvirus. Essa interação, em que um vírus favorece o outro, foi relatada por Rochow & Ross (1955) envolvendo o *Potato virus X* (PVX) e o PVY. Vance (1991) verificou que o acúmulo do PVX, em infecção mista com o TEV, pode ser três a dez vezes maior se comparado com a infecção simples. Esse efeito sinérgico foi relacionado com a ação do vírus interferir com a resposta de defesa da planta, que normalmente limita a infecção viral (Ratcliff *et al.*, 1997).

A análise dessas infecções sinérgicas, envolvendo potyvirus, demonstrou que a HC-Pro pode agir como um amplificador da patogenicidade e, que a região do vírus responsável por esse efeito sinérgico envolve a porção 5' do genoma viral, que compreende os genes codificadores para as proteínas P1, HC-Pro e parte da P3, principalmente P1/HC-Pro (Vance *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997). Além disso, mutações pontuais na região codificadora do domínio central da HC-Pro eliminaram a habilidade dessa proteína em mediar o sinergismo entre PVX/TEV em plantas transgênicas (Shi *et al.*, 1997).

Simultaneamente três grupos concluíram que a HC-Pro tem a capacidade de suprimir o PTGS, e conseqüentemente há um aumento da replicação viral (Anandalakshmi *et al.*, 1998, Brigneti *et al.*, 1998, Kasschau & Carrington, 1998). O PTGS é um mecanismo de defesa da planta contra vírus que restringe o acúmulo viral nas células infectadas e retarda a disseminação do vírus na planta (Baulcombe, 1996, Pruss *et al.*, 1997, Lu *et al.*, 2003). A ação do PTGS na infecção viral é processada por um mecanismo similar ao descrito na interferência por RNA (RNAi), onde a inoculação de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) em *Caenorhabditis elegans* foi capaz de silenciar genes de forma específica (Fire, *et al.*, 1998; Voinnet, 2001). Considerando que os vírus apresentam intermediários de replicação na forma de dsRNA, os mesmos seriam alvos diretos do PTGS.

A HC-Pro atua sistemicamente inibindo o PTGS em todos os tecidos infectados da planta, compreendidos entre o sítio primário da infecção até as folhas jovens. Outras proteínas virais responsáveis por inibir o PTGS, como a 2b expressa pelo CMV e a 19K do *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), possuem um efeito supressor mais

restrito, a primeira atuando na região apical da planta em tecidos jovens e a segunda nas nervuras (Pruss *et al.*, 1997; Brigneti *et al.*, 1998; Voinnet, *et al.*, 1999; Tijsterman *et al.*, 2002). Vários supressores virais de PTGS foram também identificados atuando em diferentes estágios do processo, como na iniciação, disseminação sistêmica e ou manutenção (Beclin *et al.*, 1998, Voinnet, *et al.*, 1999).

O silenciamento por RNA incitado por transcritos transientes dupla-fita da GFP, expressos por agro-infiltração, foi parcialmente inibido pela HC-Pro do TEV (Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau & Carrington, 1998). Plantas transgênicas expressando a HC-Pro do *Potato virus A*, foram inicialmente suscetíveis à infecção de vírus homólogos, mas depois exibiram silenciamento do transgene e do vírus demonstrando a recuperação dos sintomas (Savenkov *et al.*, 2002). Por outro lado, Anandalakshimi *et al.* (2000) identificaram um gene de tabaco, denominado *rgs-CaM*, que codifica uma proteína capaz de suprimir o PTGS. Trata-se do primeiro relato identificando um supressor celular de PTGS. Curiosamente, a expressão desse gene foi induzida pela presença da HC-Pro em plantas transgênicas, o que conduziu os autores a formular a hipótese de que a *rgs-CaM* seria a verdadeira supressora de PTGS.

Apesar dos diversos trabalhos publicados nos últimos anos, até o presente momento pouco se conhece sobre o papel *in vivo* da atividade de ligação a RNA e sobre a importância da mesma no ciclo viral. Aminoácidos essenciais a esta atividade foram identificados *in vitro* e evidências de uma correlação destes com a atividade supressora de PTGS foram obtidas empregando-se plantas transgênicas (Campos-Pereira, 2001). De uma maneira geral, verificou-se que versões da proteína HC-Pro contendo mutações em determinados aminoácidos presentes no domínio B (por exemplo no aminoácido tirosina) tinham sua atividade supressora debilitada. Neste contexto, experimentos recentes têm demonstrado que proteínas virais supressoras de PTGS são normalmente capazes de seqüestrar os pequenos RNAs interferentes responsáveis pela sinalização do processo de silenciamento (Silhavy *et al.*, 2002; Vargason *et al.*, 2003). Embora um mecanismo de ação análogo possa ser proposto para a proteína HC-Pro, novos estudos são necessários para comprovar e melhor entender o papel da atividade de ligação a ácidos nucleicos neste processo.

Como relatado anteriormente, as funções da HC-Pro desempenham um papel preponderante para a patogenicidade e virulência do vírus. Dentro do gênero *Potyvirus* são funcionalmente equivalentes e permutáveis, como foi demonstrado através da troca da HC-Pro inteira entre estirpes ou espécies relacionadas, originando vírus híbridos viáveis. A substituição funcional da HC-Pro do TVMV pela do ZYMV ou TEV, resultaram em quimeras viáveis, embora com diminuição da taxa de replicação e atenuação da expressão de sintomas (Atreya & Pirone 1993). Stenger & French (2004) demonstraram que a HC-Pro também pode ser substituída entre espécies não pertencentes aos *Potyvirus*. Nesse caso, um tritimovirus recombinante infeccioso carregando a região codificadora da HC-Pro de membros distantemente relacionados da família *Potyviridae* pôde ser obtido.

Esses estudos focaram principalmente na construção de quimeras expressando a HC-Pro completa, sendo que as informações sobre a troca de domínios funcionais específicos da HC-Pro são até então inexistentes. Essa permuta de domínios da HC-Pro constitui uma abordagem interessante para investigar a especialização estrutural e para determinar a existência de complementação de domínios funcionais entre espécies virais.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na UNESP – Botucatu no Departamento de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas e no Departamento de Genética do Instituto de Biociências.

A metodologia utilizada, de um modo geral, está descrita no “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (Sambrook *et al.*, 1989). Em todos os procedimentos utilizados para extração e análise de RNA a água e as soluções utilizadas foram tratadas com dietil pirocarbonato de sódio (DEPC) para eliminação de RNAses. As vidrarias foram esterilizadas em estufa a seco (200°C / 3 horas).

6.1 Clones e DNAs complementares (cDNAs) utilizados nos experimentos

Foram utilizados os seguintes clones para a construção dos vírus recombinantes:

- 1) Clone HCwt contendo o DNA complementar (cDNA) correspondente à região codificadora da proteína HC-Pro do PVY (isolado LYE 84; código de acesso Genbank U33454) inserido no vetor pT7/T3 (Maia & Bernardi, 1996).
- 2) Clone HCmut contendo o cDNA correspondente à região codificadora da proteína HC-Pro do PVY (isolado LYE 84; código de acesso Genbank U33454) contendo mutações pontuais em aminoácidos (aa) (posições 248 e 249) do IGN box (isoleucina-glicina-

asparagina IGN → arginina-prolina-asparagina RPN) inserido no vetor pUC19. Essa versão apresenta substituições em aminoácidos altamente conservados e em motivo (IGN) associado à capacidade da proteína se ligar ao RNA e ao aumento da replicação (FIGURA 3) (Maia & Bernardi, 1996, Kasschau *et al.*, 1997).

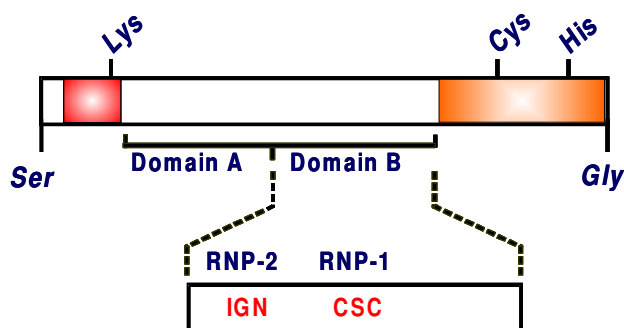


FIGURA 3: Representação esquemática da proteína HC-Pro e de seus domínios de ligação a RNA. A porção central apresenta dois domínios de ligação a RNA distintos (A e B). Domínio B → apresenta duas assinaturas típicas de ligação a RNA: RNP-2 e RNP-1. Os aminoácidos conservados presentes nas regiões N e C-terminal, envolvidos em outras funções (transmissão e proteólise) estão indicados na parte superior da proteína.

3) Clone infeccioso do LMV Exba199 → O Exba199 compreende parte do genoma do isolado AF199 (nucleotídeos 112 a 5855) e do LMV E (nucleotídeos 5855 a 10080) (FIGURA 4), previamente construído por Krause-Sakate (2001) (código de acesso Genbank AJ 278854 / X 97705). Esse cDNA, que cobre todo o genoma viral, foi inserido no vetor pBS70T, resistente a ampicilina, e posicionado sob controle de um duplo promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (70S) e de um terminador do gene da *nopalina sintetase* (NOS) (Yang, *et al.*, 1998). Esse cDNA foi utilizado como clone completo infeccioso em todos os experimentos.

4) Clone incompleto do LMV, denominado LMVinc → O LMVinc compreende o fragmento *XbaI* - *XbaI* do cDNA do isolado AF199 (estendendo-se dos nucleotídeos 112 a

5855) (FIGURA 4), previamente subclonado no vetor pZErO™-2 (Invitrogen), resistente a canamicina (Krause-Sakate, 2001).

6.2 Preparo prévio e manutenção dos clones

O DNA dos diferentes clones foi ressuspensionado em H₂O Milli-Q. Para a clonagem dos isolados foram preparadas células competentes de *Escherichia coli*, cepa DH5α, usando cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,1 M. Após a clonagem, os clones escolhidos foram submetidos a minipreparação de DNA por lise alcalina com o GFX Micro Plasmid (Amersham Biosciences) realizado de acordo com as recomendações do fabricante, ou de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Foram feitas culturas permanentes com glicerol dos isolados e armazenou-se a -80°C.

6.2.1 Produção de células competentes de *E. coli* empregando cloreto de cálcio

Inoculou-se *E. coli* cepa DH5α (partindo de uma colônia isolada) em 3 ml de meio de cultura LB (triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 10 g), ou meio de cultura Circle Grow (Qbiogene), e incubou-se por $\cong$ 12 horas a 37°C, sob agitação (220-250 rpm). Inoculou-se 0,5 ml do pré-inóculo em 50 ml de meio líquido (1:100) e as bactérias foram submetidas a crescimento sob agitação até que uma absorbância (600 nm) igual a 0.45-0.55 fosse atingida. O meio contendo as células foi então transferido para tubos de centrifuga (50 ml), previamente resfriados (15 min. no gelo). Centrifugou-se a 2500 g por 10 minutos, em centrífuga previamente resfriada a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se, gentilmente, as células em 10 ml de solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,1 M gelada. Incubou-se no gelo por 90 minutos. Centrifugou-se a 2500 g por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se, gentilmente, as células em 2 ml de solução CaCl₂ 0,1 M gelada. Incubou-se no gelo por mais 60 minutos. Aliquotas de 200 µl das células competentes foram inseridas em microtubos gelados (1,5 ml) e armazenadas em “freezer” - 80°C.

6.2.2 Transformação das células competentes de *E. coli*

Alíquotas do DNA de interesse foram gentilmente adicionadas a 200 µl de células competentes, incubando-se no gelo por 30 minutos. Um choque térmico de exatamente 1 minuto e 30 segundos a 42°C, foi então realizado. Transferiu-se imediatamente para o gelo, incubando por mais 5 minutos. Adicionou-se 800 µl de meio LB líquido e deixou-se incubando por 50 minutos a 37°C, sob agitação leve (200 rpm). As bactérias foram plaqueadas em meio de cultura sólido (LB + agar), contendo o correspondente antibiótico de seleção, ampicilina (100 mg/ml) para as construções contendo os cDNAs da HC-Pro e o LMV Exba 199, ou canamicina (20 µg/ml) para as construções contendo o LMVinc. Incubou-se em estufa a 37°C por $\cong$ 12 horas.

6.2.3 Minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina (miniprep)

Colônias isoladas foram selecionadas nas placas contendo os transformantes e, com o auxílio de um palito de dente, inoculadas em 3 ml de meio LB líquido contendo o respectivo antibiótico de seleção na concentração exposta no item 6.2.2. Incubou-se por $\cong$ 12 horas a 37°C, sob agitação leve (200 rpm). As bactérias foram então centrifugadas a 14000g durante 60 segundos. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 300 µl da solução P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0, Rnase 100 µg/ml). Acrescentou-se 300 µl da solução P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%) e agitou-se por inversão suave o tubo. Incubou-se a temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 300 µl da solução P3 (Acetato de Potássio 3 M pH 5,5, ácido acético glacial). Agitou-se levemente por inversão. Centrifugou-se a 14000g por 10 minutos sob a temperatura de 14°C, coletou-se o sobrenadante e descartou-se o precipitado. O DNA plasmidial foi então precipitado com 400 µl de isopropanol, seguido de centrifugação a 14000 g por 10 minutos sob temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e, adicionou-se 600 µl de etanol 70%, inverteu-se o tubo cuidadosamente e centrifugou-se a 14000g por 5 minutos sob temperatura ambiente. O etanol foi descartado e

o precipitado de DNA, completamente seco, ressuspendido em 20 µl de água Milli-Q. Armazenou-se em “freezer” a -20°C.

O DNA obtido foi visualizado em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo (0,1 µg/ml). A eletroforese foi realizada a 100 V em tampão TBE (10,8 g Tris base, 5,5 g ácido bórico e 0,74 g EDTA) por $\cong$ 45 min., e o DNA observado em transluminador ultravioleta sendo o gel fotografado.

6.2.4 Preparo das culturas permanentes

Os clones positivos foram mantidos em glicerol a -80°C. Para tal, inoculou-se 200 µl da cultura preparada para o miniprep em 1 ml de LB com o respectivo antibiótico de seleção (conforme item 6.2.2). Incubou-se por $\cong$ 12 horas a 37°C, sob agitação leve (220-250 rpm). Dessa cultura, foram aliquoteados 850 µl e misturados com 150 µl de glicerol. Após agitação vigorosa, os tubos foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido. Na sequência armazenou-se em “freezer” -80°C.

6.3 Construção do LMV recombinante contendo a HC-Pro do PVY

6.3.1 Estratégia de clonagem

A inserção da região codificadora da HC-Pro do PVY no clone completo do LMV foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, o cDNA da região codificadora da HC-Pro de PVY (com ou sem mutação) foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) e inserido no LMVinc. O LMVinc possui dois sítios de restrição para a enzima *AatII* dentro da região codificadora da proteína HC-Pro (nucleotídeos 1422 e 2481), que não se repetem no restante de sua sequência. Esses dois sítios de restrição foram escolhidos para a inserção da HC-Pro do PVY (FIGURA 4). Na segunda etapa, o LMVinc recombinante obtido na primeira fase, contendo os cDNAs da HC-Pro de PVY (HCwt e Hcmut), foi subclonado no LMV Exba199 (usando os sítios *XbaI*) para obtenção do clone infeccioso.

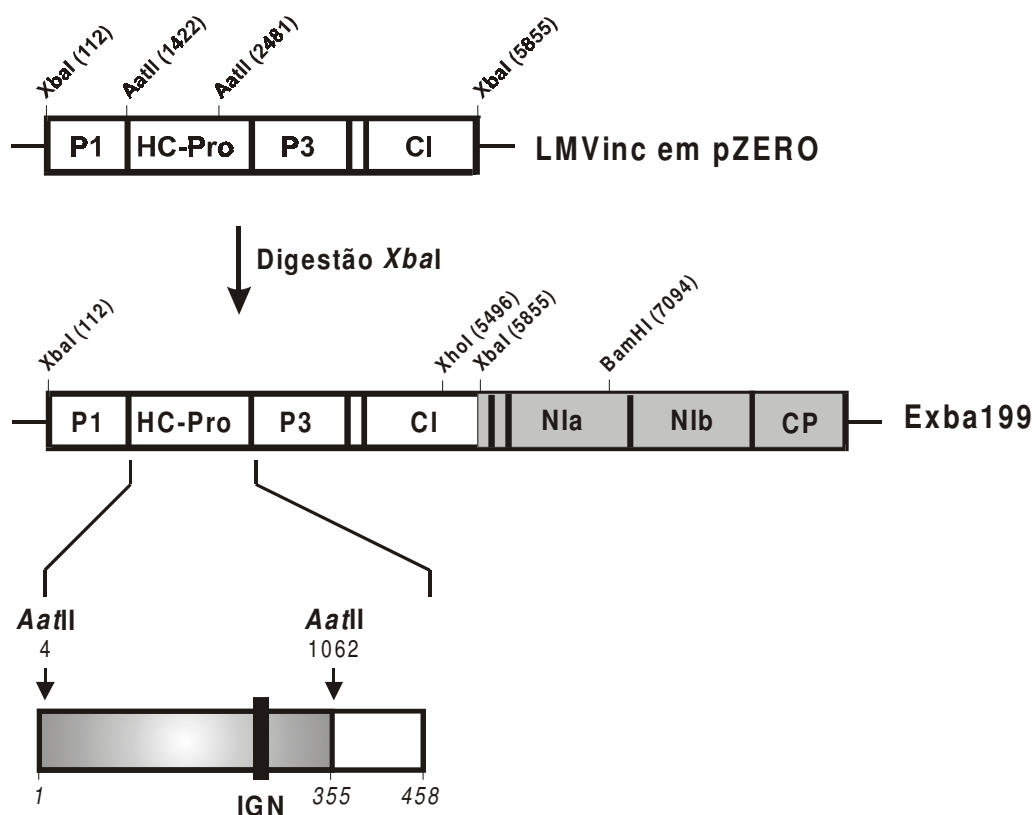


FIGURA 4. Representação esquemática do genoma completo do *Lettuce mosaic virus* Exba 199 e do LMVinc utilizados para a construção dos vírus LMV recombinantes. LMVinc com os sítios de restrição *AatII* e *XbaI* utilizados na construção dos recombinantes. LMV AF 199 (parte branca) e LMV E (parte cinza). Em destaque, HC-Pro recombinante com os sítios de restrição *AatII* utilizados para inserção da porção HC-PVY (parte cinza) na HC-Pro do LMV (parte branca). O motivo conservado IGN está representado em destaque em preto. Os números (em itálico) abaixo da região codificante da HC-Pro representam as posições dos aminoácidos.

Para a montagem desse primeiro recombinante, os cDNAs da HC-Pro (clones HCwt e HCmut) foram submetidos à reação de polimerização em cadeia (PCR) empregando os oligonucleotídeos HC-F (5'-CCCGGACGTCGACAATTTTGGGAAGG-3') e HC-R (5'-GGGCGACGTCAATCAGCATTGCAAG-3') que se anelam, respectivamente, nos nucleotídeos 3 a 24 e 1042 a 1066 da sequência da HC-Pro. Cada oligonucleotídeo inclui um sítio de restrição para a enzima *AatII*, (sublinhado).

A PCR foi preparada em um volume de 50,0 µl contendo 5,0 µl do tampão da enzima (10X), 1 mM MgSO₄, 1,0 µl de cDNA molde (~50 ng), 0,3 µM de cada

oligonucleotídeo, 0,3 mM de cada dNTP (desoxinucleotídeo trifosfato) e 1 unidade da enzima *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen). O ciclo de PCR foi constituído por um período inicial de desnaturação (2 minutos a 94°C), seguido por 1 ciclo (repetido 30 vezes) de desnaturação (15 segundos a 94°C), anelamento (30 segundos a 50°C) e polimerização (1,5 minuto por kb de sequência amplificada a 68°C), finalizando com uma extensão por 7 minutos a 68°C. Uma alíquota do produto de amplificação foi observada em gel de agarose e o restante precipitado em acetato de sódio 3M pH 5,2, etanol absoluto e etanol 70%, ressuspendido em 30,0 µl H₂O Milli-Q.

6.3.2 Digestão dos produtos amplificados e do LMVinc com enzima de restrição

A digestão foi realizada, de acordo com as recomendações do fabricante, para preparo das extremidades para ligação. Os fragmentos amplificados pela PCR foram digeridos pela endonuclease de restrição *AatII* (Fermentas), utilizando-se 30,0 µl de fragmentos amplificados, 4,0 µl tampão da enzima (10X), 4,0 µl BSA (10X), 2,0 µl da enzima (10 u/µl). A reação foi submetida à incubação por 1 hora a 37°C, com reposição da enzima e repetição do período de incubação. O tamanho do fragmento digerido foi visualizado em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo (0,1 µg/ml), observado em transluminador ultravioleta e fotografado.

Em paralelo, o LMVinc foi igualmente digerido pela endonuclease de restrição *AatII* (Fermentas) para retirada da HC-Pro do LMV e submetido à reação de defosforilação empregando (1 u/µl) de fosfatase alcalina. A reação foi incubada por 15 min a 37°C e finalizada com tratamento por 15 minutos a 85°C.

6.3.3 Isolamento e purificação dos fragmentos digeridos

As bandas correspondentes aos fragmentos de tamanho esperado foram cortadas com o auxílio de uma lâmina e colocadas em microtubos, onde se procedeu à purificação empregando os reagentes do kit ‘Concert Gel Extractions Systems’ (Gibco-BRL), de acordo com as recomendações do fabricante. O pedaço de gel recortado foi pesado, sendo adicionado 30 µl do tampão L1 para cada 10 mg de gel. A seguir, incubou-se

a 50 °C por 15 minutos. Durante esse período os tubos foram agitados por inversão, a cada 3 minutos, e após a completa dissolução da agarose, incubou-se por mais 5 minutos. A mistura foi transferida para um tubo de ‘spin eppendorf’ (coluna), encaixado em um tubo de lavagem, e centrifugada a 12000 g por 1 minuto, em microcentrífuga. Descartou-se, então, o filtrado e adicionou-se à coluna 700 µl de tampão L 2 e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Na sequência, centrifugou-se por um minuto a 12000 g e descartou-se o filtrado. Para remover eventuais resíduos do tampão centrifugou-se por mais 1 minuto a 12000 g. O DNA foi eluído da coluna com a aplicação de 50 µl de água Milli-Q estéril. Incubou-se à temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugou-se a 12000 g por 2 minutos.

6.3.4 Reação de ligação

A ligação entre o LMVinc e os produtos de amplificação da HC-Pro de PVY foi realizada na proporção 1:2 (vetor:inserto). As reações de ligação foram preparadas em um volume total de 10,0 µl, constituídos de 2,0 µl do vetor digerido (LMVinc), 4,0 µl de inserto (HCwt ou Hcmut), 2,0 µl do tampão apropriado da enzima (5X), 1,0 µl da enzima T₄ DNA ligase (1 u/µl) (Fermentas) e 1,0 µl de H₂O milliQ, incubadas a 4°C por $\cong$ 12 horas. Os produtos de ligação (LMVinc+HCwt e LMVinc+Hcmut) foram transformados em *E. coli* competentes de acordo com o item 6.2.2. O DNA plasmidial dos clones recombinantes foi extraído por miniprep de acordo com o item 6.2.3 supracitado.

6.3.5 Verificação da orientação do inserto através de digestão *DraI/XbaI*

A HC-Pro do PVY possui um sítio único de restrição *Dra I* na posição 352 (nt), que não ocorre na HC-Pro do LMV. O LMVinc possui dois sítios de restrição para a endonuclease *XbaI* (nucleotídeos 112 e 5855), utilizados como sítio de clonagem do fragmento de cDNA viral no vetor pZerOTM-2 (FIGURA 4). Portanto, a digestão *DraI/XbaI* além de indicar se houve a inserção da HC-Pro do PVY no LMVinc,

permite também verificar a orientação da inserção, através da análise do tamanho dos fragmentos originados.

- Inserção senso + - 5'-3' → fragmentos $\cong$ 4,0 kb, 3,3 kb, 1,7 kb
- Inserção antisenso - 3'-5' → fragmentos $\cong$ 3,7 kb, 3,3 kb, 2,1 kb

6.3.6 Sequenciamento dos clones recombinantes LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut

Foi realizada a PCR e o sequenciamento com o DNA plasmidial dos clones positivos para checar a inserção da HC-Pro do PVY no LMVinc. Utilizou-se oligonucleotídeos específicos derivados das seqüências da HC-Pro do PVY: **PVY HCAAT-F** (5'-CCCGGACGTCGACAATTTTGGGAAGG-3'; nucleotídeos 3 a 24) e **P2-R** (5'-GCTCTAGATTATCCCTTTGATGG-3'; nucleotídeos 679 a 691). O produto da PCR foi purificado em gel de agarose (conforme o item 6.3.3) e sequenciado com os oligonucleotídeos específicos (concentração final de 1 μ M). Para tal, utilizou-se cerca de 15ng do DNA dos clones recombinantes.

O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático de DNA modelo ABI-Prism 3100/16 capilares. As seqüências obtidas foram analisadas utilizando-se o programa BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor; disponível para download em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

6.3.7 Inserção do LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut no Exba199 para obtenção do clone infeccioso

O LMVinc possui dois sítios de restrição para a endonuclease *Xba*I (112-5855 nt; FIGURA 4) que foram utilizados como sítio de clonagem do cDNA viral no vetor pZErOTM-2. Visando obter o clone infeccioso do LMV contendo a HC-Pro de PVY (com ou sem mutação), os recombinantes parciais LMVinc+HCwt e LMVinc+Hcmut, bem como o Exba199, foram submetidos à reação de digestão com a enzima *Xba*I. A digestão *Xba*I possibilitou separar o cDNA viral (região 112-5855) do vetor pZErOTM-2 e retirar do Exba199, a seqüência compreendida entre os nucleotídeos 112-5855, a fim de substituí-la pelos fragmentos correspondentes provenientes do LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut. A

reação de digestão foi realizada com 5,0 µl do produto da minipreparação de DNA por lise alcalina (miniprep), 2,0 µl tampão da enzima (10X), 1,0 µl da enzima (Fermentas 10u/µl), 12,0 µl de H₂O Milli-Q. A reação foi submetida à incubação por 2 horas a 37°C, com reposição da enzima (1,0 µl), tampão (1,0 µl) e 8,0 µl de H₂O Milli-Q, com repetição do período de incubação.

Após a digestão, o Exba199 foi defosforilado, como descrito anteriormente, e submetido à eletroforese em gel de agarose. Em seguida, o fragmento correspondente ao Exba199, desprovido do fragmento correspondente à região 112-5855, e os fragmentos correspondentes à região 112-5855 dos clones recombinantes LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut, desprovidos da sequência correspondente ao plasmídeo pZER0 (3,3 kb), foram purificados (de acordo com o item 6.3.3).

6.3.8 Reação de ligação

As ligações entre o Exba199 linearizado e os fragmentos dos LMVinc+HCwt e LMVinc+Hcmut (região 112-5855), foram realizadas na proporção 1:3 (vetor:inserto). As reações de ligação foram preparadas em um volume de 10 µl, constituídos de 1,0 µl do vetor (Exba199), 3,0 µl de inserto, 2,0 µl do tampão apropriado da enzima (5X), 1,0 µl da enzima T₄ DNA ligase (1u/µl) (Fermentas) e 3,0 µl de H₂O Milli-Q e incubadas a 4°C por $\approx$ 12 horas. Os produtos da ligação foram transformados em *E. coli* competente de acordo com o item 5.2.1. O DNA plasmidial dos clones recombinantes foi extraído por miniprep de acordo com o item 6.2.3 supracitado.

6.3.9 Verificação da orientação do inserto através de digestão *Bam*HI/*Xho*I

O Exba199 possui um sítio de restrição *Xho*I (posição 5496; FIGURA 4) e um sítio *Bam*HI (posição 7094; FIGURA 4), enquanto que o vetor pBS70T apresenta um sítio de restrição para a endonuclease *Bam*HI no sítio múltiplo de clonagem. Portanto, a digestão *Bam*HI/*Xho*I permite a verificação da orientação da inserção, através do tamanho dos fragmentos originados.

- Inserção senso + - 5'-3' → fragmentos $\cong$ 9,4 kb, 3,0 kb, 1,6 kb
- Inserção antisenso - 3'-5' → fragmentos $\cong$ 6,7 kb, 4,4 kb, 3,0 kb

Após a verificação da orientação, os clones positivos foram seqüenciados como descrito anteriormente.

6.3.10 Terminologia utilizada para os clones recombinantes obtidos

- Exba199
- Exba199+HCwt
- Exba199+HCmut

6.4 Inoculação dos vírus e análise da progênie RNA viral

6.4.1 Inoculação via biobalística dos isolados em alfaces (*Lactuca sativa*) cv Trocadero

6.4.1.1 Obtenção do DNA plasmidial para a realização dos experimentos de biobalística

O DNA plasmidial dos isolados Exba199 e dos recombinantes Exba199+HCwt e Exba199+HCmut foram preparados por minipreparação de DNA por lise alcalina com o GFX Micro Plasmid (Amersham Biosciences), realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Para tal, procedeu-se à inoculação em meio LB líquido, contendo o antibiótico de seleção (ampicilina), com uma alíquota proveniente da cultura permanente. As bactérias cresceram a 37°C por $\cong$ 12 horas, e foram plaqueadas em meio LB sólido sob a seleção do mesmo antibiótico. Escolheu-se então uma colônia isolada de cada clone e inoculou-se em 3 ml de LB para realização da miniprep. O DNA obtido foi visualizado em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo (0,1 µg/ml) e observado em transluminador ultravioleta e fotografado.

6.4.1.2 Precipitação do DNA sobre as micropartículas de ouro

Foram utilizadas micropartículas de ouro com 1 μm de diâmetro (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e um acelerador de micropartículas de gás hélio sob baixa pressão portátil da BIOMICS. O processo de bombardeamento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

O volume final da reação de precipitação do DNA sobre as micropartículas de ouro foi de 10 ml para cada amostra. Utilizou-se 5 mg de micropartículas de ouro, adicionou-se 10 μl de DNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), misturou-se vigorosamente por 2-4 segundos (vórtex), adicionou-se 100 μl de espermidina Sigma S-0266 (0,1 M), misturou-se vigorosamente por 2-4 segundos (vórtex). Acrescentou-se 100 μl de CaCl_2 (2,5 M) em frações de 25 μl /vórtex até completar o volume. Na sequência, incubou-se por 10 minutos na temperatura ambiente (precipitação) e centrifugou-se $\cong$ 20 segundos (spin). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 200 μl de etanol absoluto. Após a ressuspensão, as micropartículas foram sonicadas ($\cong$ 3-5 segundos) e centrifugadas $\cong$ 20 segundos (spin). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 10 ml de etanol absoluto sendo o mesmo sonificado por 3-6 segundos em tubos de cintilação (vidro).

6.4.1.3 Precipitação das micropartículas de ouro cobertas com DNA no tubo de teflon

O tubo de teflon (Tefzel) ($\cong$ 8 cm) foi fixado na bancada com dois pedaços de fita crepe. O tubo de vidro contendo as micropartículas cobertas pelo DNA foi sonificado por 3-6 segundos, visando ressuspendê-las. Em seguida, com o auxílio de uma seringa (20 ml/agulha de 21 g) adicionou-se as micropartículas cobertas com DNA em solução de etanol no interior do tubo teflon, cuidadosamente para evitar a formação de bolhas. Esperou-se 2-3 minutos, para que as micropartículas precipitassem no interior do tubo, removeu-se delicadamente as fitas crepe. O etanol do interior do tubo foi removido de forma homogênea com o auxílio de papel toalha e as micropartículas permaneceram na parede do tubo. A completa secagem do tubo foi realizada com fluxo contínuo de hélio (pressão aproximada: 2-3 kgf/cm^2). O tubo teflon completamente seco foi cortado em 4 pedaços para ser bombardeado.

O bombardeamento foi realizado a uma pressão de 120 psi, sobre plântulas de alface (28 dias) cv. Trocadero (suscetível ao LMV). Foram bombardeadas 4 folhas por planta. Cada tratamento teve 4 repetições. As plantas bombardeadas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), sob a temperatura de 22°C para avaliação de infectividade.

6.4.2. Avaliação da infectividade das plantas inoculadas

A infectividade foi avaliada após uma semana da inoculação. Foi realizada avaliação visual de sintomas. O material vegetal sintomático ou assintomático foi coletado a partir do 7º dia pós-inoculação (dpi) para extração do RNA total. Realizou-se a reação de RT-PCR e o sequenciamento dos cDNA amplificados dos isolados.

6.4.2.1 Extração de RNA total dos tecidos foliares

A extração de RNA total das folhas, com infecção sistêmica de alface (cv. Trocadero) bombardeadas com os diferentes isolados e de uma planta sadia não infectada (C-), foi efetuada de acordo com o método Bertheau *et al.* (1998).

As amostras foram maceradas na proporção 1:5 (p/v) em tampão PBS-Tween pH 7,4 (Tampão fosfato de sódio 0,05 M, sódio diethyldithiocarbamato 20 mM, Tween 0,05%, Polivinilpirolidona K25 2%, NaCl 8%, 0,02 % KCl) e centrifugadas em tubos de microcentrífuga por 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante (200 µl) foi então transferido para um novo tubo. Acrescentou-se SDS a 1% e incubou-se por 15 minutos a 55°C. Adicionou-se em seguida 100 µl da solução de acetato de potássio 3 M e agitaram-se vigorosamente os tubos por inversão. Incubou-se no gelo por 5 minutos e centrifugou-se a 13000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 700 µl NaI 6 M e 5 µl da solução de silício pH 2,0 (previamente agitada para ressuspensão do silício). Após vigorosa agitação, incubou-se por 10 minutos sob temperatura ambiente e centrifugou-se por 1 minuto a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 500 µl da solução Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100

mM e igual volume de etanol absoluto. Centrifugou-se a 5000 rpm por 1 minuto. O precipitado de RNA foi seco a vácuo e ressuspendido em 400 µl de água Milli-Q tratada com DEPC. Incubou-se por 5 minutos a 55°C e centrifugou-se a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante (300 µl) foi transferido para um novo tubo e armazenado a -80°C.

6.4.2.2. Amplificação por transcrição reversa/reação em cadeia pela polimerase – RT/PCR

Os RNA totais das amostras foram submetidos a reação de transcrição reversa (RT)-PCR utilizando o *Access Quick RT-PCR System* (Promega), de acordo com as orientações do fabricante mas com algumas modificações. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar um fragmento de $\cong 278$ pares de base (pb), correspondente à região codificadora da proteína NIb e 5' da proteína capsidial, foram 8894 “forward” (5' –CGCTACATAGCIGARTGTGCT-3') e 9171 “reverse” (5'-GCGTTGATGTCGTCATCYTT-3'), descritos por Revers *et al.* (1999b).

Para a reação foram utilizados 5µl do RNA molde, 1 µM de cada oligonucleotídeos específicos, 0,02 unidades da enzima transcriptase reversa *Avian myeloblastosis virus* (AMV). A transcrição reversa foi realizada a 42°C durante 15 minutos, seguidos de 5 minutos a 95°C, para inativação da transcriptase e desnaturação inicial, 40 ciclos de desnaturação por 20 segundos a 95°C, anelamento por 20 segundos a 54°C e polimerização por 40 segundos a 72°C. A polimerização final ocorreu a 72°C por 10 minutos.

O RNA total não foi quantificado devido às limitações do método de extração utilizado, em função disso se padronizou utilizar 5-10 µl por amostra.

6.4.2.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para obtenção da primeira fita de cDNA, os RNA totais extraídos das plantas bombardeadas e de uma planta sadia não infectada (C-) foram submetidos à reação de transcrição reversa com a enzima Superscript III (Invitrogen). Antes da RT, as amostras de RNA total foram tratadas com Dnase I (1u/µl) (Invitrogen). Ao volume final

(22 µl) da reação de RNA tratado com Dnase I acrescentou-se: 0,5 µg/ml de Oligo-dT₁₇VN, 0,5 mM de uma mistura de dNTP (dGTP, dATP, dCTP, dTTP), 4,5 µl de H₂O DEPC, e incubou-se a 65°C por 5 minutos (desnaturação) seguido de gelo por 1 minuto. Acrescentou-se então, 8 µl do tampão de enzima (5X) e 0,005 M DTT (ditiotretol) e 0,5 µl da Superscript III (200 unidades). Incubou-se por 50 minutos a 50°C e submeteu-se a reação a 70°C por 15 minutos (inativação).

6.4.2.4. Oligonucleotídeos específicos usados na amplificação das regiões de recombinação entre LMV e a HC-Pro do PVY

Pares de oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar especificamente as regiões de ligação entre as seqüências do LMV/HC-Pro do PVY (I) e averiguar a região que contém a mutação na HC-Pro do PVY (II). O par de oligonucleotídeos I amplifica o final da região codificadora da P1 do LMV e o início da região codificadora da HC-Pro do PVY. O par de oligonucleotídeos II amplifica a região que codifica a porção central da HC-Pro, onde estão os motivos altamente conservados IGN (que sofreu a mutação – Exba199+HCmut), CSC/CCC e o PTK (FIGURA 15A).

a) Par de oligonucleotídeos I que amplifica um fragmento $\cong$ 420 pb:

- **P1 LMV** → 5'-GCACAGAACATGGAAAGATT-3' (posição 1226 da seqüência de nucleotídeos da P1 do LMV) (senso)
- **HCPVY243** → 5'-TCTTTATCTGATCCCAGTCG-3' (posição 1653 da seqüência do genoma do LMV ou 243 nucleotídeos da HC-Pro do PVY) (antisense)

b) Par de oligonucleotídeos II que amplifica um fragmento $\cong$ 540 pb

- **HCPVY591** → 5'-CGTGTGACAATCAGTTGGAT-3' (posição 591 da seqüência de nucleotídeos da HC-Pro do PVY) (senso)

- **LMVHC2483** → 5'-TCTTTAGCTTGATCCTCTGG-3' (posição 2483 da sequência de nucleotídeos do genoma do LMV) (antisense)

6.4.2.5 Reação de PCR

Após a RT, o cDNA dos isolados Exba199+HCwt e Exba199+HCmut foi amplificado com os oligonucleotídeos I e II descritos acima. O cDNA do isolado Exba199 foi amplificado com os oligonucleotídeos (senso) 8894 e (antisense) 9171 (Revers *et al.*, 1999b). A PCR foi preparada em um volume de 50 µl, contendo 5 µl de tampão PCR 10X (Amersham), 5 µl de cDNA molde, 1 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada dNTP e 1 unidade de Taq DNA polymerase (Amersham).

A reação foi submetida a uma desnaturação inicial (5 minutos / 95°C) seguida de um ciclo básico de desnaturação (20 segundos/95°C), anelamento (20 segundos/54°C) e polimerização (40 segundos/72°C) repetido 40 vezes, seguido de uma polimerização final (10 minutos/72°C). Os produtos amplificados na PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, corado em brometo de etídeo (0,1 µg/ml), observados em transluminador ultravioleta e fotografados.

6.4.2.6 Isolamento, purificação e sequenciamento dos fragmentos amplificados

As bandas do gel correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados pelas combinações dos oligonucleotídeos I e II e apresentando tamanho esperado (420 pb e 540 pb respectivamente), foram cortadas com o auxílio de uma lâmina e colocadas em microtubos, onde se procedeu à purificação com os reagentes do 'Concert Gel Extractions Systems' (Gibco-BRL), de acordo com as recomendações do fabricante e conforme descrito no item 6.3.3. Os fragmentos purificados foram sequenciados utilizando os pares de oligonucleotídeos específicos (I e II) usados na amplificação por PCR (concentração final de 1 µM). As sequências foram analisadas utilizando-se o programa BioEdit.

6.4.2.7. Avaliação biológica dos vírus recombinantes

Para a avaliação biológica dos recombinantes montou-se um ensaio com três tratamentos com 4 repetições cada um. O ensaio foi constituído de inoculação mecânica dos recombinantes e do Exba199 como controle positivo. A inoculação foi realizada em 4 plantas de alface cv. Trocadero (suscetível ao LMV) por tratamento. As inoculações foram feitas em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 com sulfito de sódio 0,01M (Yarwood, 1969). A proporção seguida na preparação do inóculo foi de 1:5 (1 g de folha infectada para 5 ml do tampão). O inóculo foi friccionado sobre as folhas das plantas previamente pulverizadas com abrasivo (carbureto de silício – 400 mesh). Uma planta de alface cv. Trocadero sadia, por tratamento, foi utilizada como controle negativo através da fricção apenas com tampão e abrasivo.

As plantas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), sob a temperatura de 22°C e observadas durante 35 dias. Nesse período, foram coletados semanalmente 2 discos de folhas de 1 cm de diâmetro, de cada uma das plantas dos três tratamentos. Um desses discos foi utilizado para extração de RNA total e posterior análise por RT-PCR. O outro disco de folha foi utilizado para extração de proteínas.

Para o RT-PCR estabeleceu-se 4 amostragens: 7, 14, 21 e 28 d.p.i.. A extração de RNA total ocorreu de acordo com o método descrito por Bertheau *et al.* (1998), conforme descrito no item 6.4.2.1.

6.4.2.8 Análise por RT-PCR dos vírus recombinantes nas plantas inoculadas

A reação de RT para síntese do DNA complementar ao vírus (cDNA) foi realizada de acordo com o item 6.4.2.3. A reação de PCR foi realizada de acordo com o item 6.4.2.5. Para essa reação foram utilizados os oligonucleotídeos 8894/9171 (Revers *et al.*, 1999b). Como controle constitutivo da expressão foram utilizados os oligonucleotídeos L1 (5'-GTTAAGAAGGGTGGTGCATT-3') e L2 (5'-CTTATATCACCCATCTCATA-3'), desenhados com base na sequência de nucleotídeos do gene que codifica a enzima triose fosfato isomerase (Bennett *et al.*, 2002). Esses

oligonucleotídeos amplificam um fragmento de 741 pb, que funciona como controle interno para atestar a concentração de RNA total usada nos diferentes tempos.

6.4.2.9 Análise do acúmulo viral dos vírus recombinantes

A análise do acúmulo viral foi realizada indiretamente através da comparação do número de ciclos necessários para amplificar os isolados Exba199 utilizado como controle positivo e os isolados recombinantes Exba199+HCwt e Exba199+HCmut. Essa análise comparativa foi realizada empregando os cDNAs obtidos a partir de RNA total das amostras coletadas 14 d.p.i. Nesse caso, os cDNAs dos isolados Exba199, Exba199+HCwt e Exba199+HCmut foram submetidos a 25, 30, 35 e 40 ciclos de PCR, realizadas nas condições expostas no item 6.4.2.5.

6.4.2.10 Extração e desnaturação de proteínas totais das folhas

Os discos de folhas dos isolados Exba199, Exba199+HCwt e Exba199+HCmut coletados aos 7, 14, 21 e 28 d.p.i., foram macerados em tampão para extração de proteínas (Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glicerol, azul de bromofenol 0,001M, β -mercaptoetanol 5 %). As proteínas foram desnaturadas por fervura 100°C por 5 minutos e centrifugadas a 16000g por 10 minutos, após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo.

6.4.2.11 Análise do acúmulo da proteína viral através de “Western blot”

As amostras de proteínas desnaturadas foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). Após a eletroforese, os polipeptídeos contidos no gel foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (filtro) em um sistema “semidry” (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell-Biorad), sob uma voltagem de 80 V por $\cong$ 2 horas (Towbin & Gordon, 1984). Antes da transferência, o gel ficou submerso

por 30 minutos, e os papéis de filtro e a membrana por 15 minutos, em tampão de transferência (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,04% e metanol 20%).

Após a transferência, o filtro de nitrocelulose foi corado com Ponceau S 0,1%, contendo ácido acético 10% para visualização da eficiência da transferência, sendo na sequência descorado com água destilada. Foram utilizados padrões de massa pré-corados. Submeteu-se o filtro a solução de bloqueio em tampão TBS/leite (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM e 5 % de leite desnatado) por 60 minutos a 37°C.

A detecção da proteína de capsídeo nas amostras foi realizada incubando o filtro de nitrocelulose com o anti-soro contra a proteína capsidial do LMV (cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini - Universidade Federal de Viçosa, MG), produzido em coelho e utilizado na diluição 1:1000 em tampão TBS/leite 1%, deixando sob agitação por $\cong$ 12 horas a 4°C. Após a incubação, o filtro foi lavado 4 vezes por 10 minutos com uma solução de TBS-Tween 0,05% e uma vez com TBS.

Após as lavagens, incubou-se o filtro com o soro anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase por 1 hora (1:2000) (KLP). Repetiu-se o mesmo procedimento da lavagem anterior. Na sequência das lavagens, as bandas foram reveladas utilizando o substrato quimioluminescente Luminol da Pierce (Super Signal West Pico), de acordo com as orientações do fabricante.

7. RESULTADOS

7.1 Construção do LMV recombinante contendo a HC-Pro de PVY

7.1. 1 Digestão do isolado LMVinc com a endonuclease de restrição *AatII*

Três clones oriundos do miniprep do LMVinc foram submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *AatII*, originando um fragmento de aproximadamente 1000 pb correspondente a HC-Pro do LMV (descartada) e um fragmento de $\cong 8100$ pb, correspondente ao plasmídeo linearizado e defosforilado. Um desses clones foi escolhido para efetuar a inserção do cDNA da HC-Pro do PVY. Para tal, a banda do gel correspondente ao plasmídeo (8100 pb) foi recortada e purificada (FIGURA 5).

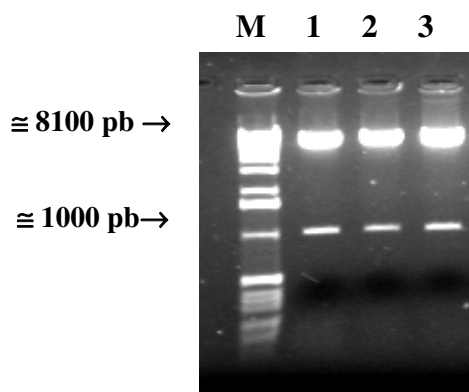


FIGURA 5: Análise da digestão do isolado LMVinc pela endonuclease de restrição *AatII* em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo (0,1 µg/ml). **M.** Marcador de massa molecular 1kb (Ladder-Invitrogen). **1.** Clone 1 LMVinc, **2.** Clone 2 LMVinc, **3.** Clone 3 LMVinc.

7.1.2 Amplificação das regiões codificadoras da HCwt e Hcmut e inserção no LMVinc

As regiões codificadoras da porção N-terminal e região central da HCwt e da Hcmut do PVY foram amplificadas por PCR. Os produtos de amplificação gerados apresentam um sítio de clivagem para a enzima *AatII*. A reação de amplificação foi mais eficiente quando se utilizou o DNA plasmidial oriundo do miniprep diluído na proporção 1:10, conforme observado na FIGURA 6. Foram escolhidos para digestão com a endonuclease *AatII* e preparo das extremidades para ligação os produtos amplificados das colunas 2 e 4 (FIGURA 6). Após a digestão, as bandas foram purificadas do gel e inseridas no vetor LMVinc digerido por *AatII* e defosforilado.

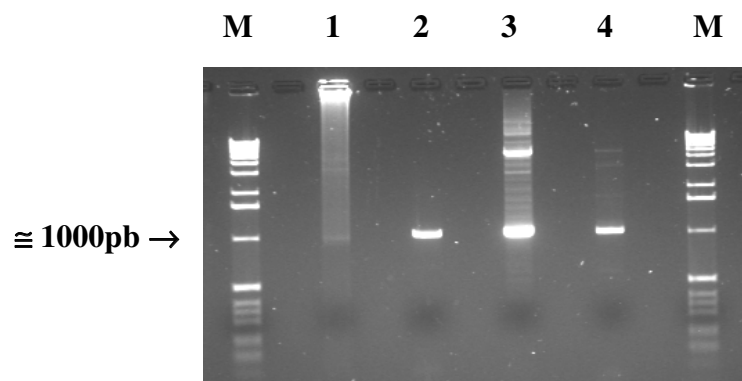


FIGURA 6. Análise dos produtos de amplificação correspondentes às regiões codificadoras da HCwt e HCmut em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo. **M.** Marcador de massa molecular 1 Kb (Ladder-Invitrogen); **1.** Amplificação usando DNA (HCwt) sem diluição; **2.** Amplificação usando DNA (HCwt) na diluição 1:10; **3.** Amplificação usando DNA (Hcmut) sem diluição; **4.** Amplificação usando DNA (HCmut) na diluição 1:10.

7.1.3 Identificação dos clones recombinantes dos isolados LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut com a posição do inserto 5'-3' através da digestão *DraI/XbaI*

Após a ligação e transformação, as bactérias contendo os clones recombinantes foram plaqueadas em meio de seleção. Foram escolhidos 6 clones do recombinante LMVinc+HCwt para realização de miniprep e análise através de digestão *DraI/XbaI*, sendo identificados os clones 3 e 6 com a inserção do cDNA da HC-Pro do PVY na orientação correta (senso + fragmentos $\cong$ 4,0 kb, 3,3 kb, 1,7 kb) (FIGURA 7). Dos quatro clones analisados do recombinante LMVinc+HCmut, apenas os clones 8 e 9 apresentaram a inserção na orientação correta (FIGURA 7). Os demais apresentavam a inserção na orientação incorreta (antisense - 3'-5' $\rightarrow$ fragmentos $\cong$ 3,7 kb, 3,3 kb, 2,1 kb).

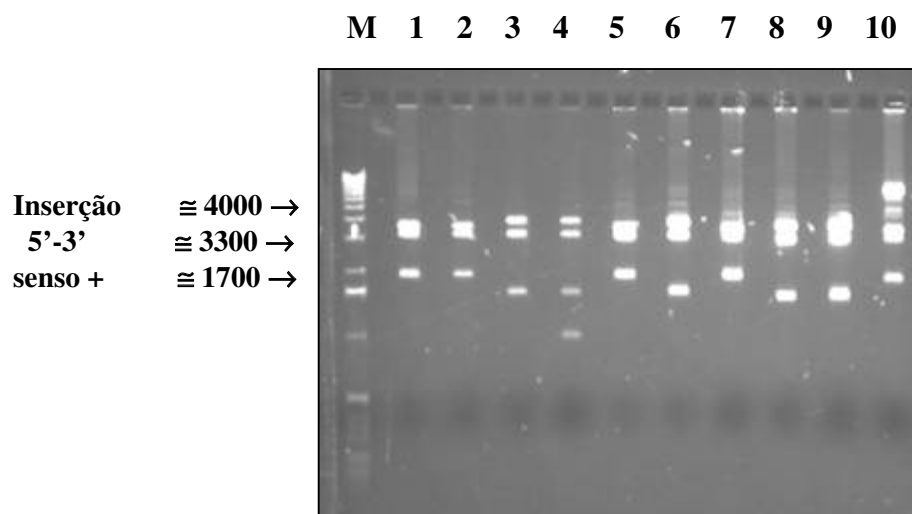


FIGURA 7. Análise em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo do DNA plasmidial dos clones recombinantes através de digestão *DraI/XbaI*. **M.** Marcador de massa molecular 1 Kb (Ladder-Invitrogen); **1, 2, 3, 4, 5, 6** Clones LMVinc+HCwt (3 e 6 na orientação correta-4,0 kb, 3,3 kb, 1,7 kb); **7, 8, 9, 10** Clones LMVinc+Hcmut (8 e 9 na orientação correta).

7.1.4 Análise dos recombinantes incompletos LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut

O DNA plasmidial dos clones contendo a inserção do cDNA da HC-Pro do PVY, com orientação correta, foram submetidos a uma reação de PCR usando a combinação dos oligonucleotídeos HCAATF/P2R. Esses oligonucleotídeos amplificaram, de maneira específica, um fragmento de 650 pb correspondente à parte da HC-Pro do PVY (FIGURA 8), confirmando a inserção do cDNA da HCwt e HCmut no LMVinc. A análise das seqüências de nucleotídeos dos produtos de PCR gerados confirmou, como esperado, a identidade das mesmas com as seqüências da HC-Pro de PVY isolado LYE 84 (U33454).



FIGURA 8. Análise em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo (0,1 µg/ml) dos fragmentos amplificados com os oligonucleotídeos específicos para a HC-Pro do PVY e purificados para o seqüenciamento. **1.** LMVinc+HCwt (clone 3), **2.** LMVinc+HCwt (clone 6), **3.** LMVinc+HCmut (clone 8), **4.** LMVinc+HCmut (clone 9), **M.** Marcador de massa molecular 1kb (Ladder-Invitrogen).

7.1.5. Inserção do LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut no Exba199 através da digestão com a endonuclease de restrição *XbaI*

A digestão do DNA plasmidial do Exba199 com a endonuclease de restrição *XbaI* originou dois fragmentos, um com aproximadamente 8295 pb correspondente ao plasmídeo linearizado e o outro com 5855 pb (descartado para substituição pelos fragmentos dos recombinantes LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut). O fragmento correspondente ao plasmídeo foi recortado do gel e purificado para ligação (FIGURA 9).

Da mesma maneira, os recombinantes LMVinc+HCwt (clones 3 e 6) e LMVinc+HCmut (clones 8 e 9) obtidos anteriormente foram digeridos com a endonuclease de restrição *XbaI*, dando origem a um fragmento de 5855 pb (seqüência viral recombinante) e outro de 3300 pb (plasmídeo pZErO). O fragmento de 5855 pb foi recortado e purificado para ligação (FIGURA 9).

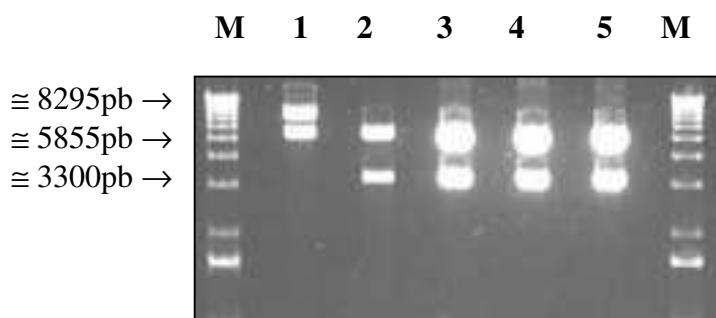


FIGURA 9. Análise em gel de agarose 1%, corado em brometo de etídeo da digestão do Exba199, LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut com a endonuclease de restrição *Xba*I. **M.** Marcador de massa molecular 1 Kb (Ladder-Invitrogen), **1.** Exba199 digerido (fragmento de 8295 pb foi purificado); **2.** LMVinc+HCwt (clone 3); **3.** LMVinc+HCwt (clone 6); **4.** LMVinc+HCmut (clone 8); **5.** LMVinc+HCmut (clone 9). Nesse caso, os fragmentos de 5855 pb foram purificados.

7.1.6 Análise do perfil eletroforético dos clones infecciosos Exba199+HCwt e Exba199+Hcmut através de digestão com as endonucleases de restrição *Bam*HI/*Xho*I

Os fragmentos correspondentes ao LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut foram submetidos à ligação com o Exba199 linearizado e posteriormente transformados em *E. coli*. A análise do perfil eletroforético da digestão *Bam*HI/*Xho*I do DNA plasmidial dos cinco clones demonstrou a existência de dois clones (2 e 4), correspondentes respectivamente ao Exba199+HCwt e Exba199+HCmut, com a inserção na orientação esperada (senso +), de acordo com o padrão de digestão observado ($\cong$ 9,4 kb, 3,0 kb, 1,6 kb) (FIGURA 10). Os outros clones analisados apresentaram fragmentos de $\cong$ 6,7 kb, 4,4 kb, 3,0 kb, caracterizando o padrão de inserção na orientação contrária (FIGURA 10).

Os clones recombinantes foram seqüenciados confirmando a correta inserção dos fragmentos e indicando a presença da HC-Pro de PVY nos mesmos. O DNA plasmidial dos clones positivos Exba199+HCwt e Exba199+HCmut foi preparado por miniprep e usado para bombardear plantas de alface cv. Trocadero.

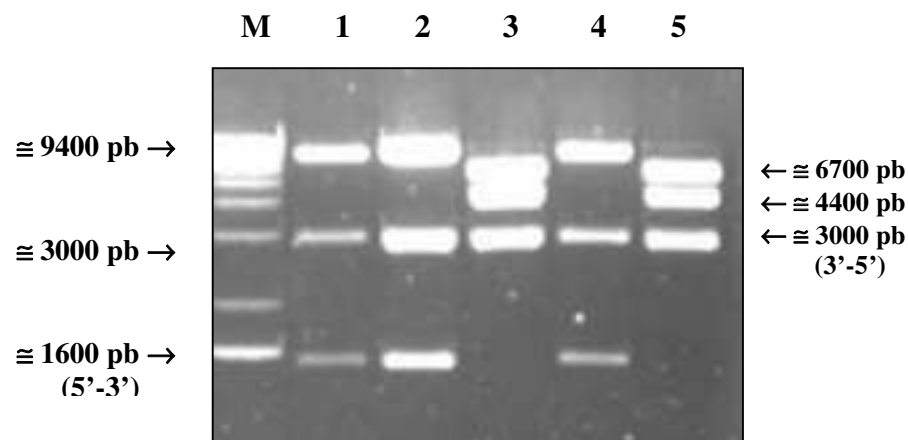


FIGURA 10. Análise em gel de agarose 1%, corado em brometo de etídeo do perfil eletroforético dos clones digeridos pelas endonucleases de restrição *Bam*HI/*Xho*I para verificação da orientação de inserção dos fragmentos recombinantes LMVinc+HCwt e LMVinc+HCmut no Exba199. **M.** Marcador de massa molecular 1 Kb (Ladder-Invitrogen); **1.** Exba199 (C+); **2.** Exba199+HCwt (senso +); **3.** Exba199+HCwt (antisenso); **4.** Exba199+HCmut (senso +), **5.** Exba199+HCmut (antisenso).

7.2 Sintomatologia das plantas inoculadas via biobalística

As quatro alfices inoculadas via biobalística com o Exba199 apresentaram, após 7 dias, sintomas sistêmicos de mosaico, clareamento de nervura e bolhosidades (FIGURA 11A), que se tornaram intensos após 14 dias (FIGURA 11B). Aos 21 d.p.i, as quatro plantas apresentavam também necrose de nervura e manchas necróticas.

O Exba199+HCwt apresentou sintomas locais de mosaico discreto e bastante tênue se comparado aos sintomas do Exba199. Após 14 dias, as plantas bombardeadas com o Exba199+HCwt apresentaram sintomas sistêmicos bem tênues de mosaico, pontos cloróticos, clareamento de nervura e principalmente manchas cloróticas. (FIGURA 12).

Os sintomas sistêmicos do Exba199+HCmut ficaram evidentes 18 dias após o bombardeamento, apresentando clareamento de nervura e mosaico discreto (FIGURA 13). Três plantas permaneceram assintomáticas. Notou-se que os sintomas do Exba199+HCmut foram mais brandos quando comparados com o Exba199+HCwt.



FIGURA 11A. Alface (*Lactuca sativa*) cultivar Trocadero, inoculada via biobalística com o Exba199 (7 d.p.i), apresentando sintomas sistêmicos de mosaico, clareamento de nervura e pontos cloróticos.



FIGURA 11B. Alface (*Lactuca sativa*) cultivar Trocadero, inoculada via biobalística com o Exba199 (16 d.p.i), apresentando sintomas sistêmicos de mosaico, clareamento de nervura, deformação foliar, pontos cloróticos, bolhosidades e necrose.



FIGURA 12. Alface (*Lactuca sativa*) cultivar Trocadero, inoculada via biobalística com o Exba199+HCwt (14 d.p.i), apresentando sintomas sistêmicos de mosaico, clareamento de nervura, pontos cloróticos e mancha clorótica.



FIGURA 13. Alface (*Lactuca sativa*) cultivar Trocadero, inoculada via biobalística com o Exba199+HCmut (18 d.p.i), apresentando sintomas sistêmicos de clareamento de nervura e pontos cloróticos.

7.3 Confirmação da presença dos vírus nas plantas inoculadas via biobalística através de RT-PCR

A confirmação da presença dos vírus nas plantas inoculadas via biobalística foi realizada pela extração de RNA total, submetido à reação de RT-PCR com os oligonucleotídeos 8894 e 9171, originando um produto de aproximadamente 278 pb para cada um dos isolados Exba199, Exba199+HCwt e Exba199+Hcmut (FIGURA 14), confirmando a infecção das mesmas pelo LMV e respectivos recombinantes. As bandas correspondentes aos produtos de amplificação do Exba199 e do C+ (LMV coletado no campo) tiveram uma intensidade similar. As bandas correspondentes aos recombinantes Exba199+HCwt e Exba199+Hcmut apresentaram uma intensidade mais fraca, sendo que a banda do Exba199+Hcmut é ainda mais tênue que as demais, indicando que o título viral nessas plantas é provavelmente menor (FIGURA 14).

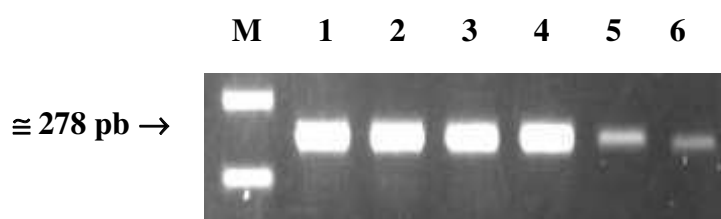


FIGURA 14. Análise por RT-PCR dos isolados inoculados via biobalística nas plantas de alface originando um fragmento de 278 pb, em gel de agarose 1,8 % corado em brometo de etídeo. **M** Marcador de massa molecular 100 pb (Fermentas), **1-2**. LMV controle + (LMV coletado no campo); **3-4**. Exba199; **5**. Exba199+HCwt; **6**. Exba199+Hcmut.

7.4. Confirmação da identidade dos recombinantes Exba199+HCwt e Exba199+HCmut através de RT-PCR empregando os oligonucleotídeos LMV/PVY I e II

Confirmada a infecção viral nas plantas bombardeadas verificou-se a identidade dos vírus recombinantes presentes nas mesmas. Os oligonucleotídeos específicos (P1 LMV e HCPVY243 ou HCPVY591 e LMVHC2483) foram empregados amplificando somente as regiões do genoma viral contendo seqüências híbridas entre o LMV e a HC-Pro do PVY (FIGURA 15 A). Nesse caso, os produtos de amplificação (de 420 pb e 540 pb, respectivamente) foram observados somente nas plantas infectadas com os recombinantes Exba199+HCwt e Exba199+HCmut que contém as seqüências da HC-Pro do PVY. Nenhum produto de amplificação foi observado nas plantas infectadas com Exba199 (poço 1) ou no controle sadio (poço 6; FIGURA 15 B).

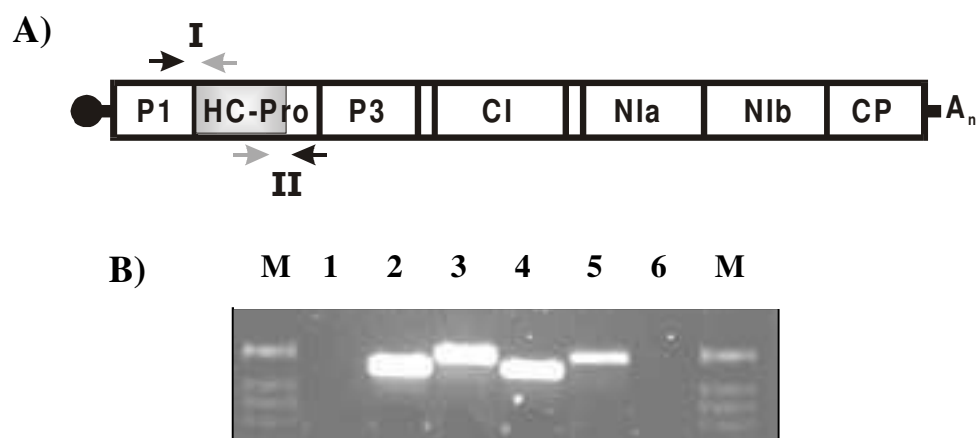


FIGURA 15. Confirmação da identidade dos recombinantes Exba199+HCwt e Exba199+HCmut através de RT-PCR. **A)** Genoma híbrido com a posição dos oligonucleotídeos I e II usados na amplificação (setas cinzas HC-PVY/setas pretas LMV). **B)** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos de 420 pb e 540 pb foram observados somente nas amostras contendo os vírus híbridos. **M.** Marcador de massa molecular 1 Kb (Ladder-Invitrogen), **1.** Exba199; **2.** Exba199+HCwt (combinação de oligos I); **3.** Exba199+HCwt (combinação de oligos II); **4.** Exba199+Hcmut (oligos I); **5.** Exba199+Hcmut (oligos II); **6.** Alfafa sadia (controle negativo).

7.5. Análise da seqüência dos produtos amplificados

Os produtos amplificados, observados na FIGURA 15, foram purificados do gel e submetidos a reações de seqüenciamento visando checar a região de inserção da HC-Pro no Exba199 e a presença da mutação IGN→RPN na HCmut. A seqüência correspondente à região compreendida entre a P1 do LMV e a HC-Pro de PVY demonstrou a correta inserção tanto da HCwt como da HCmut no Exba199. O seqüenciamento da região central da HC-Pro demonstrou a presença da mutação IGN→RPN na HCmut (FIGURA 16).

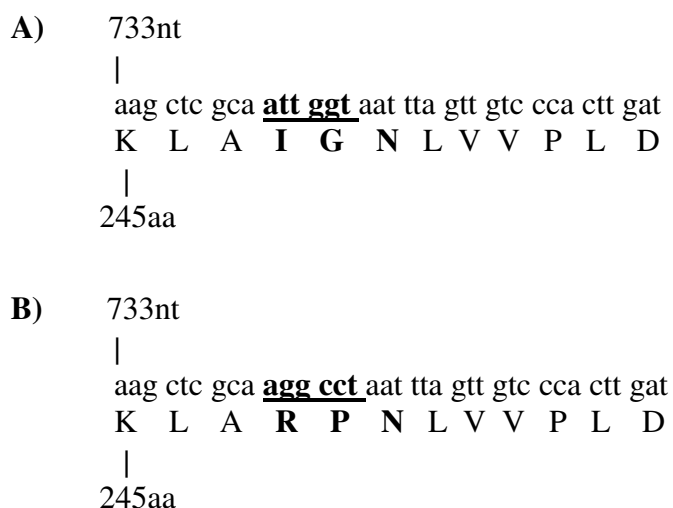


FIGURA 16. Seqüência parcial da região central da HC-Pro PVY inserida no LMVExba199. Em destaque (negrito sublinhado) a seqüência codificadora e os aminoácidos do motivo conservado IGN (wt e mut). **A.** Seqüência parcial de nucleotídeos da região central da HC-Pro do isolado Exba199+HCwt (IGN). **B.** Seqüência parcial de nucleotídeos da região central da HC-Pro do isolado Exba199+HCmut (RPN). Indicação dos aminoácidos na parte inferior da seqüência de nucleotídeos.

7.6. Sintomatologia das plantas de alface cv. Trocadero inoculadas com os extratos das plantas bombardeadas com os vírus híbridos Exba199+HCwt e Exba199+HCmut e o Exba199

As quatro plantas inoculadas mecanicamente de cada um dos tratamentos com os três isolados provenientes das plantas bombardeadas apresentaram sintomas locais de mosaico, clareamento de nervura e pontos cloróticos. O Exba199 apresentou sintomas mais drásticos em relação aos vírus híbridos. Os sintomas sistêmicos ficaram evidentes em 7 dias para o Exba199, enquanto que os vírus híbridos demoraram 14 e 18 dias, respectivamente, para tornarem-se visíveis. Houve, portanto, um atraso na manifestação dos sintomas do Exba199+HCmut em relação ao Exba199+HCwt. Por outro lado, o Exba199+HCwt foi o único que apresentou manchas cloróticas irregulares. Os sintomas foram idênticos aos apresentados pelas plantas bombardeadas (FIGURAS 11A, 11B, 12 e 13). A única diferença observada nas plantas inoculadas mecanicamente em relação às plantas bombardeadas ocorreu com as plantas inoculadas pelo Exba199+HCmut, que nesse ensaio não apresentou plantas assintomáticas.

7.7 Análise do acúmulo de RNA viral nas 4 semanas pós-inoculação

O acúmulo de RNA viral nas plantas inoculadas, no período de 7 a 28 d.p.i., foi verificado através de análises de RT-PCR empregando RNA total extraído de discos de folhas amostrados nos respectivos tempos. A avaliação, durante o período de amostragem, da expressão de um gene constitutivo (Triose-fosfato isomerase) foi usada como padrão interno de amplificação. Como pode ser constatado na FIGURA 17, o Exba199 teve um acúmulo tão intenso quando comparado aos demais, que não foi possível, em função da saturação, averiguar uma variação no acúmulo do RNA viral ao longo das quatro semanas. O RNA viral do Exba199+HCwt apresentou um acúmulo crescente até a terceira semana e decaiu na quarta semana. O RNA viral do Exba199+HCmut teve um acúmulo inferior ao dos outros dois vírus em análise. O gene constitutivo da triose fosfato

isomerase, por sua vez, apresentou uma expressão similar em todos os tempos analisados (FIGURA 17).

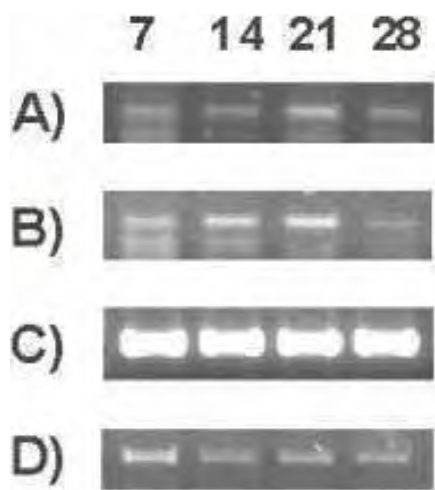


FIGURA 17. Avaliação do acúmulo de RNA viral nas plantas de alface inoculadas com os vírus híbridos e o Exba199 durante o período de amostragem (7, 14, 21, 28 d.p.i) empregando RT-PCR. **A)** Exba199+HCmut; **B)** Exba199+HCwt; **C)** Exba199; **D)** Controle constitutivo (gene da Triose-fosfato isomerase). As reações de PCR foram constituídas por 40 ciclos de amplificação.

7.8 Avaliação do acúmulo de RNA viral em função do número de ciclos de PCR

Visando confirmar os resultados observados na FIGURA 17 e circundar os problemas de saturação observados durante a amplificação do Exba199, optou-se por monitorar o acúmulo de RNA viral ao longo de diferentes ciclos de amplificação por PCR. Nesse caso, o número de ciclos de amplificação necessários para se obter um sinal refletiu o título viral presente na amostra. Dessa forma, uma correlação entre o aparecimento do produto de amplificação, correspondente ao genoma viral, e o título viral na planta pode ser estabelecido. Confirmando os resultados observados na FIGURA 17, o Exba199 foi amplificado após 30 ciclos, enquanto que os produtos de amplificação correspondentes aos vírus híbridos só foram detectados após 40 ciclos indicando, nesse caso, um menor título viral (FIGURA 18).



FIGURA 18. Análise do acúmulo de RNA viral em função do número de ciclos de PCR. A região da NIb/CP do genoma do LMV foi amplificada por RT-PCR, empregando diferentes tempos de ciclagem, e os produtos analisados em gel de agarose 1,8 % corado com brometo de etídeo. A) Exba199; B) Exba199+HCwt; C) Exba199+HCPmut. Número de ciclos de amplificação realizados durante a PCR = 25, 30, 35 e 40.

6.9 Detecção da proteína do capsídeo do LMV através de “Western blot”

Para confirmar o baixo título viral nas plantas inoculadas com os recombinantes e detectar variações no acúmulo da CP do Exba199, foi realizado um western blot empregando um anti-soro policlonal contra a CP do LMV. Uma banda correspondente a CP do Exba199 foi reconhecida pelo anticorpo no extrato protéico proveniente das plantas inoculadas com esse vírus. Através do “Western blot” foi possível detectar variações no acúmulo da CP do Exba199 nas plantas inoculadas durante o período de amostragem, o que não foi possível por RT-PCR. O acúmulo da CP indica que o título viral decaiu após 21 d.p.i (FIGURA 19). Por outro lado, nos extratos provenientes das plantas infectadas com os vírus híbridos não foi obtido sinal. Esse resultado indica que os vírus híbridos, embora presentes nas plantas, pois foram amplificados por RT-PCR, encontram-se em tão baixa concentração que não são detectados por “western blot”.



FIGURA 19. Detecção do acúmulo da proteína do capsídeo do Exba199 através de “Western blot” durante o período de amostragem 7, 14, 21 e 28 dias pós-inoculação (d.p.i).

8. DISCUSSÃO

A HC-Pro é uma proteína multifuncional (revisada por Maia *et al.*, 1996, Revers *et al.* 1999a, Urcuqui-Inchima *et al.* 2001) que desempenha diferentes papéis em diversas etapas do ciclo viral. Essa multifuncionalidade está distribuída ao longo da sequência primária de aminoácidos da proteína, podendo a mesma ser subdividida em três módulos funcionais (FIGURAS 1 e 2) correspondentes, respectivamente, à região N-terminal (aminoácidos $\cong$ 1 até 100), a região central (aminoácidos $\cong$ 100 até 300) e a região C-terminal (aminoácidos $\cong$ 300 até 458).

Embora alguns trabalhos tenham demonstrado que a HC-Pro pode ser permutada, as informações sobre a troca de domínios funcionais específicos dessa proteína em diferentes espécies virais são até então inexistentes. Como ressaltado anteriormente, a permuta de domínios constitui uma abordagem interessante para investigar a especialização estrutural e para determinar a existência de complementação entre domínios funcionais de diferentes espécies virais. Informações relativas às propriedades desses domínios, e respectiva especificidade, podem ser assim obtidas.

No presente estudo, a porção N-terminal e central da HC-Pro de um clone infeccioso do LMV foram substituídas pela região correspondente da HC-Pro de um isolado do PVY. A escolha dessas espécies virais, dentre as diversas espécies do gênero *Potyvirus*, deve-se principalmente à baixa similaridade de sequência de suas proteínas HC-

Pro. Além desses vírus apresentarem uma gama de hospedeiros diferenciada com poucos hospedeiros comuns.

Algumas propriedades biológicas dos vírus recombinantes foram analisadas com o objetivo de desvendar os possíveis efeitos do rearranjo dos módulos funcionais dessa proteína. De acordo com os resultados obtidos, os vírus recombinantes, embora infectivos, causaram sintomas atenuados e acúmulo viral menor quando comparados com o Exba199. A disseminação sistêmica desses recombinantes também foi mais lenta que aquela observada para o Exba199. Nesse aspecto, o recombinante Exba199+HCwt apresentou sintomas sistêmicos com um atraso de uma semana quando comparado com o Exba199, enquanto que o recombinante contendo a HC-Pro com mutação no motivo IGN (HCmut), demorou 18 dias para apresentar sintomas sistêmicos. Apesar do atraso na manifestação dos sintomas, a disseminação sistêmica de tais vírus nas plantas inoculadas pôde ser evidenciada através de RT-PCR aos sete dias após a inoculação, indicando que a replicação, embora acentuadamente menor, estava ocorrendo (FIGURA 17).

A atenuação de sintomas, relacionada com os recombinantes, pode ser atribuída a alterações em várias funções desempenhadas pela HC-Pro. A limitada capacidade de provocar infecção sistêmica do Exba199+HCmut, por exemplo, pode ser resultado tanto da diminuição da amplificação do genoma viral, quanto de baixas proporções de movimento sistêmico (Cronin *et al.*, 1995). Kasschau *et al.* (1997), demonstraram que um mutante no motivo IGN manteve uma amplificação em protoplastos em torno 12%, mas não foi capaz de infectar plantas de maneira sistêmica. Embora o grau de comprometimento da amplificação do Exba199+HCmut não tenha sido quantificado de maneira precisa, os resultados biológicos e a análise molecular apresentados, indubitavelmente demonstram um efeito drástico sobre a mesma.

Cabe ressaltar que a atenuação dos sintomas locais, muitas vezes indetectáveis visualmente, não está relacionada com a ausência de vírus, afinal análises por RT-PCR demonstraram a presença de RNA viral no sítio de infecção local (após 7 dias; dados não demonstrados). Esses resultados sugerem que a presença de uma HC-Pro quimérica tenha dificultado o deslocamento do vírus do sítio primário da infecção, resultando dessa maneira em interferência na virulência. O movimento célula a célula

requer a interação das proteínas virais, em especial da HC-Pro, com fatores do hospedeiro, e a presença de uma HC quimérica pode ter comprometido algumas dessas interações. Essa possibilidade é corroborada por estudos que demonstram que mutantes no domínio central do TEV-GUS-HC-Pro apresentaram movimento local deficiente em relação ao TEV-GUS-HC-Pro sem mutações (Kasschau *et al.*, 1997) e que mutantes do TVMV foram incapazes de se disseminar a partir das folhas inoculadas (Klein *et al.*, 1994).

Segundo Rojas *et al.* (1997), a HC-Pro e a CP são capazes de aumentar o limite de exclusão dos plasmodesmas, auxiliando o movimento do RNA viral entre as células. Portanto, o movimento local dos recombinantes pode ter sido prejudicado tanto pela atividade deficiente de uma HC-Pro heteróloga quanto, como no caso do Exba199+HCmut, pela mutação no motivo IGN. Outra possibilidade é que a necessária interação entre a CP do LMV e a HC-Pro tenha sido prejudicada pela presença de regiões da HC-Pro do PVY, dificultando portanto o movimento do vírus recombinante. Rojas *et al.* (1997) consideram que, potencialmente, a HC-Pro pode ser considerada como uma proteína de movimento, fato que pode indicar porque os recombinantes apresentaram um movimento local tão deficiente.

O atraso na manifestação dos sintomas sistêmicos indica que o movimento a longa distância dos vírus contendo a HC-Pro quimérica também foi prejudicado, quando comparado com o Exba199. A interferência da HC-Pro no movimento sistêmico parece estar clara para vários vírus da família *Potyviridae*, dentre eles o TEV, TVMV, *Plum pox virus* (PPV), BCMNV, LMV e WSMV (Klein *et al.*, 1994, Cronin *et al.*, 1995, Kasschau, *et al.*, 1997, Sáenz *et al.*, 2002, Rojas *et al.*, 1997, Stenger *et al.*, 2005a). Uma das hipóteses de atuação da HC-Pro no movimento sistêmico do vírus seria a de auxiliar o mesmo na entrada e saída do sistema vascular.

Dentre as regiões permutadas, a região central da HC-Pro está envolvida em diversas funções fundamentais para o estabelecimento da infecção viral, tais como a amplificação do genoma do vírus (motivo IGN), o sinergismo com outros vírus, o movimento sistêmico (CC/SC) e a ligação a ácidos nucleicos, principalmente RNA fita simples (domínios A e B) (Cronin *et al.*, 1995; Kasschau *et al.*, 1997; Maia & Bernardi, 1996; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000). Segundo Andrejeva *et al.* (1999), funções como a transmissão por afídeos e o acúmulo viral nos tecidos infectados são controlados não

apenas pela mesma proteína, mas pelos mesmos motivos de aminoácidos, conservados entre as espécies do gênero.

No caso dos vírus recombinantes, apesar dos prejuízos observados na virulência, a referida região central pôde ser permutada sem afetar a viabilidade e infectividade. Mesmo no caso do Exba199+HCmut, onde a região central contém mutações em aminoácidos conservados biologicamente importantes (IGN para RPN), houve viabilidade.

De acordo com análises estruturais da HC-Pro, as regiões permutadas nesse estudo estão dentro de uma região da proteína rica em α -hélices, denominada região I. A região I compreende o domínio I onde há uma região de dobradiça da molécula que teoricamente regula a exposição dos domínios funcionais, determinando sua atuação. Junto ao domínio II reside a atividade de proteinase, situada na chamada região II da molécula também rica em α -hélices. Segundo Plisson *et al.* (2003), o domínio I contém os sítios ativos necessários a várias funções da proteína e a região de dobradiça regularia o acesso a esse domínio, movendo o domínio II. Esse movimento estrutural seria determinante para que as funções da proteína sejam reguladas pela interação vírus-hospedeiro. Portanto, do ponto de vista teórico, não deveriam ocorrer alterações na funcionalidade das proteínas quiméricas, já que o domínio I e a região de dobradiça pertencem a HC-Pro do PVY. Se considerarmos o modelo proposto, em hipótese, os mecanismos de interação que regulam a exposição do domínio I estariam preservados nos recombinantes. Por outro lado, o domínio II pertencente ao LMV não foi modificado e a função de proteinase da HC-Pro foi preservada, fato que contribuiu para a viabilidade dos vírus recombinantes.

A relação entre o aspecto estrutural e funcional dessa proteína é preponderante para a compreensão de como atuam os motivos de aminoácidos conservados e possibilitar a avaliação de como as alterações nesses domínios comprometem suas funções. Nesse contexto, convém ressaltar que no desempenho de suas funções, a HC-Pro interage com diferentes proteínas virais e do hospedeiro (Guo *et al.*, 2003). No caso das proteínas quiméricas, tais interações podem ter sido comprometidas em menor ou maior grau prejudicando dessa maneira o *fitness* viral.

Um outro aspecto importante a se considerar na avaliação dos resultados obtidos com os vírus recombinantes refere-se ao envolvimento da HC-Pro, e de sua região central, na supressão do PTGS. Recentemente, demonstrou-se que o papel da HC-Pro na replicação/amplificação e no movimento são efeitos indiretos de sua atividade de supressão (Kasschau & Carrington, 2001). Levando tal fato em consideração, pode-se sugerir que os resultados obtidos nesse trabalho, onde os recombinantes apresentaram virulência muito atenuada se comparada com o LMV selvagem, que mantém a região codificadora da P1/HC-Pro do isolado AF-199, são consequência de uma atividade supressora debilitada das proteínas quiméricas. Em conformidade com tal possibilidade, Krause-Sakate (2001) relata que a região codificadora das proteínas P1 e HC-Pro do isolado AF-199 é responsável pelo aparecimento de sintomas mais precoces em alface cv. Salinas 88. O mesmo isolado apresentou, também, maior eficiência em suprimir o PTGS, se comparado com outro isolado de LMV (LMV-E). Esses resultados indicam que existe, entre isolados de uma mesma espécie de *Potyvirus*, uma certa variabilidade na eficiência da HC-Pro em suprimir o PTGS. Cabe ressaltar que o Exba199, usado como clone infeccioso para a construção dos demais, é um híbrido entre o isolado AF-199 e o isolado LMV-E, mas conserva a HC-Pro original do AF-199.

Os resultados obtidos corroboram e reforçam os dados da literatura que indicam a HC-Pro como a proteína responsável pela supressão do PTGS, já que nesses recombinantes não houve modificação na P1, indicando portanto que as alterações observadas não estariam associadas a essa proteína. Além disso, esse dado coincide com os dados apresentados por outros autores, que apontam a P1 como coadjuvante no mecanismo de supressão do PTGS (Kasschau & Carrington, 1998, Pruss *et al.*, 1997).

O PTGS ou silenciamento RNA é um processo em que RNA dupla-fita (dsRNA) funciona como um gatilho para a degradação de RNAs homólogos na célula. Os RNAs de dupla-fita são cortados em pequenos RNAs interferentes, de 21-25 nucleotídeos, que agem como guias para o reconhecimento de RNAs complementares para sua degradação. O PTGS é um mecanismo eucariótico ancestral que também está envolvido na defesa contra vírus (Voinnet, 2001, Waterhouse *et al.*, 2001). Em contrapartida, muitos vírus codificam supressores de silenciamento por RNA/PTGS (Moissiard *et al.*, 2004, Roth *et al.*, 2004). No caso dos potyvírus, a HC-Pro age como um supressor de silenciamento e

evidências sugerem que a P1 participa desse processo catalisando a atividade da HC-Pro (Pruss *et al.*, 1997; Kasschau & Carrington, 1998; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

De acordo com Campos-Pereira (2002), o motivo IGN é essencial para a atividade de supressão de PTGS da HC-Pro. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que o recombinante contendo a HCmut (com mutação no motivo IGN) apresentou um acúmulo menor e um atraso de três dias na manifestação dos sintomas em relação ao recombinante portando a HCwt. Essa pequena diferença, normalmente não observada quando a HC-Pro com mutação no motivo IGN encontra-se em seu contexto original, indica que a simples recombinação dos módulos funcionais da proteína, independente da alteração desse motivo específico de aminoácidos, resultou em comprometimento da atividade supressora.

A acentuada diminuição do título viral observado nos recombinantes do LMV analisados, a atenuação de sintomas e o movimento sistêmico deficiente se assemelham aos efeitos descritos para um mutante do WSMV em que a região codificadora da HC-Pro foi completamente deletada (Stenger *et al.*, 2005a). No entanto, como os efeitos da deleção total da região codificadora da HC-Pro na patogenicidade viral ainda não foi avaliada no gênero *Potyvirus*, não é possível inferir se as consequências das recombinações realizadas nesse trabalho equivalem às alterações biológicas apresentadas pelo mutante do WSMV.

O outro módulo funcional da HC-Pro substituído nos recombinantes foi a região N-terminal. Essa região está envolvida no processo de transmissão dos potyvirus por afídeos (Ammar *et al.*, 1994, Pirone & Blanc, 1996) e na transmissão dos tritimovirus por ácaros eriofídeos (Stenger *et al.*, 2005b). Neste trabalho, o efeito da substituição da região N-terminal da HC-Pro na transmissão do LMV não foi avaliado.

Além da transmissão, outros estudos indicam que a região N-terminal está associada com a formação de dímeros e auto-interação da proteína (Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999a, Guo *et al.*, 1999), mas segundo Plisson *et al.* (2003), para o LMV essa região não é essencial para a dimerização. Da mesma maneira, certa controvérsia também existe em relação à essencialidade ou não dessa região para a infectividade e viabilidade viral. A deleção da sequência de nucleotídeos que codifica a região N-terminal da HC-Pro do TEV, por exemplo, teve um efeito negativo no acúmulo de RNA viral e

determinou a perda da transmissibilidade por afídeo, mas não afetaram sua viabilidade (Dolja *et al.*, 1993). Para o TVMV, entretanto, a deleção de 75 aminoácidos da região N-terminal da HC-Pro resultou em um efeito deletério, comprometendo totalmente a viabilidade, enquanto mutações no motivo conservado KITC, provocaram declínio da eficiência de transmissão por afídeos, atenuação de sintomas, diminuição do acúmulo viral e consequentemente da patogenicidade (Atreya & Pirone, 1993).

A análise da sequência completa de nucleotídeos de um isolado atenuado do *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) demonstrou que o mesmo correspondia, na realidade, a um mutante natural do isolado que causava sintomas drásticos com uma deleção de 92 aminoácidos da região N-terminal da HC-Pro (Takaki *et al.*, 2006). No caso do LMV, um mutante sem os aminoácidos 4 a 102 da HC-Pro diferiu do LMV selvagem apenas na transmissão por afídeos, não apresentando alteração em outros parâmetros biológicos ou na patogenicidade (Plisson *et al.*, 2003).

Apesar de uma parte dos trabalhos da literatura indicar que a região N-terminal da HC-Pro atua, além da transmissão, na replicação, sintomatologia e patogenicidade de algumas espécies do gênero, não há indícios que essa parte da proteína quimérica possa ter influenciado as alterações de sintomatologia observadas em nossos experimentos, uma vez que em estudo anterior, a deleção total dessa parte da HC-Pro do LMV não modificou sua patogenicidade (Plisson *et al.*, 2003). Entretanto, para que dados mais conclusivos sejam obtidos em relação a esse aspecto, novos estudos que enfoquem a ação de uma HC-Pro quimérica apenas para a região N-terminal serão necessários.

Nesse trabalho, foram construídos dois clones infecciosos do LMV em que dois módulos funcionais da HC-Pro do vírus parental foram substituídos pelas regiões correspondentes da HC-Pro do PVY. Nesses clones, a porção C-terminal da HC-Pro do vírus parental permaneceu sem alteração. Os resultados obtidos durante a caracterização desses recombinantes sugerem que algumas das funções biológicas da HC-Pro podem ser desempenhadas por proteínas contendo trechos heterólogos. Embora original, já que o presente estudo representa o primeiro relato da construção de um clone de LMV infeccioso codificando uma HC-Pro quimérica, experimentos adicionais serão necessários para precisar que funções da proteína foram efetivamente comprometidas pela reassociação dos módulos funcionais em estudo.

9. CONCLUSÕES

→ Os recombinantes Exba199+HCwt e Exba199+HCmut foram viáveis e capazes de infectar plantas de alface, indicando que algumas funções biológicas da HC-Pro foram preservadas.

→ A substituição das regiões N-terminal e central da HC-Pro do LMV pelas regiões correspondentes da HC-Pro do PVY provocou um menor acúmulo viral e resultou em sintomas atenuados em alface.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREJEVA, J., PUURAND, Ü, MERITS, A., RABESTEIN, F., JÄRVEKÜLG, L., VALKONEN, J. P. T. Potyvirus helper component-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus-host interactions and the same CP motif affects virus transmission and accumulation. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1133-1139, 1999.
- AMMAR, E. D., JÄRFOLRS, U., PIRONE, T. P. Association of potyvirus helper component protein with virions and cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. **Phytopathology**, v. 84, p. 1054-1060, 1994.
- ANANDALAKSHMI, R., PRUSS, G.J., GE, X., MARATHE, R., MALLORY, A. C., SMITH, T. H., VANCE, V. B. A viral suppressor of gene silencing in plants. **Proceeding of the National Academy of Sciences, USA**, v. 95, p. 13079-13084, 1998.
- ANANDALAKSHMI, R., MARATHE, R., GE, X., HERR, J. M. Jr., MAU, C., MALLORY, A., PRUSS, G., BOWMAN, L., VANCE, V. B. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v. 290, p. 142-144, 2000.
- ATREYA, P. L., ATREYA, C. D., PIRONE, T. P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 88, p. 7887-7891, 1991.

- ATREYA, C. D., ATREYA, P. L., THORNBURY, D. W., PIRONE, T. P. Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infect tobacco plants. **Virology**, v. 191, p. 106-111, 1992.
- ATREYA, P. L., LOPEZ-MOYA, J. J., CHU, M., ATREYA, C. D., PIRONE, T. P. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 265-270, 1995.
- ATREYA, C. D., PIRONE, T. P. Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. **Proceeding of the National Academy of Sciences, USA**, v. 90, p. 11919-11923, 1993.
- ATREYA, C. D., RACCAH, R., PIRONE, T. P. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. **Virology**, v. 178, p. 161-165, 1990.
- BAULCOMBE, D. C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. **Plant Cell**, v.08, p. 1833-1844, 1996.
- BECLIN, C., BERTHOME, R., PALAUQUI, J. C., TEPFER, M., VAUCHERET, H. Infection of tobacco or Arabidopsis plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans) genes. **Virology**, v. 252, p. 313-317, 1998.
- BENNETT, M. H., MANSFIELD J.W., LEWIS, M. J., BEALE, M. H. Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Phytochemistry**, v. 60, p. 255-261, 2002.
- BERTHEAU, Y., FRECHON D., TOTH, I. K , HYMAN, L.J. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). IN: PEROMBOLON, M. C. M. & van der WOLFF, J. M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* on potatoes. Scottish Crop Research institute Occasional Publication, 1998.
- BLANC, S., AMMAR, E. D., GARCIA-LAMPASONA, S., DOLJA, V. V., LLAVE, C., BAKER, J., PIRONE, T. P. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 3119-3122, 1998.
- BLANC, S., LOPEZ-MOYA, J. J., WANG, R., GARCIA-LAMPASONA, S., THORNBURY, D. W., PIRONE, T. P. A specific interaction between coat protein and

- helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. **Virology**, v. 231, p. 141-147, 1997.
- BRIGNET, G., VOINNET, O., LI, W. X., JI, L. H., DING, S. W., BAULCOMBE, D. C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **EMBO Journal**, v. 17, p. 6739-6746, 1998.
- CAMARGO, M. M. P. Estratégia de ação para a produção orientada de hortaliças no Estado de São Paulo. **Informativo Econômico**, v. 23, n. 11, p. 45-60, 1993.
- CAMPOS-PEREIRA, T. Estudo da atividade de supressão da proteína HC-Pro e análise do perfil de expressão de PTGS em cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas. 60p. 2002.
- CARRINGTON, J. C., CARY, S. M., PARKS, T. D., DOUGHERTY, W. G. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. **EMBO Journal**, v.08, p.365-370, 1989a.
- CARRINGTON, J. C., FREED, D. D. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. **Journal of Virology**, v.64, p.1590-1597, 1990.
- CARRINGTON, J. C., FREED, D. D., SANDERS, T. C. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia-coli* and *in vitro*. **Journal of Virology**, v.63, p.4459-4463, 1989b.
- CARRINGTON, J. C., HERNDON, K. Characterization of the potyviral HC-pro autoproteolytic cleavage site, **Virology**, v.187, p.308-315, 1992.
- CARRINGTON, J. C., KASSCHAU, K. D., MAHAJAN, S. K., SHAAD, M. C. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. **Plant Cell**, v. 08, p. 1669-1681, 1996.
- CRONIN, S., VERCHOT, J., HALDEMAN-CAHILL, R., SCHAAD, M. C., CARRINGTON, J. C. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. **Plant Cell**, v. 7, p. 549-559, 1995.
- DINANT, S., LOT, H. Lettuce mosaic virus. **Plant Pathology**, v. 41, p. 528-542, 1992.
- DOLJA, V. .V, McBRIDE, H. J., CARRINGTON, J. C. Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of β -glucuronidase into the viral polyprotein. **Proceeding of the National Academy of Science, USA**, v. 89, p. 10208-10212, 1992.

- DOLJA, V. V., HERDON, K. L., PIRONE, T. P., CARRINGTON, J. C. Spontaneous mutagenesis of a plant potyvirus genome after insertion of a foreign gene. **Journal of virology**, v. 67, p. 5968-5975, 1993.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E., MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.
- FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, V., BALL, L. A. **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego, CA., Academic Press. 1259p. 2005.
- FLASINSKI, S., CASSIDY, B. G. Potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency, **Archives of virology**, v. 143, p. 2159-2172, 1998.
- GAL-ON, A. A point mutation in the FRNK motif of the potyvirus helper component-protease gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. **Phytopathology**, v. 90, p. 467-473, 2000.
- GERMAN-RETANA, S., CANDRESSE, T., ALIAS, E., DELBOS, R-P., LE GALL, O. Effects of green fluorescent protein or β -glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking *Letuce mosaic virus* isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 316-324, 2000.
- GUO, D., MERITS, A., SAARMA, M. Self-association and mapping of interaction domains of helper component-proteinase of potato A potyvirus. **Journal General Virology**, v. 80, p. 1127-1131, 1999.
- GUO, D., SPETZ, C., SAARMA, M., VALKONEN, J. P. T. Two potato proteins, including a novel ring finger protein (HIP1), interact with the potyviral multifunctional protein HCpro. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 405-410, 2003.
- GOVIER, D. A., KASSANIS, B. Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission of potato virus Y.. **Virology**, v. 57, p. 285-286, 1974.
- HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. 4^o Ed. San Diego, California: Academia Press, 2002. 1001 p.

- JOHANSEN, I. E., DOUGHERTY, W. G., KELLER, K. E., WANG, D., HAMPTON, R. O. Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in *Pisum sativum*. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 3149-3154, 1996.
- KASSANIS, B. The transmission of potato aucuba mosaic virus by aphids from plants also infected by potato viruses A or Y. **Virology**, v. 13, p. 93-97, 1961.
- KASSANIS, B., GOVIER D. A. New evidence on the mechanism of transmission of potato C and potato aucuba mosaic viruses. **Journal of General Virology**, v.10, p.99-101, 1971.
- KASSCHAU, K. D., CARRINGTON, J.C. Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. **Virology**, v. 209, p. 268-273, 1995.
- KASSCHAU, K. D., CARRINGTON, J.C. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. **Cell**, v. 95, p. 461-470, 1998.
- KASSCHAU, K. D., CARRINGTON, J.C. Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. **Virology**, v. 285, p. 71-81, 2001.
- KASSCHAU, K. D., CRONIN, S., CARRINGTON, J. C. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of Tobacco Etch potyvirus helper component-proteinase. **Virology**, v.228, p.251-262, 1997.
- KLEIN, P. G., KLEIN, R. R., RODRÍGUEZ-CEREZO, E., HUNT, A. G., SHAW, J. G. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. **Virology**, v. 204, p. 759-769, 1994.
- KOONIN, E. V., DOLJA, V. V. Evolution and taxonomy of positive strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acids sequences. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 28, p. 375-430, 1993.
- KRAUSE-SAKATE, R. Análise molecular da interação *Lettuce Mosaic Virus* (LMV)-alface, utilizando como modelo o isolado LMV-AF 199. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa. 178p. 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEGAVRE, T., MAIA, I. G., CASSE-DELBART, F., BERNARDI, F., ROBAGLIA, C. Switches in the mode of transmission select for or against a poorly aphid-transmissible

- strain of potato virus Y with reduced helper-component and virus accumulation. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 1343-1347, 1996.
- LINDQVIST, K. On the origin of cultivated lettuce. **Hereditas**, n. 46, p. 319-350, 1960.
- LÓPEZ-MOYA, J. J., WANG, R. Y., PIRONE, T. P. Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 3281-3288, 1999.
- LU, R., MARTIN-HERNANDEZ, A. M., PEART, J. R., MALCUIT, I., BAULCOMBE, D. virus-induced gene silencing in plants. **Methods**, v. 30, p. 296-303, 2003.
- MAIA, I. G., BERNARDI, F. Nucleic acid-binding properties of bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase. **Journal of General Virology**, v.77, p.869-877, 1996.
- MAIA, I. G., HAENNI, A-L., BERNARDI, F. Potyviral HC-PRO: a multifuncional protein. **Journal of General Virology**, v.77, p.1335-1341, 1996.
- MERITS, A., GUO, D., SAARMA, M. VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato virus A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. **Journal General Virology**, v. 79, p. 3123-3127, 1998.
- MOISSIARD G., VOINET, O. Viral suppression of RNA silencing in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 71–82, 2004.
- NICOLAS, O., DUNNINGTON, S. W., GOTOW, L. F., PIRONE, T. P., HEALLMANN, G. M. Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome *va* gene resistance in tobacco. **Virology**, v. 237, p. 452-459, 1997.
- OH, C-S., CARRINGTON, J. C. Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-Pro by site-directed mutagenesis. **Virology**, v. 173, p. 692-699, 1989.
- PAVAN, M. A., KUROSZAWA, C. Doenças de alface (*Lactuca sativa* L.). In: KIMATE, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A., RESENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia 2, Doenças de plantas cultivadas**, 3º ed., São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1997. p. 18-25.
- PENG, Y., KADOURY, D., GAL-ON, A., HUET, H., WANG, Y., RACCAH, B. Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 897-904, 1998.

- PIRONE, T. P. Efficiency and selectivity of helper-component-mediated aphid transmission of purified potyviruses. **Phytopathology**, v.71, p.922-924, 1981.
- PIRONE, T. P., BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. **Annual Review Phytopathology**, v.34, p.227-247, 1996.
- PLISSON, C., DRUCKER, M., BLANC, S., GERMAN-RETANA, S., LE GALL, O., THOMAS, D., BRON, P. Structural characterization of HC-PRO, a plant virus multifunctional protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.23753-23761, 2003.
- PRUSS, G., GE, X., SHI, X. M., CARRINGTON, J. C., VANCE, V. B. Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, v. 09, p. 859-868, 1997.
- RAJAMÄKI, M-L., VALKONEN, J. P. T. THE 6K₂ protein and VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicotiana glauca*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 12, p. 1074-1081, 1999.
- RATCLIFF, F., HARRISON, B. D., BAULCOMBE, D. C. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. **Science**, v. 276, p. 1558-1560, 1997.
- REVERS, F., LE GALL, O., CANDRESSE, T., MAULE, A. J. New advances understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 05, p. 367-376, 1999a.
- REVERS, F., VAN DER VLUGT, R. A. A., SOUCHE, S., LANNEAU, M., LOT, H., CANDRESSE, T., LE GALL, O. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the genome of four *Lettuce mosaic virus* isolates from Greece and Yemen. **Archives of Virology**, v. 144, p 1619-1626, 1999b.
- RIECHMANN, J. L., LAIN, S., GARCIA, J. A. The genome-linked protein and 5'RNA sequence of plum pox potyvirus. **Journal of General Virology**, v.70, p. 2785-2789, 1989.
- RIECHMANN, J. L., LAIN, S., GARCIA, J. A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **Journal of General Virology**, v.73, p. 1-16, 1992.
- ROJAS, M. R., ZERNINI, F. M., ALLISON, R. F., GILBERTSON, R. L., LUCAS, W. J. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. **Virology**, v. 237, p. 283-295, 1997.

- ROCHOW, W. F., ROSS, A. F. Virus multiplication in plants double infected by potato viruses X and Y. **Virology**, v. 1, p. 10-27, 1955.
- ROTH, B. M., PRUSS, G. J., VANCE, V. B. Plant viral suppressors of RNA silencing. **Virus Research**, v. 102, p. 97–108, 2004.
- RUIZ-FERRER, V., BOSKOVIC, J., ALFONSO, C., RIVAS, G., LLORCA, O., LÓPEZ-ABELLA, D., LÓPEZ-MOYA, J. J. Structural analysis of Tobacco etch Potyvirus HC-Pro oligomers involved in aphid transmission. **Journal of Virology**, v.79, p. 3758-3765, 2005.
- RYAN, M. D., FLINT, M. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. **Journal of General Virology**, v.78, p. 699-723, 1997.
- SÁENZ, P., QUIOT, L., QUIOT, J-B., CANDRESSE, T., GARCIA, J. A. Pathogenicity determinants in the complex virus population of a *Plum pox virus* isolate. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 14, p. 278-287, 2001.
- SÁENZ, P., SALVADOR, B., SIMÓN-MATEO, C., KASSCHAU, K. D., CARRINGTON, J. C., GARCIA, J. A. Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. **Journal of Virology**, v. 76, p. 1922-1931, 2002.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- SAVENKOV, E., VALKONEN, J. P. Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2325-2335, 2002.
- SHAAD, M. C., LELLIS, A. D., CARRINGTON, J. C. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. **Journal of Virology**, v. 71, p. 8624-8631, 1997.
- SHI, X. M., MILLER, H., VERCHOT, J., CARRINGTON, J. C., VANCE, V. B. Mutation in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. **Virology**, v. 231, p. 35-42, 1997.
- SHUKLA, D. D., WARD, C.W., BRUNT, A. A. Potato virus Y. In: **The Potyviridae**, CAB International, Wallingford, UK, 516p, 1994.

- SILHAVY, D., MOLNÁR, A., LUCIOLI, A., SZITTYA, G., HORNYIK, C., TAVAZZA, M., BURGÝÁN, J. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25- nucleotide double stranded RNAs. **The EMBO Journal**, v. 21 (12), p. 3070-3080, 2002.
- STANGARLIN, O. S. Identificação dos vírus causadores de mosaico em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistentes ao vírus do mosaico da alface nas regiões produtoras do Estado de São Paulo. Botucatu, SP. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista. 72 p. 1995.
- STENGER, D. C., FRENCH, R. Functional replacement of *Wheat streak mosaic virus* HC-Pro with the corresponding cistron from a diverse array of viruses in the family *Potyviridae*. **Virology**, v. 323, p. 257-267, 2004.
- STENGER, D. C., FRENCH, R. GILDOW, F. E. Complete deletion of *Weat streak mosaic virus* HC-Pro: a null mutant is viable for systemic infection. **Journal of Virology**, v. 79, p. 12077-12080, 2005a.
- STENGER, D. C., HEIN, G. L., FRENCH, R. Nested deletion analysis of *Wheat streak mosaic virus* HC-Pro: Mapping of domains affecting polyprotein processing and triphosphite mite transmission. **Virology**, v. 350, p. 465-474, 2006.
- STENGER, D., HEIN, G. L., GILDOW, F. E., HORKEN, K. M., FRENCH, R. Plant virus HC-Pro is a determinant of Eriophyid mite transmission. . **Journal of Virology**, v. 79, p. 9054-9061, 2005b.
- SUBBARAO, K. V. Progress toward integrated management of lettuce drop. **Plant Disease**, v. 82, p. 1068-1077, 1998.
- TAKAKI, F., SANO, T., YAMASHITA, K. The complete nucleotide sequence of attenuated onion yellow dwarf virus: a natural potyvirus deletion mutant lacking the N-terminal 92 amino acids of HC-Pro. **Archives of Virology**, v. 151, p. 1439-1445, 2006.
- TIJSTERMAN, M., KETTING, R. F., PLASTERK, R. H. A. The genetics of RNA silencing. **Annual Review Genetics**, v. 36, p. 489-519, 2002.
- THORNBURY, D. W., HELLMAN, G. M., RHOADS, R. E., PIRONE, T. P. Purification and characterization of potyvirus helper component. **Virology**, v. 144, p. 260-267, 1985.

- TOWBIN, H., GORDON, J. Immunoblotting and dot immuno-binding currents status and outlook. **Journal Immunology Methods**, v. 72, p. 313-340, 1984.
- TRIBODET, M., GLAIS, L., KERLAN, C., JACQUOT, E. Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY^N isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 2101-2105, 2005.
- URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A-L., BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, v.74, p.157-175, 2001.
- URCUQUI-INCHIMA, S., MAIA, I. G., ARRUDA, P., HAENNI, A-L., BERNARDI, F. Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. **Virology**, v.268, p.104-111, 2000.
- URCUQUI-INCHIMA, S., MAIA, I. G., DRUGEON, G., HAENNI, A-L., BERNARDI, F. Effects of mutations within the Cys-rich region of potyvirus helper component-proteinase on self-interaction. **Journal of General Virology**, v.80, p.2809-2812, 1999b.
- URCUQUI-INCHIMA, S., WALTER, J., DRUGEON, G., GERMAN-RAETANA, S., HAENNI, A-L., CANDRESSE, T., BERNARDI, F., LE GALL, O. Potyvirus helper component-proteinase self-interaction in the yeast two-hybrid system and delineation of the interaction domain involved. **Virology**, v.258, p.95-99, 1999a.
- VANCE, V. B. Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. **Virology**, v. 182, p. 486-494, 1991.
- VANCE, V. B., BERGER, P. H., CARRINGTON, J. C., HUNT, A. G., SHI, X. M. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. **Virology**, v. 206, p. 583-590, 1995.
- VARGASON, J. M., SZITTYA, G., BURGÝÁN, J., TANAKA-HALL, T. M. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. **Cell**, v. 115, p. 799-811, 2003.
- VOINNET, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends in Genetics**, v. 17, p. 449-459, 2001.
- VOINNET, O., PINTO, Y. M., BAULCOMBE, D. C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 23, p. 14147-14152, 1999.

- WALSH, K., NORTH, J., BARKER, I., BOONHAM, N. Detection of different strains of *Potato virus Y* and their mixed infections using competitive fluorescent RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 91, p. 167-173, 2001.
- WANG, D., MAULE, A. J. Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of pea seed-borne mosaic virus. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 1615-1620, 1992.
- WANG, D., MAULE, A. J. A model for seed transmission of a plant virus: Genetic and structural analysis of pea embryo invasion by pea seed-borne mosaic virus. **Plant Cell**, v. 06, p. 777-787, 1994.
- WANG, R. Y., PIRONE, T. P. Purification and characterization of turnip mosaic virus helper component protein. **Phytopathology**, v. 89, p. 564-567, 1999.
- WATERHOUSE, P. M., WANG, M. B., LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, v. 411, p. 834-842, 2001.
- WOLF, S., DEOM, C. M., BEACHY, R. N., LUCAS, W. J. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. **Science**, v. 246, p. 377-379, 1989.
- YANG, S. J., REVERS, F., SOUCHE, S., LOT, H., LE GALL, O., CANDRESSE, T., DUNEZ, J. Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in *Escherichia coli* and their infectivity to plants. **Archives of Virology**, v. 143, p. 2443-2451, 1998.
- YARWOOD, D. C. Sulphite in plant virus inoculations. **Virology**, v. 39, p. 74-78, 1969.