

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**ESTUDOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE UM ISOLADO
NECRÓTICO DE BEAN YELLOW MOSAIC VIRUS (BYMV), NÃO
TRANSMITIDO POR AFÍDEOS**

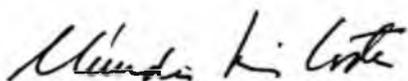
RAQUEL NEVES DE MELLO

**Dissertação apresentada ao Departamento de
Fitopatologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do grau de Mestre
em Fitopatologia.**

**BRASÍLIA
1996**

Trabalho realizado junto aos Departamentos de Fitopatologia e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação dos Professores CLÁUDIO LÚCIO COSTA e RENATO DE OLIVEIRA RESENDE.

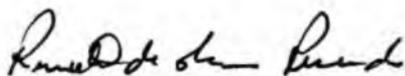
Aprovado por:



Professor Cláudio Lúcio Costa

Departamento de Fitopatologia

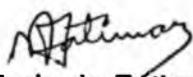
Universidade de Brasília



Professor Renato de Oliveira Resende

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília



Dra. Maria de Fátima Batista

EMBRAPA/CENARGEM

A minha mãe Maria das Neves de
Mello e ao amigo Osamu Kimura
dedico, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Cláudio Lúcio Costa pela orientação e solidariedade. Ao Professor Renato de Oliveira Resende pela co-orientação. À Dra. Maria de Fátima Batista pelas correções, sugestões e críticas. Ao Professor Juvenil Enrique Cares por buscar alternativas que ampliassem meu tempo.

Sou profundamente grata ao Professor Paulo Sérgio Brioso que me apresentou à Biologia Molecular e ao Professor Bergmann Morais Ribeiro pelo constante incentivo e por ter-me conduzido nas técnicas moleculares.

Aos Professores Elliot Watanabe Kitajima e Jaime Santana por terem sempre colocado seus laboratórios a minha disposição.

À Alice Inowe Nagata e a Paulo Ernesto Meissner F^o que, mesmo à distância, nunca deixaram de me atender.

Aos amigos que alegremente me auxiliaram durante a condução deste trabalho, da extração de RNA ao sequenciamento, da revisão bibliográfica aos slides: Berghem Morais Ribeiro, Cleber Furlanetto, Cristiano Anderson Felipe Alves, Éder Torres Tavares, Eni Braga da Silveira, Fernando Barcelos Razucki, Lucas Malardi Velloso, Marcelo Eiras, Robson Alves de Souza, Thor Vinícius Martins Fajardo e Vivian Beck Pombo.

Aos técnicos Fausto Gonçalves de Menezes e Wellington E. Ferreira pelo trabalho fotográfico. Aos funcionários da Estação Biológica pela cooperação nos ensaios biológicos.

Ao Centro Brasileiro de Sequenciamento de Proteínas e, especialmente, aos Professores Carlos André Ornelas Ricart e Marcelo Valle de Sousa, aos técnicos Ricardo Bastos Cunha e Nuno Manoel Domingues e a José Nascimento da Silva Jr. pelos dados de HPLC.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família pelo constante encorajamento e conforto.

Pela amizade e companheirismo, agradeço a Jeander Oliveira Caetano.

LISTA DE ABREVIATURAS

A: adenina.

BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate.

BSA: albumina de soro bovino.

C: citosina.

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar.

DEPC: dietil pirocarbonato.

DH 5 α : cepa de *Escherichia coli*.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DNA Taq polimerase: enzima termoestável proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*.

dNTP: deoxinucleotídeo.

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético.

g: grama.

G: guanina.

GPC: "gel permeation chromatography", cromatografia de penetração de gel.

HPLC: "high performance liquid chromatography", cromatografia líquida de alta performance.

IPTG: isopropylthio- β -D-galactosidase.

kb: 10³ pares de base.

l: litro.

LB: meio Luria-Bertani, LB Broth Base (Lennox L Broth Base).

LB ágar: meio LB com ágar.

M: molar.

mA: miliampere.

mg: miligrama.

ml: mililitro.

mm: milímetro.

mM: milimolar.

M_r: mobilidade relativa.

NBT: nitroblue tetrazolium.

nm: nanômetros.

ORF: “open reading frame”, fase aberta de leitura, região codificadora.

pb: pares de base.

PCR: “polymerase chain reaction”, reação em cadeia da polimerase.

PEG: polietileno glicol.

pGemT Vector: plasmídeo para clonagem de fragmentos de PCR.

pH: potencial hidrogeniônico.

“primer”: iniciador.

p/v: peso por volume.

PVP: polivinil pirrolidone.

RNA: ácido ribonucleico.

RNAse free: livre de enzimas que degradam RNA.

rpm: rotações por minuto.

rRNA: ácido ribonucleico ribossomal.

RT: transcriptase reversa.

RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase.

SDS: sodio dodecil sulfato.

SDS/PAGE: "sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis", eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante.

T: timina.

T4 DNA Ligase: enzima para fazer ligação.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina.

TFA: ácido trifluoracético.

"template": molde.

u: unidade de concentração de enzima.

UV: ultra-violeta.

V: volts.

v/v: volume por volume.

x: vezes.

X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β galactopyranoside.

μ g: micrograma.

μ l: microlitro.

ÍNDICE GERAL

	Página
Apresentação.....	i
Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Lista de abreviaturas.....	v
Índice geral.....	viii
Índice de tabelas.....	x
Índice de figuras.....	xi
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	17
MATERIAIS E MÉTODOS	
Isolados virais.....	18
Transmissão por afídeo.....	19
Transmissão de BYMVn por afídeo, utilizando-se diferentes fontes de inóculo.....	20
Transmissão dependente.....	20
Processamento, montagem e identificação dos afídeos.....	21
Purificação das partículas virais.....	22
Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	22
Western blot.....	23
Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	24
Extração de RNA foliar total.....	25
Preparação de DNA complementar (cDNA).....	25
"Polymerase chain reaction" (PCR).....	27

Eletroforese em gel de agarose.....	27
Eluição de DNA.....	27
Reamplificação do fragmento obtido por PCR.....	28
Clonagem do DNA.....	28
Digestão do DNA plasmidial.....	30
Extração de DNA plasmidial em larga escala.....	30
Sequenciamento de nucleotídeos.....	31

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Transmissão por afídeo.....	32
Purificação das partículas virais e western blot.....	36
Perfil peptídico de HPLC.....	38
Amplificação, clonagem e sequenciamento de nucleotídeos.....	39

CONCLUSÃO.....	59
----------------	----

RESUMO.....	61
-------------	----

ABSTRACT.....	64
---------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
---------------------------------	----

APÊNDICE

Lista de tampões e reagentes.....	79
Lista de aminoácidos e seus símbolos.....	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Transmissão de BCMV e de BYMVn por diferentes espécies de afídeos.....pág. 33

Tabela 2: Teste de transmissão de BYMVn por *M. persicae* e *M. nicotianae*, variando-se as fontes de inóculo e as plantas-teste.....pág. 35

Tabela 3: Teste de transmissão dependente de BYMVn por *M. nicotianae*, utilizando-se BCMV como vírus auxiliar.....pág. 35

Tabela 4: Porcentagem de similaridade entre as sequências de nucleotídeos do N-terminal da CP de BYMVn e de outros isolados de BYMV.....pág. 52

Tabela 5: Porcentagem de similaridade entre as sequências deduzidas de aminoácidos do N-terminal da CP de BYMVn e de outros isolados de BYMV.....pág. 55

Tabela 6: Porcentagem de identidade entre as sequências deduzidas de aminoácidos do N-terminal da CP de BYMVn e de outros isolados de BYMV.....pág.56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - (a) Organização genômica de potyvirus (adaptado de Maia et al., 1996), mostrando as ORFs traduzidas do RNA genômico (P1, HC-Pro, P3, C1, 6k, N1a, N1b e CP); (b) Oligonucleotídeos utilizados para amplificar BYMVn, indicando a região de anelamento destes no gene da CP, e o fragmento esperado de 414 pb na reação de PCR.....pág.26

Figura 2 - pGemT Vector, plasmídeo utilizado para clonagem de produtos de PCR, mostrando (a) os sítios das enzimas de restrição e (b) o sítio de inserção do fragmento amplificado de BYMVn, com as projeções de timina (T).....pág.29

Figura 3 - Western blot da proteína da capa de BYMVn. Linha 1, potyvirus não identificado e linha 2, BYMVn. M, marcadores de proteína cujas massas moleculares (kDa) estão indicadas por setas.....pág. 37

Figura 4 - Perfil de separação dos peptídeos por cromatografia líquida de alta performance da digestão trípica das proteínas da capa de dois potyvirus, (a) potyvirus não identificado, (b) BYMVn e (c) controle sem proteína. Números iguais equivalem a picos coincidentes.....pág. 40

Figura 5 - RNA foliar total extraído de plantas de feijão infectadas com BYMVn pelo método do isotiocianato/fenol/clorofórmio (Chomczynski & Sacchi, 1987). Foram

aplicados 3 μ l (linha 1), 4 μ l (linha 2), e 5 μ l (linha 3) de um volume total de extração de 1000 μ l. RNAs ribossômicos são indicados na figura.....pág. 41

Figura 6 - Produtos de RT-PCR obtidos a partir de RNA total extraído de plantas de feijão infectadas com BYMVn (linha 1), plantas saudias (linha 2) e plantas infectadas com um potyvirus não identificado (linha 3). M indica o marcador 100 pb DNA Ladder (Gibco) e a seta indica o fragmento amplificado (em pb).....pág. 42

Figura 7 - Fragmento amplificado por RT-PCR, submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, o qual foi eluído utilizando o Sephaglas BandPrep Kit (Pharmacia Biotech) e utilizado como molde para um segundo PCR. A seta indica o tamanho do fragmento (em pares de bases). M: marcador 100 pb DNA Ladder (Gibco).....pág. 44

Figura 8 - Produtos de PCR, obtidos a partir da amplificação de uma única banda de PCR eluída de gel de agarose. Utilizou-se na reação de PCR 1 μ l de um volume total de 20 μ l de eluição. Não diluído (1), diluído 1:10 (2) e 1:100 (3). M indica o marcador 100 bp DNA Ladder (Gibco) e a seta indica o fragmento amplificado (em pb).....pág. 45

Figura 9 - Linhas 1 à 20, cDNA plasmidial extraído, através do FlexiPrep Kit (Pharmacia Biotech), após ligação em pGemT Vector (Promega) e transformação em *E. coli*. Os clones 7, 19 e 20 foram escolhidos para digestão posterior. M, marcador 1kb DNA Ladder (Gibco). As setas indicam os tamanhos dos clones (em kb).....pág. 46

Figura 10 - Digestão dos clones com SphI e NdeI, mostrando o fragmento liberado. Linhas 1 e 2, potyvirus não identificado e linha 3, BYMVn. M: marcador 100 pb DNA ladder. A seta indica o tamanho do fragmento (414 pb) clonado.....pág. 47

Figura 11 - Localização no genoma da região (a) e do número de nucleotídeos sequenciados (b) e a comparação das sequências deduzidas de aminoácidos (c) da região N-terminal da CP de BYMVn e de outras estirpes de BYMV. "Triplet" conservado NAG em negrito. Alinhamento feito a partir do primeiro aminoácido da CP. Origem das sequências na Tabela 4.....pág. 48

Figura 12 - Autoradiografia de gel de sequenciamento, mostrando a sequência de nucleotídeos da região 5' do gene da CP de BYMVn (a) comparada à sequência publicada de BYMV-GDD (Hammond & Hammond, 1989) (b). A seta indica o primeiro nucleotídeo do gene da CP. O "triplet" deduzido Asn-Ala-Gly (NAG) é indicado ao lado de seus respectivos nucleotídeos.....pág. 50

Figura 13 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos da região N-terminal da proteína da capa de BYMVn e de outras estirpes de BYMV. As sequências foram obtidas através do programa Genetics Computer Group (Program Manual for the Wisconsin Package). BYMV-Gladiolus (Boye et al., 1992); BYMV-M-I (Mathews et al., 1995); BYMV-CS (Takahashi et al., 1990); BYMV-MB4 e BYMV-MB4 (Nakamura et al.,

1994); BYMV-GDD (Hammond & Hammond, 1989); BYMV-Danish gladiolus (Boye et al., 1990); BYMV-S (Tracy et al., 1992).....pág. 53 e 54

INTRODUÇÃO

Doolittle & Jones (1925) foram os primeiros a isolar bean yellow mosaic virus (BYMV), o qual está inserido no gênero *Potyvirus*, da família Potyviridae. Esses vírus são compostos de uma molécula de RNA monopartida, senso positivo, de fita única de cerca de 10 kb, encapsidada por aproximadamente 2000 unidades de proteína da capa (CP) formando uma partícula flexuosa longa. O genoma codifica uma poliproteína única de cerca de 3000 aminoácidos, a qual é clivada em proteínas funcionais por três proteinases virais (revisão por Riechmann *et al.*, 1992).

BYMV é um dos poucos potyvirus com um círculo de hospedeiras numeroso, infectando 233 espécies em 71 gêneros de 21 famílias. Esse vírus infecta naturalmente leguminosas e não leguminosas de importância econômica, como *Arachis hypogaea* (amendoim), *Cicer arietinum* (grão-de-bico), *Crotalaria*

spectabilis (crotalária), *Cucurbita pepo* (abóbora), *Glycine max* (soja), *Lupinus luteus* (tremoço amarelo), *Medicago sativa* (alfafa), *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Trifolium hybridum*, *T. incarnatum*, *T. repens*, *T. subterraneum*, *T. vesiculatum* (trevos), *Vicia faba* (feijão fava), *Vicia sativa* (feijão fava) e *Vigna unguiculata* (feijão caupi) (Edwardson & Christie, 1991).

BYMV causa perdas severas em muitas leguminosas de importância econômica ao redor do mundo. Shukla *et al.* (1994) listaram perdas em trevo, feijão fava, feijão mungo e lentilha nos EUA, leguminosas forrageiras na Austrália, feijão no Japão e feijão fava na Nova Zelândia. No Brasil esse vírus encontra-se amplamente distribuído, tanto em feijão como em muitas outras hospedeiras. A incidência é considerada pequena, porém, sob condições de campo, em plantas de feijão naturalmente infectadas, já se constatou perdas de 41% das sementes (Hampton, 1975).

A dispersão natural dos potyvirus é realizada por afídeos, de uma maneira não persistente. Quarenta e seis espécies de afídeos em 25 gêneros são relatadas como transmissoras de BYMV. Destas, as mais importantes são *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae*, *Macrosiphum euphorbiae* e *Myzus persicae* (Edwardson & Christie, 1991).

A transmissão de potyvirus por afídeos requer a interação entre duas proteínas codificadas pelo vírus: a CP como constituinte do vírion e a proteinase “helper component” (HC-Pro). A CP dos potyvirus é composta de um região central que é bastante conservada entre os vírus dessa família e regiões N (amino) e C (carboxi) terminais altamente variáveis em tamanho e na seqüência de aminoácidos. Essas regiões terminais são características de cada espécie de

potyvirus. Na maioria dos casos, a perda da transmissão por afídeos é atribuída a mutações na região N-terminal da CP (Atreya *et al.*, 1990 e 1991; Gal-On *et al.*, 1992). HC-Pro é uma proteína multifuncional (para revisão, ver Maia *et al.*, 1996). HC-Pro é um polipeptídeo rico em cisteína consistido de um domínio do terminal N variável e um domínio do terminal C conservado. Mutações nesses dois domínios distintos mostraram que HC-Pro está envolvida na transmissão por afídeos (Granier *et al.*, 1993). As relações entre a CP e a HC-Pro e entre essas proteínas e o afídeo, bem como os mecanismos de transmissão, não foram ainda determinados.

Poucos potyvirus cujas HC-Pro são inativas foram relatados. Potato virus C (PVC) foi o primeiro potyvirus no qual encontrou-se uma HC-Pro deficiente (Kassanis & Govier, 1971a e b). PVC é uma estirpe de potato vírus Y (PVY), o qual produz uma HC-Pro idêntica em tamanho e em reação imunológica à HC-Pro de PVY, mas é incapaz de auxiliar a transmissão por afídeos de vírions purificados (Thornbury *et al.*, 1990).

Kassanis & Govier (1971a e b) mostraram que afídeos podiam transmitir potato aucuba mosaic potexvirus (PAMV) e PVC a partir de plantas infectadas com um deles somente, se os afídeos primeiro tivessem acesso a plantas infectadas com PVY, que funcionaria como vírus auxiliar. Govier & Kassanis (1974a) não puderam transmitir PVY e PAMV por *M. persicae* através de preparações purificadas em membrana. Quando extratos de plantas infectadas com cada um dos vírus foram submetidos a ultracentrifugação, os vírions foram removidos. Estes extratos foram adicionados às preparações purificadas, tornando possível a transmissão. Concluíram assim que a transmissão de PVY por afídeos dependia

da presença de um componente adicional que era muito menor que a partícula viral. Govier & Kassanis (1974b) mostraram a transmissão de PVY, henbane mosaic vírus (HMV), tobacco severe etch vírus (TSEV) e PAMV, através de membrana. Os afídeos tinham acesso ao sobrenadante obtido por ultracentrifugação de plantas infectadas com PVY misturado ao extrato de um dos vírus ou tinham acesso ao sobrenadante antes e ao extrato depois. Ficou-se sabendo assim que os potyvirus não podem ser transmitidos sem a presença de um componente auxiliar (HC-Pro), o qual pode ser extraído de plantas infectadas com potyvirus, mas não de plantas sadias. Esses autores lançaram a hipótese de que HC-Pro possui dois sítios de afinidade, um com o estilete do vetor e outro com a CP da partícula viral e utilizaram pela primeira vez o termo "helper component".

Em 1977, Govier e colaboradores fizeram um estudo mais detalhado a respeito de HC-Pro. Eles constataram que se tratava de uma proteína, uma vez que esta perdia sua atividade quando incubada com tripsina ou pronase ou quando aquecida à 55°C por 5 minutos, mas não quando incubada com ribonuclease. Eles testaram a inibição da atividade de HC-Pro por antissoros para a CP e para a proteína de inclusão citoplasmática, o que não afetou a transmissão. No entanto, quando HC-Pro foi incubada com o seu próprio antissoro, houve um forte decréscimo na transmissão. Experimentos de filtração e ultrafiltração de gel sugeriram que HC-Pro tem um peso molecular que varia de 100 à 200 kDa, enquanto a proteína da capa varia de 28 à 34 kDa e a proteína de inclusão é de cerca de 67 kDa. Assim, foi descartada a hipótese de que HC-Pro seria a proteína da capa ou a de inclusão.

Hellmann *et al.* (1983) deram a primeira evidência de que HC-Pro era um polipeptídeo de origem viral. Eles traduziram o RNA genômico de tobacco vein mottling virus (TVMV) *in vitro* em sistema derivado de reticulócitos de coelho e caracterizaram os produtos da tradução por precipitação com antissoros específicos. Antissoro contra HC-Pro de TVMV reagiu com um único grupo de produtos da tradução. Embora indireto, este resultado fortemente sugere que HC-Pro é um produto do gene viral e não uma substância produzida pela hospedeira em resposta à infecção viral. Esses autores, no entanto, utilizaram antissoro produzido com preparações de HC-Pro que continham outras proteínas, o que tornou os dados não conclusivos. Thornbury & Pirone (1983) confirmaram a hipótese de que HC-Pro era codificada pelo vírus e constataram que HC-Pro distintas sorologicamente são produzidas em resposta à infecção por potyvirus distintos.

Thornbury *et al.* (1985) submeteram HC-Pro de TVMV e HC-Pro de PVY a fracionamento em gradiente de sacarose, seguido por cromatografia de afinidade em oligo(dT) celulose e por gel de eletroforese (SDS-PAGE). Os pesos moleculares aparentes das subunidades das HC-Pro purificadas foram de 53 e de 58 kDa para TVMV e PVY, respectivamente. Eles constataram que o antissoro para essas HC-Pro purificadas bloquearam especificamente a atividade da HC-Pro homóloga, verificado através de ensaios de transmissão por afídeo, e precipitaram produtos de 75 kDa da tradução *in vitro* do RNA homólogo. Eles encontraram um peso molecular das HC-Pro de TVMV e de PVY biologicamente ativas e não dissociadas, como determinado por HPLC/GPC, de 100 à 150 kDa, sugerindo que a molécula ativa de HC-Pro é um dímero.

Thornbury *et al.* (1990) clonaram e sequenciaram cDNAs que incluíam os cistrons HC-Pro de PVC e de uma estirpe de PVY, a qual produzia HC-Pro biologicamente ativa. Encontraram uma proteína codificada por PVC que era similar em peso molecular e em reatividade imunológica à HC-Pro de PVY. A região HC-Pro das duas estirpes mostrou 92% de homologia de nucleotídeos, com 24 aminoácidos diferentes na seqüência derivada. Comparando as seqüências de HC-Pro de PVC e de PVY com as de outros quatro potyvirus, PVYn, TVMV, TEV e plum pox virus (PPV), revelaram-se duas mudanças de aminoácidos específicas para HC-Pro de PVC em regiões conservadas nos demais potyvirus, as quais poderiam ser responsáveis pela inabilidade de HC-Pro de PVC em auxiliar a transmissão. Uma das mudanças ocorreu próximo à porção central de HC-Pro e resultou na mudança de Ile para Val, ambos aminoácidos hidrofóbicos. A segunda troca ocorreu de Lys para Glu em uma região rica em cisteína, o que resultou na colocação de um aminoácido ácido no lugar de um básico. Baseados nas constatações de Govier *et al.* (1977) e Raccah & Pirone (1984) de que íons Mg^{2+} são necessários para manter a atividade de HC-Pro em certas condições de tamponamento, os autores inferiram que esta troca de Lys para Glu poderia resultar numa falha na ligação de íon metal requerida para a atividade biológica de HC-Pro. Essas mutações (Lys → Glu e Ile → Val) também foram encontradas em estirpes com HC-Pro deficiente de zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) de Michigan, USA (Grumet *et al.*, 1992) e de Reunion Island (Granier *et al.*, 1993).

Atreya *et al.* (1992) fizeram mutações de sítio dirigido no gene HC-Pro de TVMV. Foram mutados os resíduos Lys para Glu e Ile para Val, nas posições que corresponderiam em TVMV às mutações naturais encontradas na HC-Pro de PVC.

O mutante TVMV-307 (Lys → Glu) não foi transmitido por afídeo. Aproximadamente seis a sete resíduos cisteína estão presentes em ambos os terminais N e C. Esses resíduos em polipeptídeos ricos em cisteína freqüentemente formam pontes dissulfito intermoleculares na oligomerização de proteínas. HC-Pro biologicamente ativa pode existir como um dímero. Esses autores inferiram que a mudança de Lys para Glu na posição 307 poderia prevenir a interação iônica entre monômeros de HC-Pro, o que resultaria na perda da dimerização e perda da atividade de HC-Pro de TVMV-307 nos bioensaios de transmissão por afídeos.

Nakashima *et al.* (1993) fizeram o primeiro relato de uma comparação direta de seqüências de aminoácidos de HC-Pro induzidas por isolados de potyvirus transmitidos e não transmitidos por afídeos. Comparando duas seqüências de turnip mosaic virus (TuMV), os autores encontraram seis aminoácidos diferentes, quatro na porção N-terminal e dois na porção C-terminal, os quais parecem regular a atividade de HC-Pro necessária para a transmissão de TuMV por afídeos.

Huet *et al.* (1994) introduziram fragmentos de DNA de parte da HC-Pro de uma estirpe de ZYMV com HC-Pro deficiente em um clone do genoma completo de uma estirpe de ZYMV transmitida por afídeos. A primeira troca incluiu duas de três mutações previamente associadas a perda da atividade de HC-Pro como componente auxiliar na transmissão de ZYMV, a primeira mutação correspondendo a uma substituição de Asp para Gly (em uma região não conservada) e a segunda correspondendo a uma mudança de Arg para lie (dentro de um bloco conservado). Essas trocas resultaram em uma redução na transmissão de 57,4% para 20,6% quando os vírions foram adquiridos de plantas e de 83,1% para 37,2% quando

adquiridos em membrana. A segunda troca incorporou uma única mutação de Thr para Ala dentro da região conservada Pro-Thr-Lys (PTK), resultando na perda total da atividade de HC-Pro na transmissão por afídeos, tanto a partir de plantas como através de membranas. Como o resíduo Lys da porção conservada Lys-Ile-Thr-Cys (KITC), o qual acredita-se estar relacionado com a perda de atividade em PVY, TVMV e na estirpe Michigan de ZYMV, não é mutado na HC-Pro do ZYMV deficiente, propôs-se que mais de um sítio em HC-Pro poderia estar funcionalmente relacionado com a transmissão por afídeos. Na ausência de prova direta do modo de ação dessas mutações na transmissão por afídeos, os autores sugeriram dois possíveis mecanismos: (i) HC-Pro serve como uma ligação entre o vírus e o estilete. Neste caso, dois aminoácidos são requeridos para a ligação, isto é, um bloco de aminoácidos (ou KITC ou PTK) é necessário para a fixação no vírus e o outro para a fixação no estilete do afídeo. (ii) HC-Pro é biologicamente ativa somente na forma dímera. Os blocos de aminoácidos KITC e PTK estão envolvidos na formação do dímero da HC-Pro biologicamente ativa. Uma mutação em qualquer um dos dois interferiria na formação do dímero e afetaria a atividade da proteína.

Canto *et al.* (1995) fizeram uma análise comparativa dos genes HC-Pro dos isolados não transmitidos por afídeos, PVY-0 NAT e PVY-1 com um isolado transmitido, PVY-0, mostrando que uma única substituição de aminoácido diferenciou a HC-Pro de PVY-0 NAT da HC-Pro de PVY-0. A substituição foi localizada dentro de uma região rica em cisteína na região N-terminal da proteína, na mesma posição de mutações encontradas em outros potyvirus com HC-Pro deficiente, embora o caráter da troca tenha diferido: Lys → Glu em PVC e nos

isolados R5A (Granier *et al.*, 1993) e Connecticut (Grumet *et al.*, 1992) de ZYMV; Lys → Asn no isolado PVY-0 NAT. Por outro lado, os autores encontraram duas substituições de aminoácidos na HC-Pro de PVY-1: uma delas (Gly → Asp) dentro de uma região rica em cisteína e a outra (Ser → Gly) na região C-terminal da proteína. Descobriram também uma única troca de aminoácidos que diferencia a HC-Pro do isolado PVY-0 NAT daquele do isolado PVY-0, na mesma posição (aminoácido 334) da mutação que se acredita causar a perda da atividade biológica da HC-Pro de PVC. A substituição diferiu, no entanto, no tipo de aminoácido. Na HC-Pro de PVY-0 NAT, um resíduo não carregado (Asn) foi substituído por um altamente básico (Lys). No caso de PVC e dos isolados R5A e Connecticut de ZYMV, um resíduo carregado negativamente (Glu) foi substituído por um básico (Lys). Atreya & Pirone (1993), baseados em resultados de mutação de sítio dirigido, constataram que um resíduo altamente básico é necessário nessa posição particular para preservar a atividade de HC-Pro de TVMV e que a atividade poderia ser abolida por resíduos fracamente básicos. A análise comparativa dos genes HC-Pro dos isolados PVY-1 e PVY-0 mostraram duas substituições de aminoácidos. Uma delas, localizada na posição 639, foi uma troca entre resíduos não carregados (Gly → Ser). A outra foi localizada perto do N-terminal da proteína, na posição 319, dentro de uma região rica em cisteína que parece estar relacionada, segundo Atreya & Pirone (1993), com a atividade biológica da proteína na transmissão. Um resíduo Asp carregado negativamente foi substituído por um resíduo Gly altamente conservado não carregado. Como esses aminoácidos têm índices hidropáticos muito diferentes, os autores sugeriram que a troca poderia alterar as propriedades biológicas da proteína e explicar a

inabilidade de recuperar a proteína na fração solúvel nos passos finais do processo de purificação, talvez, devido à agregação.

De posse de todas essas informações, é possível afirmar que as substituições de Lys para Glu no bloco KITC na região N-terminal e de Thr para Ala no bloco conservado PTK na metade C-terminal da HC-Pro estão envolvidas na perda da transmissão de isolados de potyvirus por afídeos. No entanto, a forma pela qual essas mutações afetam a atividade de HC-Pro permanece especulativa.

Pirone (1981) sugeriu que havia algum grau de especificidade na interação de HC-Pro com o vírus. HC-Pro preparada a partir de plantas infectadas com BYMV auxiliaram a transmissão do mesmo, bem como de PVY e de TVMV, porém HC-Pro de PVY e HC-Pro de TVMV, embora tenham auxiliado eficientemente a transmissão de ambos, não foram eficientes para auxiliar a transmissão de BYMV. Outras evidências de que HC-Pro de uma espécie de potyvirus pode mediar a transmissão de outra, mas não de todos os membros do gênero, devido a uma certa especificidade, foram dadas por Lecoq & Pitrat (1985) e Sako & Ogata (1981).

Pirone e Thornbury (1983) indicaram um novo caminho no papel que vírions e HC-Pro tinham na regulação da transmissão de potyvirus por afídeos. Utilizando três isolados de tobacco etch vírus (TEV), um altamente (HAT), um deficientemente (PAT) e um não (NAT) transmitido por afídeos, esses autores encontraram uma HC-Pro altamente ativa no isolado PAT, sugerindo que a ausência ou deficiência de HC-Pro não era responsável pela diferença nas taxas de transmissão. Os resultados apresentados sugeriram que não somente HC-Pro

estaria envolvida na regulação da eficiência de transmissão, mas provavelmente também a CP.

Harrison & Robinson (1988) compararam as seqüências de nucleotídeos do final N-terminal do gene da CP de muitos potyvirus e apontaram mutações no "triplet" conservado Asp-Ala-Gly (DAG) nos isolados não transmitidos por afídeos como responsáveis pela perda da transmissão. Esses autores sugeriram que a seqüência DAG está envolvida na ligação mediada por HC-Pro dos vírions ao aparelho bucal do afídeo e que o vírion é liberado para inoculação pela clivagem do N-terminal da CP por enzimas do tipo tripsina, presentes na saliva do afídeo.

Atreya *et al.* (1990) demonstraram que uma mutação de ponto, substituindo Gly por Asp no "triplet" DAG da CP de TVMV, induziu a perda da transmissão, confirmando o papel chave dessa pequena seqüência de aminoácidos na transmissão por afídeos. Esses autores compararam as seqüências de nucleotídeos no cistron da CP de dois isolados de TVMV, um transmitido (AT) e um não transmitido (NAT) por afídeos, revelando uma única diferença de nucleotídeo (G → A) na posição 8445. Essa mudança altera um único resíduo aminoácido (Gly → Glu) na posição 2747, o qual ocupa a terceira posição do "triplet" DAG. Substituindo a região da CP de um clone de cDNA do genoma completo de TVMV AT por um fragmento de cDNA representando a região CP de TVMV NAT e inoculando o RNA transcrito em plantas de fumo, esses autores descobriram que os afídeos não transmitiam o vírus híbrido resultante. Os resultados mostraram que uma única troca de nucleotídeo, levando a uma única troca de aminoácido, impede a transmissão de TVMV por afídeos. Este resultado constituiu-se na primeira evidência direta do papel da CP na transmissão por afídeos.

Lecoq *et al.* (1991) fizeram ensaios de transmissão com os vírions e com HC-Pro de um isolado altamente transmitido (HAT) e um deficientemente transmitido (PAT) de ZYMV. Esses autores detectaram um componente sorologicamente relacionado com HC-Pro em produtos de tradução *in vitro* de HC-Pro de ZYMV e concluíram que uma forma ineficiente de HC-Pro de ZYMV PAT é produzida e responsável pela deficiência de transmissão do isolado. Em experimentos de aquisição *in vitro*, altos níveis de transmissão foram conseguidos quando vírions purificados de ZYMV PAT foram combinados à HC-Pro de um isolado não transmitido por afídeo, ZYMV NAT. Concluíram assim que a deficiência em ZYMV PAT está associada a sua HC-Pro, enquanto que a de ZYMV NAT está associada a sua CP.

Há potyvirus não transmitidos por afídeos nos quais o "triplet" DAG é conservado. No isolado PVY-18, o resíduo após Gly difere de um isolado transmitido (Shukla *et al.*, 1988c), enquanto o isolado ZYMV-CT difere de um isolado transmitido no resíduo precedente ao Asp do "triplet" (Grumet & Fang, 1990). No entanto, no caso de PVY-18, não ficou estabelecido se a perda da transmissão por afídeo foi causada pela mutação na CP ou por uma deficiência de HC-Pro, enquanto que, no caso de PVY-D, nenhum dado foi apresentado sobre a frequência de transmissão.

Atreya *et al.* (1991) mostraram que qualquer troca no terceiro resíduo do "triplet" DAG resulta na perda da transmissão por afídeo. Alterando ou deletando aminoácidos por mutagênese de sítio dirigido, esses autores constataram que a mutação Ala → Thr nesse "triplet" reduziu drasticamente a transmissão, enquanto que a mutação Asp → Asn não teve nenhum efeito, e a mutação Asp → Lys

consistentemente reverteu o resíduo para o tipo selvagem. A mutação Lys → Glu, no resíduo adjacente ao Gly do “triplet”, reduziu drasticamente a transmissão, enquanto a mutação Gln → Pro, sete resíduos adiante da glicina não teve qualquer efeito. Comparando as seqüências de 22 isolados de potyvirus, estes autores sugeriram que a presença de um resíduo Gly na terceira posição do “triplet” DAG é crítica para a transmissão por afídeos e que certas trocas em resíduos adjacentes a essa posição abolem ou reduzem enormemente a transmissão. A comparação de seqüências mostrou que as mutações comuns nesse “triplet” que causam perda da transmissão são de Gly → Asp, Glu, Gln, Ser ou Leu.

Nakashima *et al.* (1991) encontraram o “triplet” DAG em uma estirpe de TuMV transmitida por afídeos, enquanto que em uma estirpe não transmitida havia uma mutação de Gly para Asn. Com isso mais uma mudança no terceiro aminoácido do “triplet” soma-se aquelas listadas por Atreya *et al.* (1991) como responsável pela não transmissão de potyvirus por afídeos.

Gal-On *et al.* (1992) determinaram as seqüências de aminoácidos de três isolados de ZYMV, um transmitido (AT) e dois não transmitidos (NAT), e as compararam. Os isolados NAT diferiram do isolado AT por terem um resíduo Thr ao invés de Ala na região do “triplet” DAG. A transmissão foi restaurada em uma progênie do vírus derivada de um clone infeccioso do isolado NAT no qual Thr foi trocado novamente por Ala através de mutagênese de sítio dirigido, dando a primeira prova direta do papel do “triplet” na transmissão por afídeos. Ficou evidente que o segundo e o terceiro aminoácidos no “triplet” DAG são essenciais para a transmissão, embora a extensão da perda da transmissão por afídeo dependa da natureza de HC-Pro, CP e/ou do tipo de planta hospedeira envolvida.

Esses autores propuseram duas hipóteses sobre o mecanismo da transmissão por afídeos envolvendo a região N-terminal, baseados em dados de Atreya *et al.* (1991) e nos resultados por eles encontrados: (i) os aminoácidos no “triplet” DAG servem como sítio de ligação para HC-Pro ou para o estilete do afídeo; (ii) os aminoácidos do “triplet” não estão diretamente envolvidos na ligação, mas efetuam a dobra da região N-terminal de maneira que exponha (nos isolados AT) ou cubra (nos isolados NAT) o sítio de ligação que pode estar localizado em outro ponto da CP. Esses autores também mostraram que trocas conformacionais são previstas quando o Gly neutro é substituído por aminoácidos carregados, hidrofílicos ou hidrofóbicos. Verificaram que nos isolados NAT, Gly é substituído por um aminoácido carregado [Gly → Glu em TVMV (Atreya *et al.*, 1990); Gly → Asp em soybean mosaic virus (SMV) (Jayaram *et al.*, 1991)], por um aminoácido polar [Gly → Ser em TEV (Allison *et al.*, 1985)] ou por um aminoácido hidrofóbico [Gly → Leu em PPV (Maiss *et al.* 1989)].

As regiões N e C terminais da CP estão expostas na superfície da partícula viral como demonstrado por sua suscetibilidade a tratamento enzimático brando (Shukla & Ward, 1989a; Shukla *et al.*, 1988b). A remoção da região N-terminal resulta em perda da transmissão por afídeo (Salomon, 1989; Salomon, 1992), não afetando entretanto a infectividade e a morfologia das partículas. Uma vez que o segmento N-terminal da CP é necessário para a transmissão por afídeos, Salomon & Bernardi (1995) lançaram a hipótese de que a região contendo a seqüência DAG sozinha competiria com o vírion durante a aquisição pelo afídeo. Para testar essa hipótese, esses autores clonaram a região N-terminal do gene da CP de um isolado israelense de maize dwarf mosaic vírus (MDMV-L) em um vetor de

expressão bacteriano, expressaram-na como uma proteína de fusão, purificaram-na e a utilizaram em experimentos controlados de transmissão por afídeos em competição com MDMV. Os resultados mostraram que essa região inibe a transmissão de MDMV por afídeos, indicando um envolvimento direto da região N-terminal da CP na transmissão. Os afídeos foram pré alimentados com o N-terminal (como uma proteína de fusão ou clivado por Xa proteinase), adquirindo em seguida os vírions e HC-Pro. Sob essas condições, a inibição pelo N-terminal da CP foi observada. Para esses autores, a hipótese mais simples para explicar a diferença na ação do N-terminal, quando é parte da partícula viral ou como uma proteína livre, é que, na partícula intacta, o N-terminal não está livre para interagir com os estiletos do afídeo e que a presença de HC-Pro é exigida para induzir uma troca conformacional como, por exemplo, o desdobramento do N-terminal. Embora a região N-terminal esteja na superfície externa da partícula viral, ela pode estar interagida com a região central da CP e necessitar da intervenção de HC-Pro para ser liberada.

Kantrong *et al.* (1995) utilizaram anticorpos monoclonais contra duas estirpes de TuMV, uma transmitida (TuMV 1) e uma não transmitida por afídeos (TuMV 31), e antissoros contra peptídeos sintéticos da região N-terminal da CP. Tanto o antissoro monoclonal como o policlonal contra a região que contém o "triplet" DAG inibiram a transmissão de TuMV 1 por afídeos. Como a única mudança na região na qual os antissoros tinham atividade era de Gly (em TuMV 1) para Asn (em TuMV 31), ficou claro que essa mudança teve um papel chave na perda da capacidade de transmissão de TuMV 31.

Atreya *et al.* (1995) fizeram uma análise mutacional dos aminoácidos da região N-terminal da CP envolvidos na transmissão de potyvirus por afídeos e concluíram que: (i) somente são aceitáveis Asp ou Asn na primeira posição do "triplet" DAG. Curiosamente, Asn é o único aminoácido além de Asp encontrado nessa posição em isolados de potyvirus ocorrendo naturalmente: BYMV (Boye *et al.*, 1990; Hammond & Hammond, 1989; Mathews, 1995; Nakamura, 1994; Takahashi *et al.*, 1990; Tracy *et al.*, 1992) e CIYVV (Brian *et al.*, 1992; Tracy *et al.*, 1992; Uyeda *et al.*, 1991); (ii) Ala é especificamente exigida na segunda posição do "triplet" DAG; (iii) a diferença mais comumente encontrada entre isolados transmitidos e não transmitidos é a substituição de Gly na terceira posição do "triplet" DAG; (iv) embora o aminoácido seguinte ao "triplet" DAG não seja altamente conservado, algumas mudanças poderiam afetar adversamente a transmissão.

Apesar de já se conhecer as regiões na CP e na HC-Pro responsáveis pela transmissão de potyvirus por afídeos, nenhuma interação entre estas proteínas e entre as mesmas e o afídeo foi ainda claramente demonstrada. O papel no mecanismo de transmissão dos blocos DAG na CP e KITC e PTK na HC-Pro continua desconhecido.

OBJETIVOS

Em estudos previamente realizados no Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, uma estirpe necrótica de BYMV, denominada BYMVn, foi caracterizada. A identificação desta estirpe foi baseada em círculo de hospedeiras e sintomatologia, propriedades físicas *in vitro*, sorologia e microscopia eletrônica. Os testes de transmissão por afídeos mostraram que esta estirpe não é transmitida por oito diferentes espécies do vetor (Ramagem, 1993).

O presente trabalho visa complementar os dados biológicos sobre BYMVn, elucidando a base molecular da não transmissão desta estirpe por afídeos.

A caracterização molecular dos fatores envolvidos na não transmissão será feita através de análise as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos da capa proteica, a qual foi previamente identificada para outros potyvirus como uma proteína associada à transmissão por vetores.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados virais: O isolado necrótico foi cedido por Ricardo D. Ramagem, que o caracterizou a partir de amostras enviadas pelo Dr. Anésio Bianchini, IAPAR/Londrina, tendo sido encontrado em plantas de *Lupinus albus* (tremoço branco) e *Lupinus luteus* (tremoço amarelo) com sintoma de mosaico, no Paraná, sendo chamado de BYMVn. Este não foi transmitido por oito diferentes espécies de afídeos (Ramagem, 1993; Ramagem et al., 1992a e b). O isolado de Bean Common Mosaic Virus foi obtido a partir de sementes de plantas infectadas, cedidas pelo Dr. Cláudio Lúcio Costa, UnB. Os isolados foram mantidos em casa-de-vegetação, através de inoculações mecânicas com tampão fosfato 0.1 M e celite em plantas de feijão "Rio Tibagi" (BYMVn) e através de sementes de feijão "Manteiga" (BCMV).

Transmissão por afídeo: Todas as espécies de afídeos testadas foram coletadas em Brasília, DF. *Aphis coreopsidis* e *Uroleucon ambrosiae* foram coletados em picão (*Bidens pilosa*). *Aphis gossypii* foi coletado em algodão (*Gossypium barbatum*). *Aphis nerii* foi coletado em espirradeira (*Nerium oleander*). *Aphis solanella* foi coletado em dama-da-noite (*Cestrum nocturnum*). *Aphis spiraecola* e *Toxoptera citricidus* foram coletados em laranja e limão (*Citrus* spp.). *Brevicoryne brassicae* e *Myzus persicae* foram coletados em couve (*Brassica oleracea* var. *acefala*). *Hyperomyzus carduellinus* e *Macrosiphum euphorbiae* foram coletados em serralha (*Sonchus oleraceus*). *Myzus nicotianae* foi coletado em fumo (*Nicotiana tabacum*). *Plecturaphis vignaphilus* foi coletado em feijão (*Phaseolus vulgaris*). *Ropalosiphum maidis* foi coletado em milho (*Zea mays*). *Ropalosiphum padi* foi coletado em cevada (*Hordeum vulgare*).

Os afídeos foram retirados da colônia, batendo-se as plantas, de forma que os mesmos caíssem sobre uma folha de papel. Desta, foram passados para placas de petri, onde foram mantidos em jejum por 30 à 90 minutos, no escuro. Folhas de planta infectada foram então colocadas na placa de petri onde achavam-se os afídeos, dando-se um acesso de aquisição de 3 a 5 minutos. Após este período, os afídeos foram retirados das folhas, batendo-se as mesmas, e transferidos, com a ajuda de um pincel, para as plantas-teste. Utilizou-se 1 fêmea áptera adulta por planta-teste, a qual teve acesso de inoculação de 30 minutos, após o qual foi eliminada com pulverização de inseticida. Foram utilizados 5 grupos de 6 plantas-teste por tratamento (afídeo/vírus). Como planta-teste, foram utilizados os feijões "Jalo" para BCMV e "Rio Tibagi" e "Carioca" para BYMVn. Após avaliação visual

das plantas infectadas, tentou-se a recuperação dos vírus das plantas sem sintomas.

Transmissão de BYMVn por afideo, utilizando-se diferentes fontes de inóculo: Foram utilizadas plantas de *Cajanus cajan* (feijão-guandu), *Canavalia brasiliensis* (canavália), *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco), *Canavalia gladiata* (canavália), *Cassia occidentalis* (fedegoso), *Glycine max* (soja) "Doko", *Lupinus albus* (tremoço branco) "Floresta", *Phaseolus vulgaris* (feijão) "Rio Tibagi" e *Vicia faba* (feijão-fava) inoculadas com BYMVn, como fontes de inóculo. Como plantas-teste foram utilizadas plantas de feijão "Rio Tibagi" para todas as fontes de inóculo e também de tremoço branco, quando as fontes de inóculo foram tremoço branco e feijão "Rio Tibagi". Após jejum de 30 minutos os pulgões tiveram outros 30 minutos de acesso de aquisição em folhas infectadas de cada uma das fontes de onde foram transferidos para as plantas-teste. Após mais 30 minutos de acesso de inoculação, os pulgões foram eliminados com o uso de inseticida. Foram utilizadas 10 fêmeas ápteras adultas da espécie *Myzus nicotianae* ou *M. persicae* e 2 grupos de 6 plantas-teste por tratamento (fonte de inóculo/planta-teste/espécie de afideo).

Transmissão dependente: Após 3 a 5 minutos de acesso de aquisição em folhas infectadas com BCMV, o qual foi utilizado como vírus auxiliar, os pulgões foram transferidos para as folhas-fonte de BYMVn, de onde foram transferidos para as plantas-teste, após outros 3 a 5 minutos de acesso de aquisição. Os pulgões tiveram 30 minutos de acesso de inoculação. Foram utilizadas três fêmeas ápteras

adultas da espécie *Myzus nicotianae* por planta-teste. Como planta-teste foram utilizados 5 grupos de 6 plantas de feijão "Rio Tibagi", o qual é resistente a BCMV.

Processamento, montagem e identificação dos afídeos: Foram separados espécimens ápteros e alados de cada espécie testada para transmissão, os quais foram conservados em álcool 70% e posteriormente processados, segundo Blackman e Eastop (1985), como se segue. Os espécimens, imersos em álcool 70%, foram aquecidos à 90°C por 2 a 3 minutos. Após substituição do álcool por KOH 10%, os espécimens retornaram ao aquecimento por mais 3 a 5 minutos. Eliminou-se todo o KOH e os espécimens foram lavados três vezes em água destilada por no mínimo 10 minutos cada lavagem. Retirou-se a água e acrescentou-se ácido acético glacial, deixando-se por 2 a 3 minutos, após o qual esta última operação foi repetida. Após eliminação de todo o ácido acético, clareou-se o material com óleo de cravo por uma noite. Os espécimens foram transferidos para lâminas com uma gota de óleo de cravo e montados. Retirou-se o óleo com a ajuda de papel absorvente e acrescentou-se uma pequena gota de bálsamo-do-canadá. Sobre este colocou-se a lamínula e esperou-se alguns dias até que o bálsamo estivesse seco para dar prosseguimento ao exame.

A identificação das espécies foi feita com base na série de chaves publicadas por Costa, Eastop & Blackman (1993).

Lâminas das espécies estão depositadas na coleção do Dr. Cláudio Lúcio Costa, na Universidade de Brasília.

Purificação das partículas virais: Utilizou-se o método descrito por Marinho & Kitajima (1989), macerando-se as folhas de plantas infectadas com três semanas de inoculadas, com 1:1 (p/v) tampão de extração de vírus. Após coado em gaze, adicionou-se 8% de 1-butanol ao extrato, deixando-se agitar por 12 h à 4°C. Ao sobrenadante de uma centrifugação à 2.000 g por 10 minutos acrescentou-se 8% de PEG 6.000, agitando-se por 3 horas à 4°C. O extrato foi centrifugado à 4.300 g por 30 minutos e o precipitado foi ressuspensão em tampão borato 1 (1/10 volume inicial de extrato). Após agitação por 1 hora, procedeu-se uma centrifugação à 1.500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado à 100.000 g por 50 minutos, ressuspensão-se o precipitado em tampão borato 1, seguido por uma centrifugação à 2.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado em gradiente isopícnico de CsCl 35% à 100.000 g por 18 horas. A banda do vírus foi diluída 10 vezes em tampão borato 2 e centrifugada à 100.000 g por 50 minutos. O precipitado foi ressuspensão em tampão borato 0,01 M pH 8,3 sem EDTA e mantido à -20°C.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE): As proteínas da capa de BYMVn e de um isolado não identificado de potyvirus foram analisadas em gel de poliacrilamida descontínuo (gel concentrador 4% e gel separador 12%), segundo o método de Laemmli (1970). A corrida foi realizada no Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad) de acordo com as instruções do fabricante. O gel separador foi aplicado entre duas placas de vidro montadas no Mini-Protean II, após o qual uma fina camada de butanol foi adicionada ao topo do gel, que foi mantido em descanso por cerca de 30 minutos, até a total polimerização. Para remover o

butanol, utilizou-se papel de filtro, aplicando-se em seguida o gel concentrador e o pente. O gel foi mantido em descanso por cerca de 30 minutos até a polimerização, quando o pente foi retirado e os poços lavados com água, a fim de eliminar a acrilamida não polimerizada. As preparações purificadas dos vírus foram diluídas 1:1 em tampão de amostra de proteína 2x, aquecidas à 90°C em banho-maria por 3 minutos e aplicadas no gel. Este foi submetido à eletroforese, em presença de tampão de corrida, por cerca de 1 hora, à 150 V. O gel foi então corado por 1 hora com 0,1% Coomassie blue em 40% metanol e 10% ácido acético e descorado com várias trocas de metanol/ácido acético sem corante.

Western Blot: Utilizou-se o método descrito por Bollag & Edelstein (1991), com modificações. Após a eletroforese, as proteínas de BYMVn e do potyvirus não identificado foram transferidas para membrana de nitrocelulose, através do Trans Blot SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad), conforme as instruções do fabricante, por 30 minutos à 10 V e 297 mA, utilizando-se tampão de transferência. O bloqueio da membrana foi feito com PBS-Tween-leite/BSA, sob agitação suave, durante 60 minutos. Antes da adição do antissoro, a membrana foi lavada com três trocas breves de PBS-Tween. Utilizou-se o antissoro diluído na proporção de 1:1.000 em PBS-leite/BSA, agitando-se por uma noite. A membrana foi lavada com três trocas de 10 minutos cada com PBS-Tween, quando foi então adicionado anti-coelho conjugado com enzima fosfatase alcalina, na proporção de 1:30.000 em PBS-leite/BSA, agitando-se por 1 hora. A membrana foi lavada com três trocas de 30 minutos de PBS. Antes da revelação, a membrana foi lavada ainda com tampão da fosfatase alcalina, por 5 minutos. A revelação foi feita submetendo-se a membrana

à 20 ml de revelador, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com água destilada. O antissoro utilizado foi cedido por Ricardo D. Ramagem, que o produziu a partir de preparações purificadas de BYMVn (Ramagem, 1993), o qual foi previamente adsorvido com extrato de planta sadia. Uma parte do antissoro foi diluída em 1.000 partes do extrato diluído 1:10 (p/v) em TBS acrescido de 1% (p/v) de PVP e 1% (p/v) de Na₂SO₃ e centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante acrescentou-se 0,5% (p/v) de BSA e este foi mantido à -20°C para utilização posterior.

Cromatografia líquida de alta performance (HPLC): O perfil peptídico da CP de BYMVn foi feito por tratamento enzimático com tripsina, seguido por separação em cromatografia líquida de alta performance (HPLC), pelo Centro Brasileiro de Seqüenciamento de Proteínas (UnB). A preparação viral purificada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE), segundo o método de Laemmli (1970), e a banda correspondente à CP foi cortada do gel e submetida à redução, alquilação e digestão com tripsina, segundo o método de Williams & Stone (1995), utilizando-se uma proporção de enzima:substrato de 1:10. Os peptídeos oriundos da digestão foram submetidos à cromatografia de fase reversa, utilizando-se coluna C₁₈ (2,1 mm x 25 cm, Vydac), pré-equilibrada com tampão A em um sistema HPLC (Perkin Elmer). Os peptídeos foram eluídos através de um gradiente de 0 à 50% de tampão B em 50 minutos e 50 à 100% de tampão B em 10 minutos. A cromatografia foi monitorada à 216 nm e os principais picos foram recolhidos para seqüenciamento posterior. Amostras de um potyvirus não identificado e de gel de poliacrilamida sem proteína foram também submetidas à digestão e análise

cromatográfica. A amostra de gel sem proteína funcionou como controle, de forma a se eliminar o efeito de contaminantes. A amostra do potyvirus não identificado foi utilizada a fim de se precisar a acuidade da técnica em distinguir proteínas relacionadas porém diferentes.

Extração de RNA foliar total: Utilizou-se o método de Chomczynski e Sacchi (1987). Um grama de folha de plantas infectadas com três semanas de inoculadas foi triturado em nitrogênio líquido. Ao macerado adicionou-se 10 ml de tampão de extração de RNA total, em tubo de centrifuga, agitando-se fortemente por 1 minuto. Adicionou-se 1 ml de acetato de sódio 2 M pH 4,0 e agitou-se por mais 1 minuto. Após a adição de 10 ml de fenol tamponado, agitou-se por 2 minutos, acrescentando-se 2 ml de clorofil, e agitou-se por outros 2 minutos. Centrifugou-se à 15.000 g por 20 minutos, recolhendo-se a fração aquosa, à qual foi adicionado isopropanol gelado (1:1 v/v). Após ligeira agitação por inversão, manteve-se o material em repouso à 4°C por uma noite. Centrifugou-se o material por 15 minutos à 15.000 g e o precipitado foi ressuspensão em 1 ml de água DEPC, armazenando-se à -20°C.

Preparação de DNA complementar (cDNA): Oligonucleotídeos específicos para a região da proteína da capa de BYMVn foram sintetizados, a fim de amplificar um fragmento de 414 pares de base da metade N-terminal da proteína da capa (Figura 1). Esses oligonucleotídeos foram escolhidos a partir da seqüência de cDNA do gene da CP de BYMV, publicada por Hammond & Hammond (1989). O oligonucleotídeo 1 (5'TGCCATTTTCTATGCACCAC3') foi utilizado na preparação

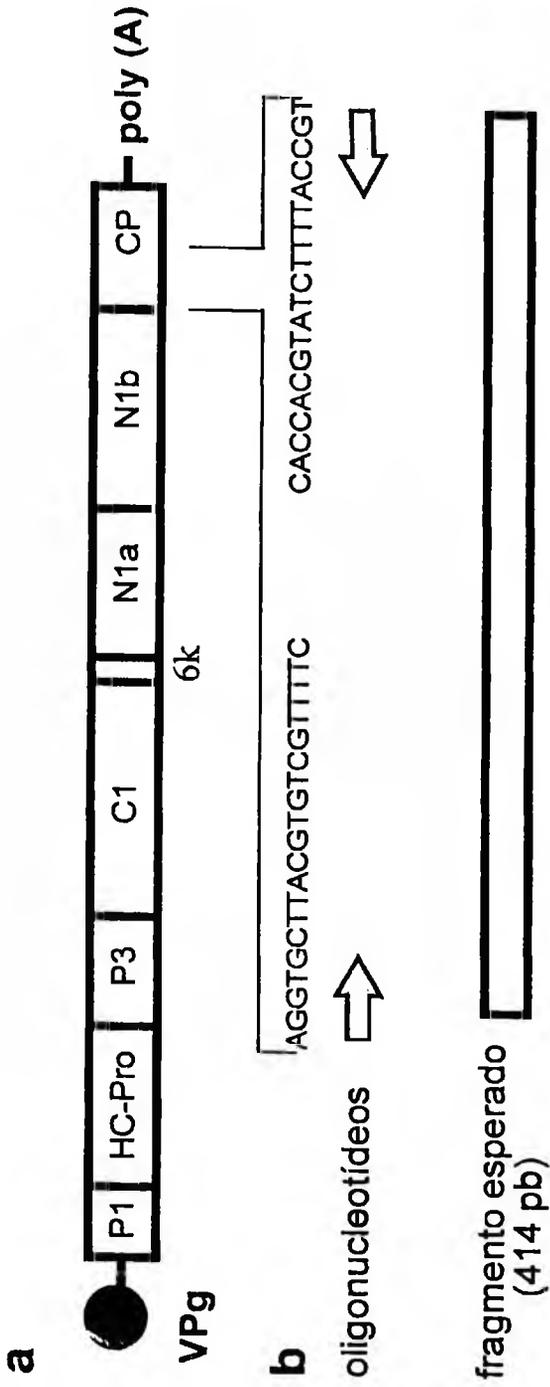


Figura 1 - (a) Organização genômica de potyvirus (adaptado de Maia et al., 1996), mostrando as ORFs traduzidas do RNA genômico (P1, HC-Pro, P3, C1, 6k, N1a, N1b e CP); **(b)** Oligonucleotídeos utilizados para amplificar BYMV, indicando a região de anelamento destes no gene da CP, e o fragmento esperado de 414 pb na reação de PCR.

do cDNA. Três μl RNA foliar total foram acrescidos à 2 μl oligonucleotídeo 1 (1 μg), completando-se com água até um volume final de 10 μl . Esta mistura foi aquecida à 80-90°C por 2 minutos. Após um rápido resfriamento em gelo, adicionou-se 15 μl da mistura da RT, mantendo-se à 37°C por 1 hora. O cDNA foi estocado à -20°C.

“Polymerase Chain Reaction” (PCR): Para amplificação dos fragmentos de cDNA por PCR, adicionou-se à 10 μl do cDNA previamente preparado 40 μl da mistura para PCR. O oligonucleotídeo 2 (5'AGGTGCTTACGTGTCGTTTTTC3') foi utilizado no sistema de PCR. O programa utilizado é compreendido por uma fase de desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 90 segundos, anelamento à 55°C por 3 minutos e alongação à 72°C por 2 minutos e uma alongação final à 72°C por 7 minutos.

Eletroforese em gel de agarose: O produto da amplificação por PCR foi visualizado em gel de agarose 1% em TBE 0,5x, corado posteriormente em uma solução de 0,05 mg de brometo de etídeo por 100 ml de água. Oito μl do produto do PCR mais 2 μl de tampão de amostra de DNA “loading buffer” 5x foram aplicados em cada poço, submetendo-se à eletroforese, em presença do tampão TBE 0,5x, por cerca de 4 horas à 60 V. Utilizou-se o marcador 100 bp DNA Ladder (Gibco). A visualização dos fragmentos foi feita em transiluminador de luz ultravioleta.

Eluição de DNA: Fez-se a extração do fragmento de DNA de interesse do gel de agarose, utilizando-se o Sephaglas™ BandPrep Kit (Pharmacia Biotech). A

presença do fragmento desejado foi detectada em gel de agarose, utilizando-se 2 μ l do DNA eluído de um total de 30 μ l.

Reamplificação do fragmento obtido por PCR: A partir do DNA eluído, fez-se uma nova reação de PCR, utilizando-se 1 μ l deste, diluído em 9 μ l de água, e 40 μ l da mistura para PCR. Utilizou-se o mesmo ciclo da primeira amplificação. O produto de três destas reações, num volume total de 125 μ l, foi precipitado com 313 μ l de etanol absoluto e 13 μ l de acetato de sódio 3 M pH 5,0. Após 3 horas à -80°C, centrifugou-se à 14.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e, após outra centrifugação por 10 minutos, foi ressuspensão em 20 μ l de TE.

Clonagem do DNA: Dois μ l do DNA precipitado foram ligados a 1 μ l do pGemT Vector (Promega) (Figura 2b), na presença de 1 μ l da enzima T4 DNA Ligase e de 2 μ l do tampão desta, num volume total de 20 μ l, à 12°C por uma noite. O plasmídeo ligado foi inserido em células de *Escherichia coli* DH 5 α tornadas competentes por tratamento com RbCl. Para tanto, 10 μ l do DNA ligado foram misturados a 200 μ l de células competentes de *E. coli* e incubados por 40 minutos em gelo, após o qual as células receberam um choque de temperatura à 37°C por 150 segundos, seguido por retorno ao gelo por 5 minutos. Adicionou-se 800 μ l de meio LB líquido e incubou-se as células à 37°C por 1 hora. Centrifugou-se as células à 2.000 rpm por 10 minutos, descartou-se 900 μ l do sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado nos 100 μ l restantes. Esta suspensão foi plaqueada em duas placas de petri com LB ágar, cobertas com 20 μ l de ampicilina (100 mg/ml),

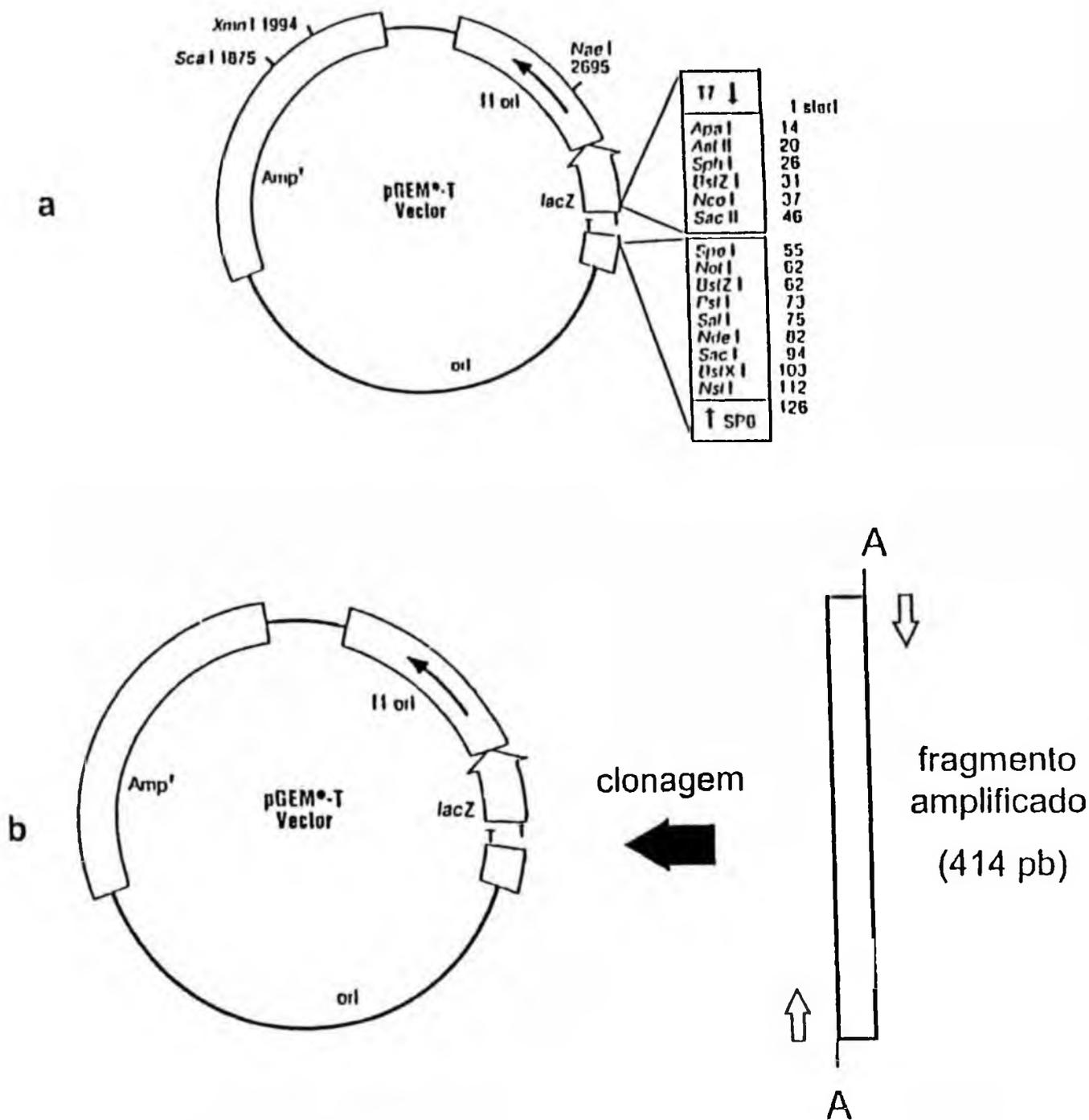


Figura 2 - pGemT Vector, plasmidio utilizado para clonagem de produtos de PCR, mostrando (a) os sítios das enzimas de restrição e (b) o sítio de inserção do fragmento amplificado de BYMVn, com as projeções de timina (T).

20 μ l de IPTG (0,2 g/ml) e 15 μ l X-Gal (0,02 g/ml dimetilformamida) por placa. As placas foram mantidas em estufa à 37°C por 16 horas. Cada colônia branca crescida foi transferida para tubos com 5 ml de LB líquido, ao qual foram adicionados 5 μ l de ampicilina. Os tubos foram mantidos à 37°C por 16 horas, sob agitação. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o FlexiPrep Kit (Pharmacia Biotech), conforme as instruções do fabricante. Cinco μ l deste, de um total de 50 μ l, foram visualizados em gel de agarose 0,7%, submetido à eletroforese à 60V por 4 horas.

Digestão do DNA plasmidial: Para certificar-se de que os clones escolhidos continham o fragmento desejado, foram utilizados duas enzimas para que este fosse liberado: Nde I (Pharmacia Biotech) e Sph I (Amersham) (Figura 2a). Quinze μ l do DNA plasmidial receberam 1 μ l de água Milli-Q, 2 μ l de tampão H (Amersham) e 1 μ l de cada enzima. A digestão foi realizada por 24 horas à 37°C. Quatro μ l do produto da digestão foram visualizados em gel de agarose 1%, submetido à eletroforese à 60V por 4 horas.

Extração de DNA plasmidial em larga escala: Os clones com o fragmento do tamanho esperado foram postos para crescer em 50 ml de LB líquido, acrescido de 50 μ l de ampicilina, à 37°C por 16 horas, sob agitação. O DNA plasmidial foi extraído através do FlexiPrep Kit (Pharmacia Biotech), conforme as instruções do fabricante, e utilizado para o seqüenciamento.

Seqüenciamento de nucleotídeos: O seqüenciamento do fragmento clonado foi feito utilizando-se o ³²P Sequencing™ Kit (Pharmacia Biotech), conforme as instruções do fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Transmissão por afídeo: Ramagem (1993) e Ramagem *et. al.* (1992b), em estudos anteriores sobre a biologia de BYMVn, tentaram a transmissão deste isolado por oito diferentes espécies de afídeos, não obtendo sucesso com nenhuma delas. No presente estudo, BYMVn não foi transmitido por nenhuma das espécies de afídeo testadas, confirmando os dados apresentados por aqueles autores e acrescentando novas espécies. Estes resultados podem ser observados na Tabela 1.

Isolados de BYMV não transmitidos por afídeos já foram relatados (Evans & Zettler, 1970; Swenson, 1957; Swenson *et al.*, 1964). Perda da transmissão de potyvirus por afídeos tem sido associada a mutações na capa proteica ocorridas durante contínuas passagens em plantas por inoculação mecânica (Sako, 1980). Não se sabe se este é o caso deste isolado, uma vez que não foi relatado o tempo

Tabela 1: Transmissão de BCMV e de BYMVn por diferentes espécies de afídeos.

Utilizou-se um afídeo por planta-teste. * Número de plantas infectadas por número total de plantas inoculadas.

Espécies de afídeos testadas	BCMV	BYMVn
<i>Aphis coreopsidis</i>	0/30*	0/30
<i>Aphis gossypii</i>	0/30	0/30
<i>Aphis nerii</i>	0/30	0/30
<i>Aphis solaneila</i>	0/30	0/30
<i>Aphis spiraeicola</i>	5/30	0/30
<i>Brevicoryne brassicae</i>	0/30	0/30
<i>Hyperomyzus carduellinus</i>	0/30	0/30
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	9/30	0/30
<i>Myzus nicotianae</i>	8/30	0/30
<i>Myzus persicae</i>	8/30	0/30
<i>Picturaphis vignaphilus</i>	0/30	0/30
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	0/30	0/30
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0/30	0/30
<i>Toxoptera citricidus</i>	0/30	0/30
<i>Uroleucon ambrosiae</i>	2/30	0/30

durante o qual o mesmo foi mantido *in vivo*, através de inoculações mecânicas, antes de ser submetido a testes de transmissão por afídeos.

BCMV foi transmitido por *Aphis spiraecola*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus nicotianae*, *M. persicae* e *Uroleucon ambrosiae*. Estes testes foram feitos para se conhecer quais afídeos e em que taxa transmitiam este isolado, para que ele fosse usado posteriormente como vírus auxiliar nos testes de transmissão dependente de BYMVn. *Aphis gossypi*, *A. nerii*, *Brevicoryne brassicae*, *Hyperomyzus carduellinus*, *Picturaphis vignaphilus*, *Rhopalosiphum maidis*, *R. padi* e *Toxoptera citricidus* não transmitiram nenhum dos dois isolados testados.

Apesar da base molecular da transmissão de potyvirus por afídeos estar sendo intensamente estudada, os mecanismos de transmissão e o papel que cada fator (HC-Pro, CP e planta hospedeira) tem na transmissão continua desconhecido. Alguns autores sugerem que fatores da planta hospedeira podem exercer papel importante na transmissão (Kassanis & Govier, 1971b; Paguio & Kuhn, 1976; Simons, 1976). Assim tentou-se a transmissão de BYMVn a partir de 10 diferentes fontes de inóculo, utilizando-se duas espécies de afídeos conhecidamente eficientes na transmissão de potyvirus, *Myzus persicae* e *M. nicotianae*. Os resultados podem ser observados na Tabela 2.

Em face das mal sucedidas tentativas de se transmitir BYMVn, testou-se a hipótese de que este tivesse uma HC-Pro deficiente, utilizando-se BCMV como vírus auxiliar em teste de transmissão dependente. As combinações testadas e os resultados encontrados podem ser observados na Tabela 3.

A incapacidade de BCMV em auxiliar a transmissão de BYMVn, levou à suspeita de que a deficiência de BYMVn em ser transmitido por afídeo poderia estar

Tabela 2: Teste de transmissão de BYMVn por *M. persicae* e *M. nicotianae*, variando-se as fontes de inóculo e as plantas-teste. Foram utilizados dez afídeos por planta-teste. * Número de plantas infectadas por número total de plantas inoculadas.

FONTES DE INÓCULO	PLANTAS-TESTE	TAXA DE TRANSMISSÃO	
		POR <i>M. persicae</i>	POR <i>M. nicotianae</i>
<i>Cajanus cajan</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> "Rio Tibagi"	0/12*	0/12
<i>Canavalia brasiliensis</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> "Rio Tibagi"	0/12	0/12
<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> "Rio Tibagi"	0/12	0/12
<i>Canavalia gladiata</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> "Rio Tibagi"	0/12	0/12
<i>Cassia occidentalis</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> "Rio Tibagi"	0/12	0/12
<i>Glycine max</i> "Doko"	<i>Phaseolus vulgaris</i> "Rio Tibagi"	0/12	0/12
<i>Lupinus albus</i> "Floresta"	<i>Phaseolus vulgaris</i> "Rio Tibagi"	0/12	0/12
<i>Lupinus albus</i> "Floresta"	<i>Lupinus albus</i> "Floresta"	0/12	0/12
<i>Phaseolus vulgaris</i> "Rio Tibagi"	<i>Lupinus albus</i> "Floresta"	0/12	0/12
<i>Vicia faba</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> "Rio Tibagi"	0/12	0/12

Tabela 3: Teste de transmissão dependente de BYMVn por *M. nicotianae*, utilizando-se BCMV como vírus auxiliar. Foram utilizados três afídeos por planta-teste. * Número de plantas infectadas por número total de plantas inoculadas.

1º TEMPO DE ACESSO DE AQUISIÇÃO	2º TEMPO DE ACESSO DE AQUISIÇÃO	BCMV ("Jalo")	BYMVn ("Rio Tibagi")	RECUPERAÇÃO DE BYMVn
BYMVn			0/30*	negativa
BCMV	BYMVn		0/30	negativa
BYMVn	BCMV		0/30	negativa
BCMV		6/30	0/30	negativa

relacionada com a CP e não com a HC-Pro. No entanto alguns autores sugerem algum grau de especificidade na interação de HC-Pro com o vírus (Lecoq & Pitrat, 1985; Pirone, 1981; Sako & Ogata, 1981). Apesar de HC-Pro de uma espécie de potyvirus poder auxiliar a transmissão de vírions de outra espécie, ela não necessariamente pode auxiliar a transmissão de todas as espécies do gênero. HC-Pro purificadas de PVY e de TVMV não auxiliaram a transmissão de BYMV (Pirone, 1981).

Purificação das partículas virais e Western Blot: O método de purificação de potyvirus de Marinho & Kitajima (1989) apresentou rendimento médio de 6 mg/kg de folha fresca. Em SDS/PAGE foram vistas bandas de vários tamanhos, provavelmente representando degradação da CP durante a purificação ou proteínas contaminantes (dados não mostrados). Valores de M_r variáveis, devido à degradação da proteína, já foram reportados para potyvirus (Shukla & Ward, 1989b).

Os resultados de Western Blot indicaram valores de massa molecular da CP de BYMVn próximos aqueles encontrados por Hammond & Hammond (1989). Esses autores obtiveram uma M_r da CP de BYMV, de acordo com a seqüência de aminoácidos deduzida, de 30.910, com 273 resíduos. Baseados na composição determinada quimicamente, eles encontraram valores próximos a estes: M_r 30.635 e 274 aminoácidos. A proteína reconhecida pelo antissoro específico para BYMVn apresentou uma massa molecular de cerca de 30 kDa (Figura 3, linha 2).

Embora tenha havido reconhecimento da proteína de BYMVn por seu antissoro, houve uma fraca marcação heteróloga. A proteína de um potyvirus não

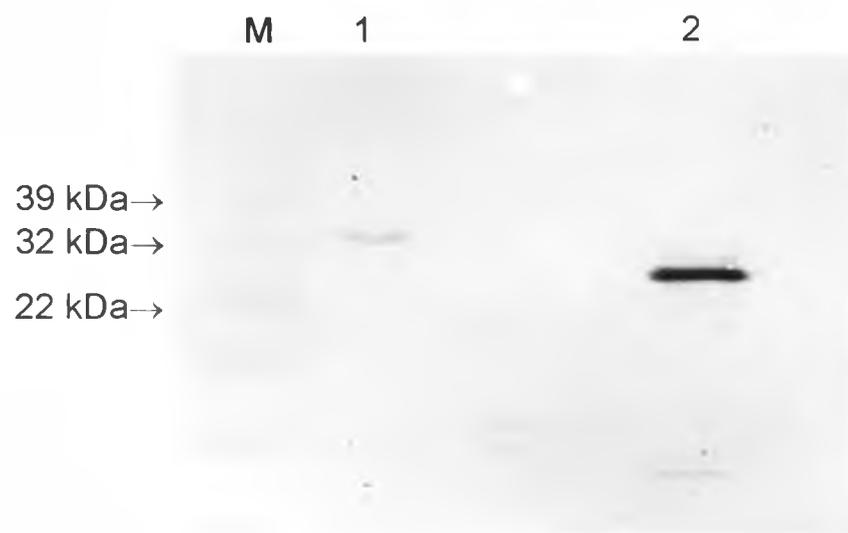


Figura 3 - Western blot da proteína da capa de BYMVn. Preparação viral purificada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo (12 e 4%), transferida para membrana de nitrocelulose e tratada com antissoro para BYMVn. Linha 1, potyvirus não identificado e linha 2, BYMVn. M, marcadores de proteína cujas massas moleculares (kDa) estão indicadas por setas.

identificado (Figura 3, linha 1) foi reconhecida pelo antissoro específico para BYMVn. Reação cruzada entre os membros do gênero *Potyvirus* é comumente relatada e constitui-se num entrave ao uso da sorologia como técnica de identificação e caracterização de potyvirus. Uso de anticorpo específico para a região N-terminal da CP tem sido apontado como uma técnica para resolver tais problemas taxonômicos. O N-terminal é a única grande região de toda a CP que é específica para cada espécie de potyvirus e contém os principais epitopos específicos para a mesma (Shukla *et al.*, 1989).

Perfil peptídico de HPLC: Visando-se determinar a seqüência do N-terminal da CP de BYMVn, esta foi purificada e enviada para o Centro Brasileiro de Seqüenciamento de Proteínas da Universidade de Brasília. As tentativas de seqüenciamento automático direto da proteína foram infrutíferas. Uma explicação para este insucesso pode ser uma quantidade insuficiente da proteína, abaixo da capacidade de detecção do método. Outra possibilidade é o bloqueio do N-terminal da proteína, pela presença de grupamentos que impedem as reações de seqüenciamento.

Com o intuito de contornar essa dificuldade, fez-se o tratamento enzimático da proteína com tripsina e o produto da digestão foi submetido à HPLC. O perfil peptídico da CP por HPLC é uma técnica relativamente simples, que tem sido usada, ao lado da hibridização de ácido nucleico e da sorologia para o N-terminal, para a caracterização de muitos potyvirus (McKern *et al.*, 1992a e b; Shukla *et al.*, 1986). Esta técnica reflete as similaridades entre seqüências de aminoácidos e geralmente consegue discriminar as espécies de vírus das estirpes (Shukla *et al.*,

1988a). Por outro lado, ela é incapaz de localizar diferenças menores na seqüência de aminoácidos, como as que são responsáveis pela transmissão de potyvirus por afídeos. Para se estabelecer mais precisamente o grau de identidade de seqüência das proteínas é necessário o seqüenciamento dos picos de peptídeos oriundos de HPLC. Os picos recolhidos da amostra de BYMVn foram submetidos a seqüenciamento, porém não foi possível obter a seqüência de aminoácidos. Entretanto os resultados demonstram que o perfil peptídico pode ser usado como método diferenciador de potyvirus. A comparação do perfil de BYMVn com a de um isolado de potyvirus não identificado, mostra claramente a diferença no número de picos encontrados, reforçando o uso da técnica de HPLC na diferenciação de espécies deste gênero. O perfil peptídico de HPLC é apresentado na Figura 4.

Amplificação, clonagem e seqüenciamento de nucleotídeos: O método de Chomczynski e Sacchi (1987) deu bons resultados na extração de RNA total, não apresentando degradação com rendimento satisfatório de RNA total (Figura 5). As amostras apresentaram contaminação de DNA genômico, o qual pode ser eliminado com uma precipitação posterior à extração com LiCl.

Os oligonucleotídeos utilizados como "primers" (ver Materiais e Métodos) amplificaram o fragmento esperado de cerca de 414 pb, correspondendo à porção N-terminal de BYMVn, em várias reações independentes de PCR (Figura 6, linha 1). O uso de temperatura de anelamento de 55°C indica que estes possuem alta homologia com a seqüência viral de BYMVn. Apesar da alta temperatura de anelamento utilizada, alguns fragmentos de tamanhos diferentes do esperado foram amplificados, aparecendo no entanto em baixa concentração.

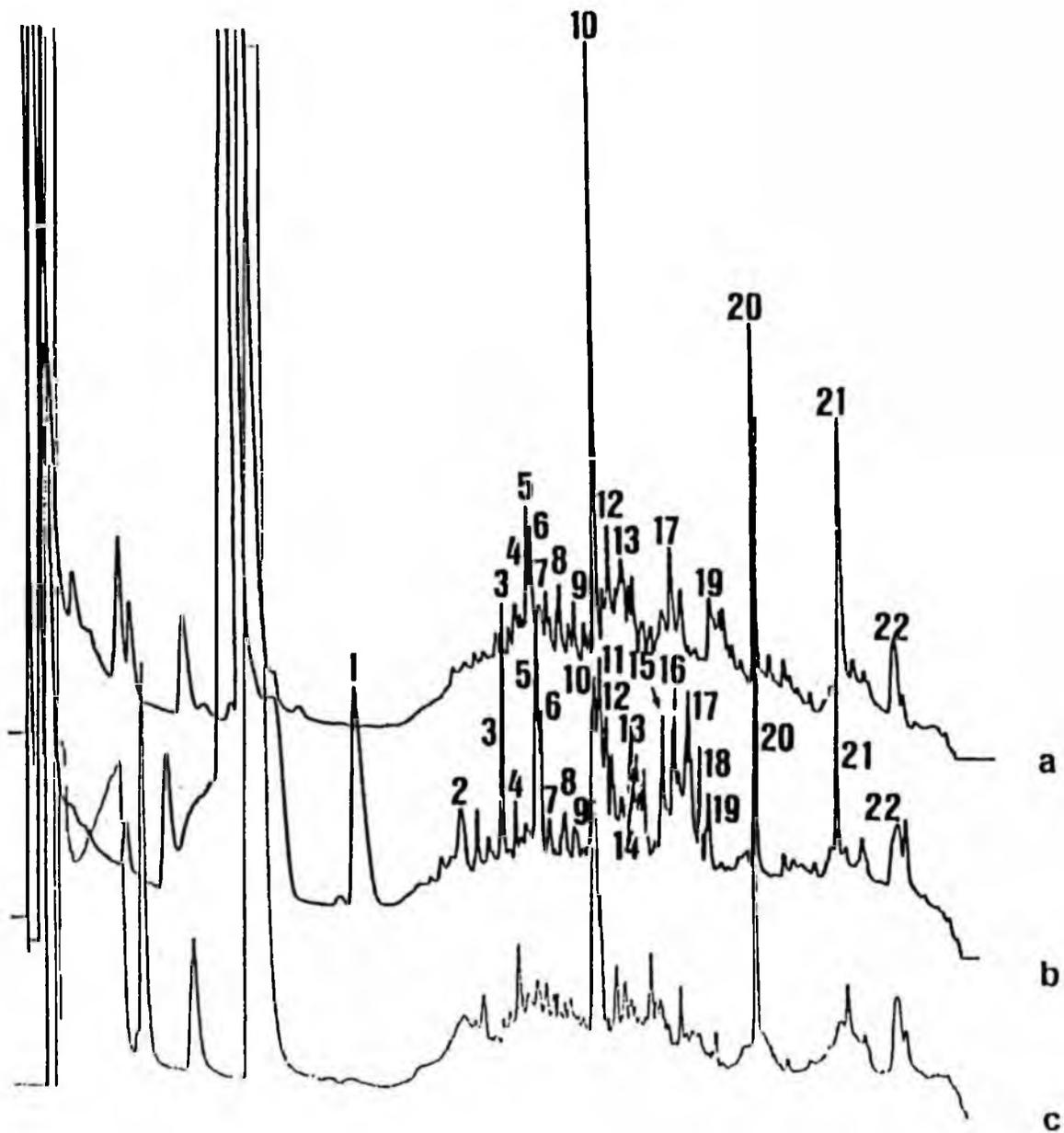


Figura 4 - Perfil de separação dos peptídeos por cromatografia líquida de alta performance da digestão triptica das proteínas da capa de dois potyvirus, (a) potyvirus não identificado, (b) BYMVn e (c) controle sem proteína. Números iguais equivalem a picos coincidentes.

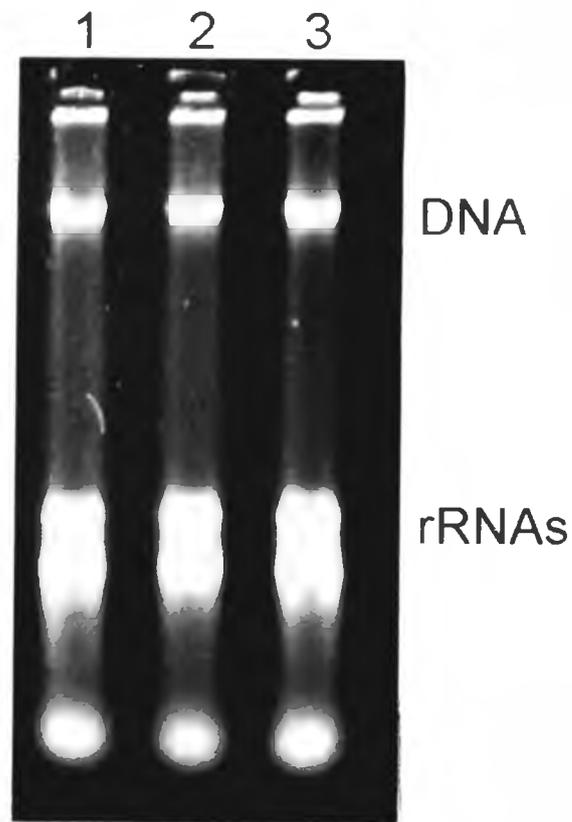


Figura 5 - RNA foliar total extraído de plantas de feijão infectadas com BYMVn pelo método do isotiocianato/fenol/clorofórmio (Chomczynski & Sacchi, 1987) e visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo. Foram aplicados 3 μ l (linha 1), 4 μ l (linha 2), e 5 μ l (linha 3) de um volume total de extração de 1000 μ l. RNAs ribossômicos são indicados na figura.

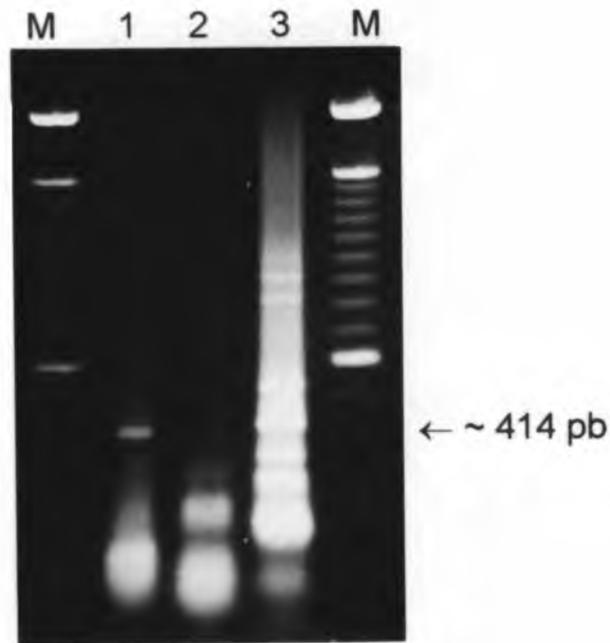


Figura 6 - Produtos de RT-PCR obtidos a partir de RNA total extraído de plantas de feijão infectadas com BYMVn (linha 1), plantas sadias (linha 2) e plantas infectadas com um potyvirus não identificado (linha 3). Os produtos de RT-PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídeo. M indica o marcador 100 pb DNA Ladder (Gibco) e a seta indica o fragmento amplificado (em pb).

O fragmento desejado (414 pb) foi euído para utilização como molde de um segundo PCR, visando aumentar a quantidade de DNA para clonagem. A banda utilizada para eluição é mostrada na Figura 7. A reamplificação por PCR foi bem sucedida, nas três diluições de DNA utilizadas (Figura 8). Conseguiu-se uma quantidade de DNA do fragmento desejado (cerca de 1µg no total das três reações de reamplificação) suficiente para dar prosseguimento ao trabalho de clonagem. A reamplificação mostrou-se uma técnica eficiente para se conseguir uma grande quantidade de DNA.

Para clonagem do fragmento amplificado, utilizou-se o vetor pGem-T Vector (Promega). O pGem-T é um plasmídeo que possui o sítio de inserção flanqueado por timinas em ambos os terminais 3'. Essas protuberâncias 3'-T aumentam grandemente a eficiência de ligação de produtos de PCR, uma vez que a estes são acrescentados uma deoxyadenosina ao final 3' pela Taq Polimerase.

Após ligação do fragmento ao vetor e transformação das células bacterianas, as colônias brancas escolhidas foram submetidas à minipreparação para extração do DNA plasmidial. Destas, poucas apresentavam DNA plasmidial com massa maior que a do vetor sem inserto (~2.000 pb). Os clones com plasmídeos maiores (na Figura 9, linhas 7, 19 e 20) foram escolhidos para digestão com enzimas de restrição.

Obteve-se apenas um clone (Figura 10, linha 3) com um inserto do tamanho desejado. Este, após seqüenciamento, permitiu a leitura de 170 nucleotídeos na região 5' e 208 da região 3'. Aproximadamente 23 nucleotídeos da região central do fragmento não puderam ser lidos (Figura 11).

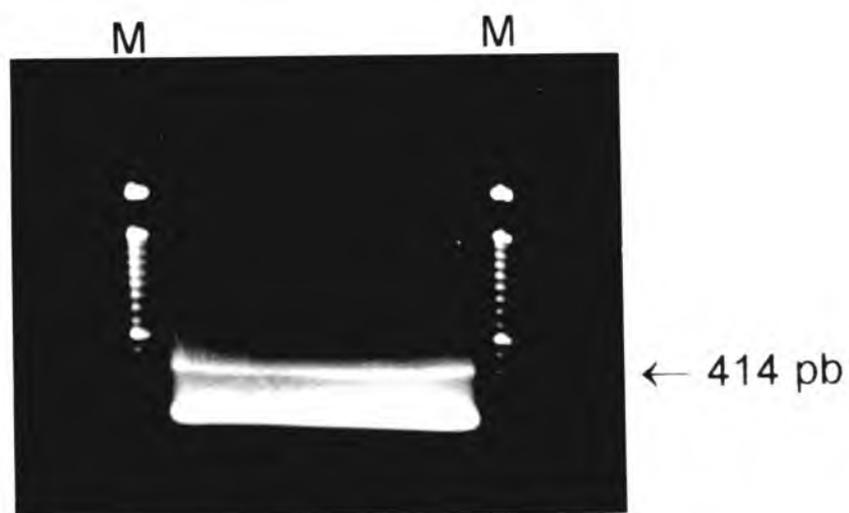


Figura 7 - Fragmento amplificado por RT-PCR, submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, o qual foi eluído utilizando o Sephaglas BandPrep Kit (Pharmacia Biotech) e utilizado como molde para um segundo PCR. A seta indica o tamanho do fragmento (em pares de bases). M: marcador 100 pb DNA ladder (Gibco).

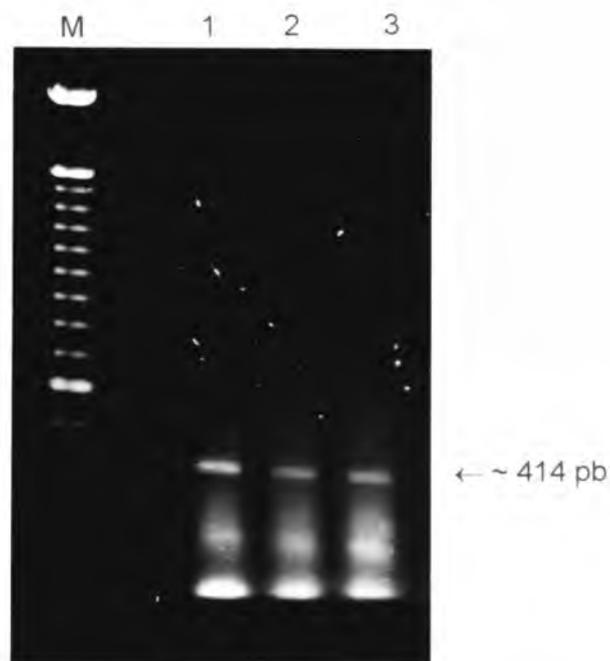


Figura 8 - Produtos de PCR, obtidos a partir da amplificação de uma única banda de PCR eluída de gel de agarose. Utilizou-se na reação de PCR 1 μ l de um volume total de 20 μ l de eluição. Não diluído (1), diluído 1:10 (2) e 1:100 (3). M indica o marcador 100 bp DNA Ladder (Gibco) e a seta indica o fragmento amplificado (em pb).

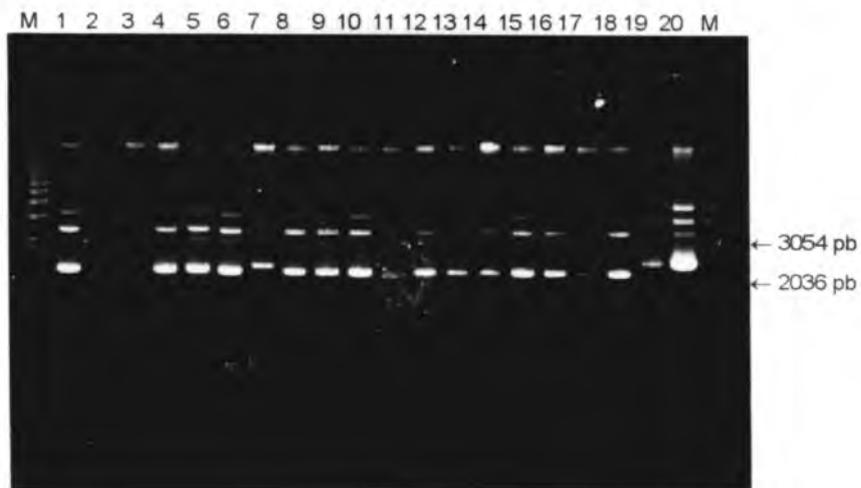


Figura 9 - Linhas 1 à 20, cDNA plasmidial extraído, através do FlexiPrep Kit (Pharmacia Biotech), após ligação em pGemT Vector (Promega) e transformação em *E. coli*. Os clones 7, 19 e 20 foram escolhidos para digestão posterior. M, marcador 1kb DNA Ladder (Gibco). As setas indicam os tamanhos dos clones (em kb).

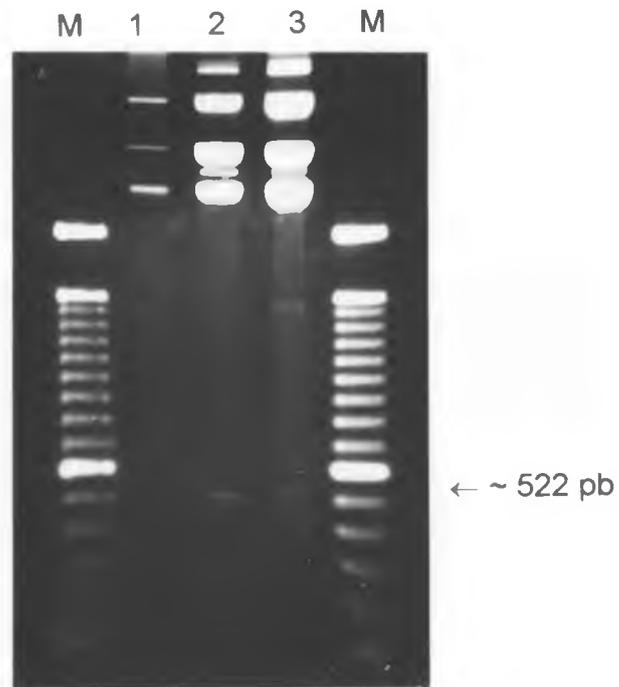


Figura 10 - Digestão dos clones com SphI e NdeI, mostrando o fragmento liberado.

Linhas 1 e 2, potyvirus não identificado e linha 3, BYMVn. M: marcador 100 pb DNA

Ladder. A seta indica o tamanho do fragmento (414 pb) clonado.

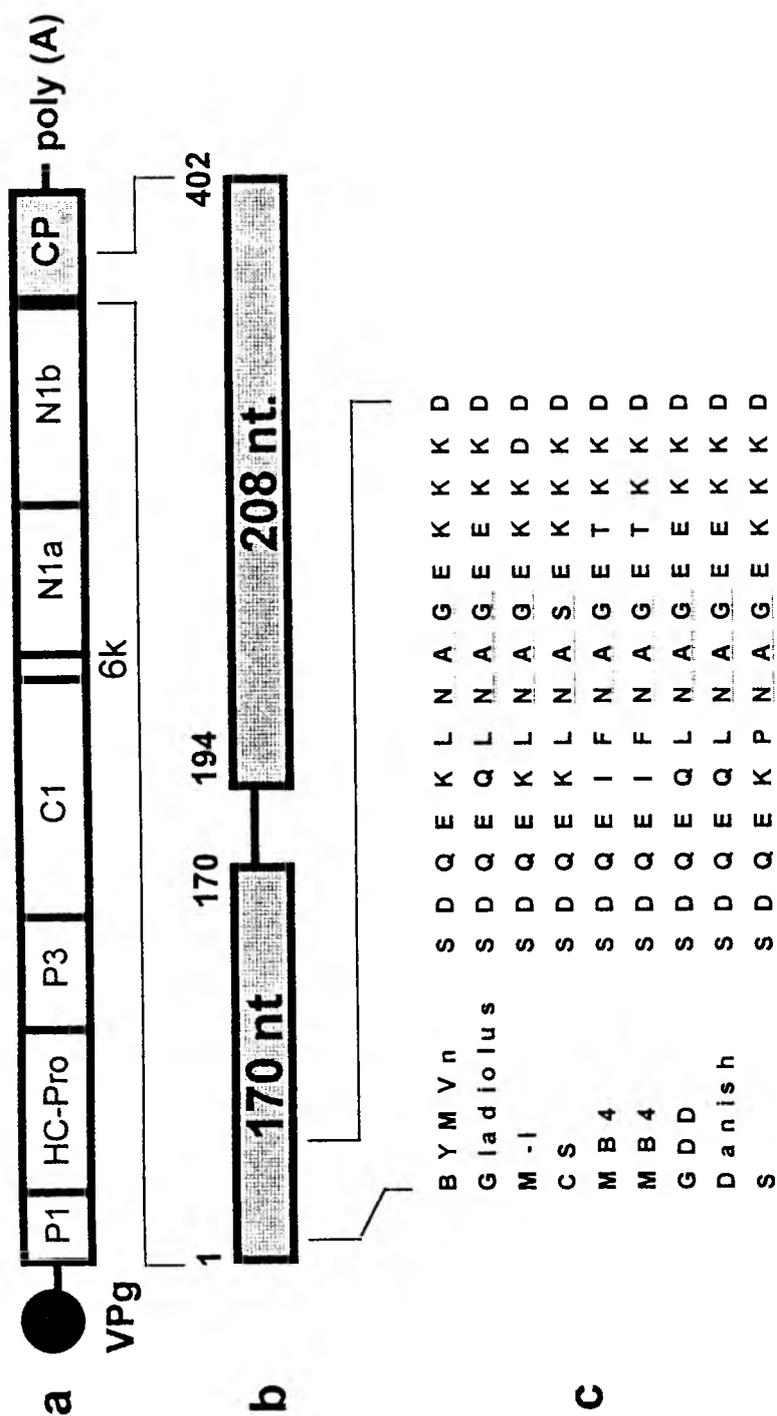


Figura 11 - Localização no genoma da região (a) e do número de nucleotídeos sequenciados (b) e a comparação das sequências deduzidas de aminoácidos (c) da região N-terminal da CP de BYMVn e de outras estirpes de BYMV. "Triplet" conservado NAG sublinhado. Alinhamento feito a partir do primeiro aminoácido da CP. Origem das seqüências na Tabela 4.

A seqüência deduzida de aminoácidos na região 5' mostrou três mudanças em relação às seqüências de outros isolados de BYMV, comparadas através do programa Genetics Computer Group (Program Manual for the Wisconsin Package). O "triplet" NAG apresentou-se conservado (Figuras 11 e 12), como em outros sete isolados de BYMV. A presença de Asn ao invés de Asp na primeira posição do "triplet" altamente conservado DAG é a única alteração no "triplet" que já foi encontrada ocorrendo naturalmente em potyvirus. Ela é encontrada em vários isolados de BYMV e de CIYVV. Comparação de seqüências de estirpes destes vírus, levaram Uyeda (1992) a afirmar que se tratam de duas espécies distintas embora fortemente relacionadas, o que justificaria o estabelecimento do subgrupo BYMV dentro do gênero *Potyvirus*. A alteração de Asp para Asn é tão conservada nestas espécies, que foi utilizada por aquele autor como um critério adicional na separação do subgrupo BYMV dos demais potyvirus. Essa alteração não parece afetar a transmissão por afídeo. Atreya *et al.* (1991) substituíram o resíduo Asp por Asn na primeira posição do "triplet" DAG em TVMV e não encontraram efeito adverso desta na transmissão. Atreya *et al.* (1995) fizeram a substituição de Asp por Glu, Gln, Gly e His e todas resultaram em perda da transmissão de TVMV. Assim, esses autores concluíram que Asn é o único aminoácido, além de Asp, aceitável nesta posição.

Uma das estirpes comparadas, BYMV-CS (Takahashi *et al.*, 1990), apresenta uma modificação (Gly → Ser) no terceiro aminoácido do "triplet" NAG. Essa modificação já foi relacionada com a perda da transmissão de TEV (Allison *et al.*, 1985). No entanto, a informação sobre a transmissão da estirpe CS não foi mencionada pelos autores.

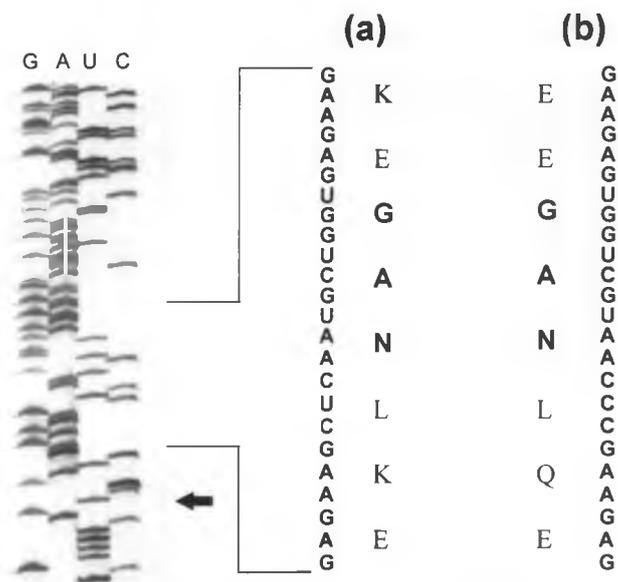


Figura 12 - Autoradiografia de gel de sequenciamento, mostrando a seqüência de nucleotídeos da região 5' do gene da CP de BYMVn (a) comparada à seqüência publicada de BYMV-GDD (Hammond & Hammond, 1989) (b). A seta indica o primeiro nucleotídeo do gene da CP. O "triplet" deduzido Asn-Ala-Gly (NAG) é indicado ao lado de seus respectivos nucleotídeos.

Atreya *et al.* (1991) demonstraram que uma mutação de Lys para Glu no aminoácido imediatamente seguinte ao “triplet” DAG reduziu drasticamente a transmissão de TVMV. No entanto, o isolado PVY-D (Shukla *et al.*, 1986) apresenta o resíduo Glu nesta posição e é descrito como transmitido por afídeo, embora a taxa de transmissão não seja dada. Um isolado não transmitido, PVY-18 (Shukla *et al.*, 1988c), também apresenta Asp nesta posição, no entanto não ficou estabelecido se a perda de transmissão era devido a esta mudança ou a deficiência de HC-Pro. Tanto o isolado BYMVn como os demais utilizados para comparação de seqüência apresentaram Glu nesta posição. Como não se dispõe de informações sobre a transmissão destes isolados, não é possível associar esta mudança com a perda de transmissão de BYMVn.

A região 5' seqüenciada apresentou 70,4 à 81,7% de homologia com as outras seqüências de BYMV. A região 3' apresentou 74,5 à 88,0% de homologia. Quando todo o fragmento seqüenciado foi comparado com os isolados publicados de BYMV, a homologia variou de 72,47 à 83,64% (Tabela 4 e Figura 13). A análise dos valores de identidade e similaridade das seqüências de aminoácidos entre BYMVn e os demais isolados demonstrou que o isolado necrótico BYMVn é mais relacionado com a estirpe S (Tabelas 4, 5 e 6).

Como aproximadamente 40% da capa proteica, representando a metade N-terminal, de BYMVn foi seqüenciada, os valores de homologia encontrados devem representar as diferenças reais existentes entre a CP deste isolado e os demais já caracterizados. Diferenças variando de 18,3 (BYMV-S, Tracy *et al.*, 1992) à 29,6% (BYMV-CS, Takahashi *et al.*, 1990) de nucleotídeos e de 12,0 (BYMV-S, Tracy *et al.*, 1992) à 25,5% (BYMV-CS, Takahashi *et al.*, 1990) de aminoácidos demonstram que

Tabela 4: Porcentagem de similaridade entre as sequências de nucleotídeos do N-terminal da CP de BYMVn e de outros isolados de BYMV.. As sequências foram obtidas através do programa Genetics Computer Group (Program Manual for the Wisconsin Package). BYMV-Gladiolus (Boye et al., 1992); BYMV-M-I (Mathews et al., 1995); BYMV-CS (Takahashi et al., 1990); BYMV-MB4 (Nakamura et al., 1994); BYMV-GDD Gladiolus (Hammond & Hammond, 1989); BYMV-Danish gladiolus (Boye et al., 1990); BYMV-S (Tracy et al., 1992).

	BYMVn	Gladiolus	M-I	CS	MB4	GDD	Dan. glad	S
BYMVn	100	77.98	77.50	72.47	80.44	79.78	77.84	83.64
Gladiolus		100	91.5	75.25	91.75	94.00	100	79.75
M-I			100	71.89	88.06	88.28	91.33	77.61
CS				100	74.63	75.06	75.07	74.88
MB4					100	91.27	91.33	81.34
GDD						100	94.31	79.55
Dan. glad.							100	79.68
S								100

```

1
bymv4 .AGGTGCTTG TGTGTCGTTT TCAATCAGAT CAAGAGATAT TCAATGCAGG
bymv5 GAGGTGCTTG TGTGTCGTTT TCAATCAGAT CAAGAGATAT TCAATGCAGG
bymv1 ...GTGCTTG TGTGTCGTTT CCAATCTGAC CAAGAACAAC TCAATGCAGG
bymv7 .....TCTGAC CAAGAACAAC TCAATGCAGG
bymv6 ..GGTGCTTA CGTGTCTGTTT TCAATCAGAT CAAGAGCAAC TCAATGCAGG
bymv2 .AGGTGCTTG TGTGTCGTTT TCAATCTGAC CAAGAAAAAC TCAATGCAGG
bymv8 .AGGTGATAG AGTGTGTTT TCAATCTGAC CAAGAGAAGC CCAATGCTGG
bymvn .AGGTGCTTA CGTGTCTGTTT TCAGTCCGAT CAAGAGAAGC TCAATGCTGG
bymv3 .AAGTAATTC TGTGCTGTTT CCAATCAGAC CAAGAGAAAC TCAATGCTAG

51
bymv4 TGAGACGAAG AAGGATAAAG CGAGGAAGAA TGAAGAAAAT CCTGATAAGA
bymv5 TGAGACGAAG AAGGATAAAG CGAGGAAGAA TGAAGAAAAT CCTGATAAGA
bymv1 TGAGGAGAAG AAGGATAAAA AGAAAAAGAA TGAAGAAAAT CCTGATAAGA
bymv7 TGAGGAGAAG AAGGATAAAA AGAAAAAGAA TGAAGAAAAT CCTGATAAGA
bymv6 TGAGGAGAAG AAGGATAAAA GAAAAAGAA TGAAGAAAAT CCTAATAAGG
bymv2 TGAGAAGAAG GATGATAAAG ATAAAAAGAA TAAAGAGAAT CCTGATAAGA
bymv8 TGAGAAGAAG AAAGACAAAG ACAAGAAAGT TGAAGACAAC CCTTCAAAGG
bymvn TGAGAAGAAG AAGGACAAAG ATAAAGAAAGT TGACGAGAAT CCTCTAAAGG
bymv3 TGAAAAGAAG AAAGATAAAG ACAAGAAGGT TGAAGATCAA TCAACCAAAG

101
bymv4 ACTCTGAGGG GCAGAGTAGC AGGCAAATAG TGCCAGACAG AGATGTGAAT
bymv5 ACTCTGAGGG GCAGAGTAGC AGGCAAATAG TGCCAGACAG AGATGTGAAT
bymv1 ACTCTGAGGG GCAGAATAGC AGGCAAATAG TACCAGACAG AGATGTGAAT
bymv7 ACTCTGAGGG GCAGAATAGC AGGCAAATAG TACCAGACAG AGATGTGAAT
bymv6 ACTCTGAGGG GCAGAGTGTC AGGCAAATAG TACCAGACAG AGATGTGAAT
bymv2 ACTCTGGGGA GCAGAGTAAC AGGCAAATAG TACCGGACAG AGATGTGAAT
bymv8 ATTCAGATGG ACAAAAGTAG AGGCGGATAG TACCCGATAG AGATATCAAT
bymvn ACTCTGAGGG ACAGAGCAAT AGGAAAATAG TACCGGACAG AGACGTCAAT
bymv3 AAAGTGAGGG GCAGAGTAGC AAACAAATCA TACCTGATCG GGACGTGAAT

151
bymv4 GCAGGAACTG TTGGAACGTT TTCAGTTCCT AGGCTCAAGA AAATAGCAGG
bymv5 GCAGGAACTG TTGGAACGTT TTCAGTTCCT AGGCTCAAGA AAATAGCAGG
bymv1 GCAGGAACTG TTGGAACATT TTCAGTTCCT AAGCTCAAGA AAATAGCAGG
bymv7 GCAGGAACTG TTGGAACATT TTCAGTTCCT AAGCTCAAGA AAATAGCAGG
bymv6 GCAGGAACTG TTGGAACATT TTCAGTTCCT AGGCTCAAGA AGATAGCAGG
bymv2 GCAGGACTTG TTGGAACATT TTCAGTTCCT AGGCTCAAGA AAATAGCAGG
bymv8 ACAGGAACTG TTGGAACGTT TTCAATTCCT AGACTCAAAA AGATAGCGGG
bymvn GCGGAACTG TGGGAACATT T.....TAGCGG
bymv3 GCAGGAACAA CTGGAACTTT CTCAGTCCCA AGACTCAAGA AGATAGCAGG

200

```

Figura 13 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região N-terminal da proteína da capa de BYMVn e de outras estirpes de BYMV. As seqüências foram obtidas através do programa Genetics Computer Group (Program Manual for the Wisconsin Package). BYMV-Gladiolus (Boye et al., 1992); BYMV-M-I (Mathews et al., 1995); BYMV-CS (Takahashi et al., 1990); BYMV-MB4 e BYMV-MB4 (Nakamura et al., 1994); BYMV-GDD (Hammond & Hammond, 1989); BYMV-Danish gladiolus (Boye et al., 1990); BYMV-S (Tracy et al., 1992).

Tabela 5: Porcentagem de similaridade entre as sequências deduzidas de aminoácidos do N-terminal da CP de BYMVn e de outros isolados de BYMV. As sequências foram obtidas através do programa Genetics Computer Group (Program Manual for the Wisconsin Package). BYMV-Gladiolus (Boye et al., 1992); BYMV-M-I (Mathews et al., 1995); BYMV-CS (Takahashi et al., 1990); BYMV-MB4 (Nakamura et al., 1994); BYMV-GDD Gladiolus (Hammond & Hammond, 1989); BYMV-Danish gladiolus (Boye et al., 1990); BYMV-S (Tracy et al., 1992).

	BYMVn	Gladiolus	M-I	CS	MB4	GDD	Dan. glad	S
BYMVn	100	83.67	87.76	87.76	85.71	85.71	83.67	91.84
Gladiolus		100	88.10	88.10	95.28	95.24	100	90.48
M-I			100	84.92	90.48	88.89	87.80	88.10
CS				100	89.68	87.30	87.80	91.27
MB4					100	95.24	95.12	92.86
GDD						100	95.12	90.48
Dan. glad.							100	90.24
S								100

Tabela 6: Porcentagem de identidade entre as sequências de aminoácidos do N-terminal da CP de BYMVn e de outros isolados de BYMV. As sequências foram obtidas através do programa Genetics Computer Group (Program Manual for the Wisconsin Package). BYMV-Gladiolus (Boye et al., 1992); BYMV-M-I (Mathews et al., 1995); BYMV-CS (Takahashi et al., 1990); BYMV-MB4 (Nakamura et al., 1994); BYMV-GDD Gladiolus (Hammond & Hammond, 1989); BYMV-Danish gladiolus (Boye et al., 1990); BYMV-S (Tracy et al., 1992).

	BYMVn	Gladiolus	M-I	CS	MB4	GDD	Dan. glad.	S
BYMVn	100	79.59	81.63	75.51	77.55	81.63	79.59	79.60
Gladiolus		100	82.54	79.36	91.27	89.68	100	83.33
M-I			100	73.02	82.54	80.16	82.11	77.78
CS				100	80.16	79.36	78.86	80.16
MB4					100	89.68	91.06	85.71
GDD						100	89.43	85.71
Dan. glad.							100	82.93
S								100

mesmo dentro de uma espécie de potyvirus, variações significativas nas seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos podem ser encontradas, refletindo as diferenças biológicas observadas entre este e os demais isolados.

Os resultados de homologia na seqüência da porção N-terminal de CP demonstram a grande variabilidade existente entre isolados de BYMV, encontrados em regiões do mundo geograficamente distintas. As regiões central e C-terminal das CP de potyvirus são altamente homólogas, enquanto diferenças maiores são encontradas no tamanho e na seqüência do N-terminal de diferentes espécies. Em contraste, diferentes estirpes de uma espécie de potyvirus mostram alta homologia na seqüência do N-terminal. Membros distintos do gênero possuem uma homologia de seqüência de CP de 38-71%, enquanto estirpes de uma mesma espécie exibem uma homologia de seqüência maior que 90% e têm seqüências do N-terminal similares (Shukla & Ward, 1988). Entretanto, os resultados deste trabalho demonstraram que, mesmo nesta porção, diferenças significativas podem ser verificadas. Os potyvirus de leguminosas fazem parte de um grupo de taxonomia particularmente confusa dentro do gênero (Barnett *et al.*, 1987; Shukla & Ward, 1988). Existe uma substancial variação entre estirpes de BYMV, a qual raramente é observada entre estirpes de outros potyvirus (Shukla *et al.*, 1994). Esse alto nível de diversidade nessa espécie foi um dos fatores que levou Bos (1970) à criação da hipótese do "continuum" para explicar a taxonomia insatisfatória de potyvirus.

A presença do "triplet" conservado NAG descarta a possibilidade de que mutações nesta região sejam responsáveis pela perda da transmissão por afídeo do isolado BYMVn. A não transmissão poderia portanto estar relacionada com HC-Pro.

Entretanto, neste estudo, não se examinou a HC-Pro do isolado BYMVn. Os testes de transmissão dependente não foram conclusivos, uma vez que aparentemente BYMV possui uma certa especificidade de HC-Pro. O uso de um isolado de BYMV transmitido por afídeo como vírus auxiliar para BYMVn talvez trouxesse luz a esta questão. Associado a isso, ensaios de transmissão através de membrana com HC-Pro purificada poderiam aumentar as chances de se conseguir a transmissão de BYMVn.

Finalmente, análise molecular da HC-Pro de BYMVn poderia mostrar se mutações nos blocos KITC ou PTK estariam envolvidas na perda da transmissão por afídeo do isolado, como demonstrado para outros potyvirus (Atreya & Pirone, 1993; Atreya *et al.*, 1992; Canto *et al.*, 1995; Granier *et al.*, 1993; Grumet *et al.*, 1992; Huet *et al.*, 1994; Legavre *et al.*, 1996; Thornbury *et al.*, 1990).

Paralelamente, um isolado de potyvirus não identificado, pobremente transmitido por afídeos, foi submetido aos mesmos procedimentos metodológicos impostos a BYMVn, na tentativa de se fazer a identificação e caracterização do mesmo. Apesar de se ter conseguido amplificação e clonagem do isolado (Figura 6, linha 3; Figura 10, linhas 1 e 2), o seqüenciamento de nucleotídeos não foi bem sucedido. Assim, não foi possível determinar a posição taxonômica do isolado, bem como a base genética da sua baixa taxa de transmissão por afídeos.

CONCLUSÕES

As várias tentativas de transmissão de BYMVn utilizando diferentes espécies de afídeos, diversas fontes de inóculo e transmissão dependente foram infrutíferas, indicando que fatores ainda não determinados devem estar envolvidos no processo de transmissão. Novas combinações vetor/vírus/hospedeira e, principalmente, vírus auxiliar podem ser tentadas com o objetivo de viabilizar esta transmissão.

Os estudos imunológicos mostraram que sorologia é uma técnica que pode ser usada na diferenciação de potyvirus, guardadas as devidas considerações sobre o aparecimento de reações cruzadas dentro do gênero. Já a metodologia de HPLC deve ser incentivada como método eficiente de diferenciação de espécies de potyvirus.

O seqüenciamento de nucleotídeos da porção terminal da CP demonstrou que o "triplet" NAG em BYMVn não sofreu mutação, não sendo portanto responsável pela perda da capacidade de transmissão do isolado. Outros fatores moleculares como por exemplo a proteína HC-Pro devem ser investigados, visando elucidar as bases genéticas da não transmissão de BYMVn.

As homologias de nucleotídeos e aminoácidos encontradas entre os diversos isolados de BYMV comparados refletem uma significativa variabilidade entre estirpes de um mesmo potyvirus. Estes resultados moleculares refletem as diferenças biológicas encontradas em BYMVn quando comparado a outras estirpes.

RESUMO

Bean yellow mosaic virus (BYMV) é uma espécie do gênero *Potyvirus*, da família Potyviridae. Esses vírus são transmitidos por afídeos de maneira não persistente, exigindo para tal a presença de duas proteínas codificadas pelo vírus: a proteína da capa (CP) e a proteinase "helper component" (HC-Pro). Mutações em alguns poucos blocos de aminoácidos nestas duas proteínas estão relacionadas com a perda da transmissão de potyvirus por afídeos. Mutações no "triplet" altamente conservado D/NAG, localizado na região N-terminal da CP, e nos blocos KITC e PTK, localizados respectivamente no N-terminal e no C-terminal de HC-Pro, foram associadas com esta perda.

Uma estirpe necrótica de BYMV, denominada BYMVn, não foi transmitida por 15 diferentes espécies de afídeos. Ensaio de transmissão dependente, utilizando-se

BCMV como vírus auxiliar, e com dez diferentes fontes de inóculo também foram negativos.

Visando elucidar a base molecular da não transmissão de BYMVn, a porção N-terminal da CP foi caracterizada.

RNA total de planta infectada com BYMVn foi extraído e utilizado como molde na obtenção de cDNA. Este último foi submetido à amplificação por PCR e o produto obtido (414pb da região N-terminal da CP) foi ligado ao plasmídeo pGemT Vector. O clone obtido foi sequenciado, permitindo a leitura de 170 nucleotídeos da região 5' e 208 da região 3' do fragmento. O "triplet" NAG da CP mostrou-se conservado, não podendo ser associado a não transmissão de BYMVn por afídeos. Análise molecular subsequente de HC-Pro poderia mostrar se mutações nos blocos KITC e/ou PTK estariam, portanto, envolvidas na perda da capacidade de transmissão de BYMVn pelo inseto vetor.

Como aproximadamente 40% da CP, representando a metade N-terminal, de BYMVn foi sequenciada, os valores de homologia encontrados devem representar as diferenças reais existentes entre a CP deste isolado e as dos demais já caracterizados. Diferenças variando de 18,3 à 29,6% de nucleotídeos e de 12,0 à 25,5% de aminoácidos demonstram que mesmo dentro de uma espécie de potyvirus, variações significativas nas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos podem ser encontradas, refletindo as diferenças biológicas observadas entre este e os demais isolados. A análise dos valores de identidade e similaridade da seqüência de aminoácidos entre BYMVn e os demais isolados demonstrou que o isolado necrótico BYMVn é mais relacionado com a estirpe S.

Estudos adicionais de western blot mostraram uma massa molecular da CP de BYMVn de cerca de 30 kDa, sendo que a proteína manteve sua reatividade sorológica. O perfil peptídico da CP, obtido através de digestão trípica e HPLC, mostrou que esta técnica pode ser usada na diferenciação de espécies de potyvirus, mas não permite localizar diferenças menores na seqüência de aminoácidos, como as responsáveis pela transmissão por afídeos.

ABSTRACT

Bean yellow mosaic virus is a virus species identified as a member of the genus *Potyvirus* within the Potyviridae family. These viruses are aphid transmitted in a non-persistent manner. The transmission depends upon both virus encoded proteins: the coat protein (CP) and the helper component proteinase (HC-Pro). Mutational studies in some of the amino acids domains demonstrated that both proteins are related with the loss of transmission of these viruses by aphids. Mutations on the highly conserved triplet D/NAG, located at the CP N-terminal, and on KITC and PTK boxes, located at HC-Pro N-terminal and C-terminal respectively, were associated with the lack of vector transmissibility.

Fifteen different species of aphids were tested for the transmission of a BYMV necrotic strain, denoted BYMVn. None of them was able to transmit this virus strain.

Dependent transmission assay, using BCMV as helper virus, was also negative. Ten different inoculum sources for virus acquisition by the aphid were also tested and no virus transmission was obtained.

In order to elucidate the molecular basis of this non aphid-transmissibility of the viruses, part of the N-terminal of the BYMVn coat protein was sequenced.

Total RNA was extracted from plants infected with BYMVn and used as template for cDNA synthesis. This cDNA was used as template for amplification by PCR and the product (414 bp from the CP N-terminal) was cloned in the pGemT Vector and sequenced. A nucleotide sequence of 170 bases from 5' region and 208 base from 3' region of that fragment was obtained. The triplet NAG showed to be conserved in the BYMVn coat protein and it can not be associated to inability of the virus to be aphid transmitted. Further molecular analysis of the HC-Pro may show if mutations on KITC or PTK boxes are involved on the BYMVn transmissibility by aphids.

Approximately 40% of N-terminal coat protein of BYMVn was sequenced. The similarity values found may correspond to the real difference between the BYMVn CP and the other previously isolates characterize. Differences ranging from 18,3 - 29,6% of nucleotides sequences, and 12 - 25,5% at amino acids level demonstrate that even in the some species of potyvirus, significant variations in the nucleotides and amino acids sequences can be found and it can express the biological differences observed between BYMVn and the other BYMV isolates. Analysis of the amino acid similarities and identities between BYMVn and the other isolates demonstrated that the necrotic isolate is closer related to the S strain.

Additional western blot studies showed that CP of BYMVn has a molecular weight of about 30 kDa, showing no changes in its serological reactivity. The HPLC peptide profile of tryptic digest CP showed that this technique can be used to separate species within the potyvirus genus, but it does not allow us to locate small differences in the amino acid sequence responsible for aphid transmission.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, R., DOUGHERTY, W.G., PARKS, T.D., WILLIS, L., JOHNSTON, R.E., KELLY, M. & ARMSTRONG, F.B. Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. **Virology** **147**: 309-316. 1985.
- ATREYA, C.D. & PIRONE, T.P. Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acids substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. **Proceedings of the National Academy of Science USA** **90**: 11919-11923. 1993.
- ATREYA, C.D., RACCAH, B. & PIRONE, T.P. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. **Virology** **178**: 161-165. 1990.

- ATREYA, P.L., ATREYA, C.D. & PIRONE, T.P. Amino acids substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. **Proceedings of the National Academy of Science USA 88**: 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 infected tobacco plants. **Virology 191**: 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 76**: 265-270. 1995.
- BARNETT, O.W., RANGLES, J.W. & BURROWS, P.M. Relationship among Australian and North American isolates of the bean yellow mosaic potyvirus subgroup. **Phytopathology 77**: 791-799. 1987.
- BLACKMAN, R.L. & EASTOP, V.F. **Aphids on the world's crops. An Identification guide**. Avon. John Wiley & Sons. 1985. 466 p.
- BOLLAG, D.M. & EDELSTEIN, S.J. **Protein methods**. New York. Wiley-Liss. 1991. 230 p.
- BOS, L. The identification of three new viruses isolated from *Wisteria* and *Pisum* in the Netherlands, and the problem of variation within the potato virus Y group. **Netherlands Journal of Plant Pathology 76**: 8-46. 1970.
- BOYE, K., JENSEN, P.E., STUMMANN, B.M. & HENNINGSEN, K.W. Nucleotide sequence of cDNA encoding the BYMV coat protein gene. **Nucleic Acids Research 18**: 4926. 1990.

- BOYE, K., STUMMAN, B.M. & HENNINGSEN, K.W. cDNA cloning and sequencing of the bean yellow mosaic virus nuclear inclusion protein genes. **Plant Molecular Biology** **18**: 1203-1205. 1992.
- BRYAN, G.T., GARDNER, R.C., FORSTER, R.L.S. Nucleotide sequence of the coat protein gene of a strain of clover yellow vein virus from New Zealand: conservation of a stemloop structure in the 3' region of potyviruses. **Archives of Virology** **124**: 133-146. 1992.
- CANTO, T., LOPEZ-MOYA, J.J., SERRA-YOLDI, M.T., DÍAZ-RUÍZ, J.R. & LÓPEZ-ABELLA, D. Different helper component mutations associated with lack of aphid transmissibility in two isolates of potato virus Y. **Phytopathology** **85**: 1519- 1524. 1995.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry** **162**: 156-159. 1987.
- COSTA, C.L., EASTOP, V.F. & BLACKMAN, R.L. Brazilian Aphidoidea: I. Key to families, subfamilies and account of the Phylloxeridae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **28** (2): 197-215. 1993.
- DOOLITTLE, S.P. & JONES, F.R. The mosaic disease in the garden pea and other legumes. **Phytopathology** **15**: 763-771. 1925.
- EDWARDSON, J.R. & CHRISTIE, R.G. **The potyvirus group**. Monograph 16. Florida agric. Exp. Station. 1991.
- EVANS, I.R. & ZETTLER, F.W. Aphid and mechanical transmission properties of bean yellow mosaic virus isolates. **Phytopathology** **60**: 1170-1174. 1970.

- GAL-ON, A., ANTIGNUS, Y., ROSNER, A. & RACCAH, B. A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. **Journal of General Virology** **73**: 2183-2187. 1992.
- GOVIER, D.A. & KASSANIS, B. Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission of potato virus Y. **Virology** **57**: 285-286. 1974a.
- GOVIER, D.A. & KASSANIS, B. A virus-induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. **Virology** **61**: 420-426. 1974b.
- GOVIER, D.A., KASSANIS, B. & PIRONE, T.P. Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. **Virology** **78**: 306-314. 1977.
- GRANIER, F., DURAND-TARDIF, M., CASSE-DELBART, F., LECOQ, H. & ROBAGLIA, C. Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. **Journal of General Virology** **74**: 2737-2742. 1993.
- GRUMET, R. & FANG, G. cDNA cloning and sequence analysis of the 3' terminal region of zucchini yellow mosaic virus RNA. **Journal of General Virology** **71**: 1619-1622. 1990.
- GRUMET, R., BADA, R. & HAMMAR, S. Analysis of the zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) potyviral helper component, possible identification of an aphid-interaction domain. **Phytopathology** **82**: 1176. 1992 (Abstract).
- HAMMOND, J. & HAMMOND, R.W. Molecular cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the bean yellow mosaic virus coat protein gene. **Journal of General Virology** **70**: 1961-1974. 1989.

- HAMPTON, R.O. The nature of bean yield reduction by bean yellow and bean common mosaic viruses. **Phytopathology 65**: 1342-1346. 1975.
- HARRISON, B.D. & ROBINSON, D.J. Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B 321**: 447-462. 1988.
- HELLMANN, G.M., THORNBURY, D.W., HIEBERT, E., SHAW, J.G., PIRONE, T.P. & RHOADS, R.L. Cell-free translation of tobacco vein mottling virus RNA. II. Immunoprecipitation of products by antisera to cylindrical inclusion, nuclear inclusion, and helper component proteins. **Virology 124**: 434-444. 1983.
- HUET, H., GAL-ON, A., MEIR, E., LECOQ, H. & RACCAH, B. Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. **Journal of General Virology 75**: 1407-1414. 1994.
- JAYARAM, C., HILL, J.H. & MILLER, W.A. Nucleotide sequence of the coat protein genes of two aphid-transmissible strains of soybean mosaic virus. **Journal of General Virology 72**: 1001-1003. 1991.
- KANTRONG, S., SAUNAL, H., BRIAND, J.P. & SAKO, N. A single amino acid substitution at N-terminal region of coat protein of turnip mosaic virus alters antigenicity and aphid transmissibility. **Archives of Virology 140**: 453-467. 1995.
- KASSANIS, B. & GOVIER, D.A. New evidence on the mechanism of aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and potato C. **Journal of General Virology 10**: 99-101. 1971a.

- KASSANIS, B. & GOVIER, D.A. The role of the helper virus in aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and potato virus C. **Journal of General Virology** **13**: 221-228. 1971b.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-685.
- LECOQ, H. & PITRAT, M. Specificity of the helper-component-mediated aphid transmission of three potyviruses infecting muskmelon. **Phytopathology** **75**: 890-893. 1985.
- LECOQ, H., BOURDIN, D., RACCAH, B., HIEBERT, E. & PURCIFULL, D.E. Characterization of a zucchini yellow mosaic virus isolate with a deficient helper component. **Phytopathology** **81**: 1087-1091. 1991.
- 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** **77**: 1343-1347. 1996.
- MAIA, I.G., HAENNI, A-L & BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **Journal of General Virology** **77**: 1335-1341. 1996.
- MAISS, E., TIMPE, U., BRISKE, A., JELKMANN, W., CASPER, R., HIMMLER, G., MATTANOVICH, D. & KATINGER, H.W.D. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. **Journal of General Virology** **70**: 513-524. 1989.
- MARINHO, V.L.A. & KITAJIMA, E.W. Método simplificado de purificação de alguns potyvirus. **Fitopatologia Brasileira** **14** (1): 91-93. 1989.

- MATHEWS, A., DWYER, G., WYLIE, S. & JONES, M.G.K. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the 3' end of the BYMV-MI genome. **Archives of Virology** **140** (12): 2269-2272. 1995.
- MCKERN, N.M., MINK, G.I., BARNETT, O.W., MISHRA, A., WHITTAKER, L.A., SILBERNAGEL, M.J., WARD, C.W. & SHUKLA, D.D. Isolates of bean common mosaic virus comprising two distinct potyviruses. **Phytopathology** **82**:923-929. 1992a.
- MCKERN, N.M., SHUKLA, D.D. BARNETT, O.W., VETTEN, H.J, DIJKSTRA, J., WHITTAKER, L.W. & WARD, C.W. Coat protein properties suggest that adzuki bean common mosaic virus, blackeye cowpea mosaic virus, peanut stripe mosaic virus, and three isolates from soybean are all strains of the same potyvirus. **Intervirology** **33**: 121-134. 1992b.
- NAKAMURA, S., HONKURA, R., UGAKI, M., OHSHIMA, M. & OHASHI, Y. Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of bean yellow mosaic virus RNA and resistance to viral infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* expressing its coat protein gene. **Annals of the Phytopathological Society of Japan** **60**: 295-304. 1994.
- NAKASHIMA, H., SAKO, N., JOH, K. & NONAKA, F. Nucleotide sequences of coat protein genes of aphid transmissible and non-transmissible isolates of turnip mosaic virus. **Annals of the Phytopathological Society of Japan** **57**: 549-557. 1991.

- NAKASHIMA, H., SAKO, N. & HORI, E. Nucleotide sequences of the helper component-proteinase genes of aphid transmissible and non-transmissible isolates of turnip mosaic virus. **Archives of Virology** **131**: 17-27. 1993.
- PAGUIO, O.R. & KUHN, C.W. Aphid transmission of peanut mottle virus. **Phytopathology** **66**: 473-476. 1976.
- PIRONE, T.P. Efficiency and selectivity of the helper-component-mediated aphid transmission of purified potyviruses. **Phytopathology** **71**: 922-924. 1981.
- PIRONE, T.P. & THORNBURY, D.W. Role of virion and helper component in regulating aphid transmission of tobacco etch virus. **Phytopathology** **73**: 872-875. 1983.
- RACCAH, B. & PIRONE, T.P. Characteristics of and factors affecting helper-component-mediated aphid transmission of a potyvirus. **Phytopathology** **74**: 305-308. 1984.
- RAMAGEM, R.D. **Caracterização de uma estirpe necrótica do vírus do mosaico amarelo do feijoeiro (BYMV)**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. 1993. 100 p.
- RAMAGEM, R.D., COSTA, C.L. & KITAJIMA, E.W. Algumas propriedades físicas e biológicas de um isolado necrótico do vírus do mosaico amarelo do feijoeiro.. **Fitopatologia Brasileira** **17** (2): 178. 1992a (resumo).
- RAMAGEM, R.D., COSTA, C.L., BIANCHINI, A. & KITAJIMA, E.W. Estudos sobre um isolado necrótico do vírus do mosaico amarelo do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira** **17** (2): 179. 1992b (resumo).
- RIECHMANN, J.L., LAÍN, S. & GARCÍA, J.A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **Journal of General Virology** **73**: 1-16. 1992.

- SAKO, N. Loss of aphid transmissibility of turnip mosaic virus. **Phytopathology** **70**: 647-649. 1980.
- SAKO, N. & OGATA, K. Different helper factors associated with aphid transmission of some potyviruses. **Virology** **112**: 762-765. 1981.
- SALOMON, R. Partial cleavage of sweet potato feathery mottle virus coat protein subunit by an enzyme in extracts of infected symptomless leaves. **Journal of General Virology** **70**: 1943-1949. 1989.
- SALOMON, R. Proteolytic cleavage of the N-terminal region of potyvirus coat protein and its relation to host recovery and vector transmission. **Archives of Virology (Supplementum 5)**: 75-76. 1992.
- SALOMON, R. & BERNARDI, F. Inhibition of viral aphid transmission by the N-terminus of the maize dwarf mosaic virus coat protein. **Virology** **213** (2): 676-679. 1995.
- SHUKLA, D.D. & WARD, C.W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. **Journal of General Virology** **69**: 2703-2710. 1988.
- SHUKLA, D.D. & WARD, C.W. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. **Archives of Virology** **106**: 171-200. 1989a.
- SHUKLA, D.D. & WARD, C.W. Structure of potyvirus coat proteins and its application in taxonomy of the potyvirus group. **Advances In Virus Research** **36**: 273-314. 1989b.

- SHUKLA, D.D., INGLIS, A.S., MCKERN, N.M. & GOUGH, K.H. Coat protein of potyviruses. 2. Amino acid sequence of the coat protein of potato virus Y. **Virology** **152**: 118-125. 1986.
- SHUKLA, D.D., MCKERN, N.M., GOUGH, K.H., TRACY, S.L. & LETHO, S.G. Differentiation of potyviruses and their strains by high performance liquid chromatographic peptide profiling of coat proteins. **Journal of General Virology** **69**: 493-502. 1988a.
- SHUKLA, D.D., STRIKE, P.M., TRACY, S.L., GOUGH, K.H. & WARD, C.W. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. **Journal of General Virology** **69**: 1497-1508. 1988b.
- SHUKLA, D.D., THOMAS, J.E., MCKERN, N.M., TRACY, S.L. & WARD, C.W. Coat protein of potyviruses. 4. Comparison of biological properties, serological relationships, and coat protein amino acid sequences of four strains of potato virus Y. **Archives of Virology** **102**: 207-219; 1988c.
- SHUKLA, D.D., TOSIC, M., JILKA, J. FORD, R.E., TOLER, R.W. & LANGHAM, M.A.C. Taxonomy of potyviruses infecting maize, sorghum, and sugarcane in Australia and the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. **Phytopathology** **79**: 223-229. 1989.
- SHUKLA, D.D., WARD, C.W. & BRUNT, A.A. **The potyviridae**. Cambridge. CAB International. 1994. 516 p.

- SIMONS, J. Aphid transmission of a nonaphid-transmissible strain of tobacco etch virus. **Phytopathology 66**: 652-654. 1976.
- SWENSON, K.G. Transmission of bean yellow mosaic virus by aphid. **Journal of Economic Entomology 50**: 727-731. 1957.
- SWENSON, K.G., SOHI, S.S. & WELTON, R.E. Loss of transmissibility by aphids of bean yellow mosaic virus. **Annals of the Entomological Society of America 57**: 378-382. 1964.
- TAKAHASHI, T., UYEDA, I. & SHIKATA, E. Nucleotide sequence of the capsid protein gene of bean yellow mosaic virus chlorotic spot strain, **Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University 64**: 152-163. 1990.
- THORNBURY, D.W. & PIRONE, T.P. Helper components of two potyviruses are serologically distinct. **Virology 125**: 487-490. 1983.
- THORNBURY, D.W., HELLMANN, G.M., RHOADS, R.E. & PIRONE, T.P. Purification and characterization of potyvirus helper component. **Virology 144**: 260-267. 1985.
- THORNBURY, D.W., PATTERSON, C.A., DESSENS, J.T. & PIRONE, T.P. Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain, potato virus C. **Virology 178**: 573-578. 1990.
- TRACY, S.L., FRENKEL, M.J., GOUGH, K.H., HANNA, P.J. & SHUKLA, D.D. Bean yellow mosaic, clover yellow vein and pea mosaic are distinct potyviruses: evidence from coat protein gene sequences and molecular hybridization involving the 3' non-coding regions. **Archives of Virology 122**: 249-261. 1992.

- WILLIAMS, K.R. & STONE, K.L. In gel digestion of SDS PAGE-separated proteins: observations from internal sequencing of 25 proteins. In: CRABB, J.W. (ed.). Techniques in protein chemistry VI. San Diego. Academic Press. 1995. 143-152.
- UYEDA, I. Bean yellow mosaic virus subgroup; search for the group specific sequences in the 3' terminal region of the genoma. **Archives of Virology (Supplement 5):** 377-385. 1992.
- UYEDA, I., TAKAHASHI, T. & SHIKATA, E. Relatedness of the nucleotide sequence of the 3'-terminal region of clover yellow vein potyvirus RNA to bean yellow mosaic potyvirus RNA. **Intervirology 32:** 234-245. 1991.

LISTA DE REAGENTES E TAMPÕES

Acrilamida/bis: 87,6 g acrilamida e 2,4 g N,N'-bis-methylene-acrylamide em 100 ml água.

Água DEPC: água com DEPC 0,1% (v/v), autoclavada.

Clorofil: 29 clorofórmio: 1 álcool isoamílico (v/v).

Fenol tamponado: 200 g de fenol liquefeito acrescido de 0,2 g de 8-hidroxiquinoleína, equilibrado com Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 até a fase fenólica apresentar pH 7,8; após descartada a fase aquosa, o processo é repetido com Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; descartada novamente a fase aquosa, adiciona-se Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e 0,2% (v/v) β -mercaptoetanol.

Gel concentrador 4%: 6,1 ml água, 2,5 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 100 µl SDS 10% (p/v), 1,3 ml acrilamida/bis, 50 µl persulfato de amônio 10% (p/v) e 10 µl TEMED.

Gel separador 12%: 3,5 ml água, 2,5 ml Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 100 µl SDS 10% (p/v), 4,0 ml acrilamida/bis, 50 µl persulfato de amônio 10% (p/v) e 5 µl TEMED.

Tampão A: TFA 0,1% (v/v).

Tampão B: acetonitrila em TFA 0,054% (v/v).

Tampão de amostra de ácido nucleico 5x: 0,25% (p/v) de bromophenol blue, 0,25% (p/v) xylene cyanole e 15% (p/v) Ficoll 400. Obs.: para os fragmentos de PCR (414 pb) utilizou-se tampão sem bromophenol blue para facilitar a visualização no gel.

Mistura da RT: 7,5 µl água DEPC, 5,0 µl tampão da transcriptase reversa 5x, 0,5 µl inibidor de RNase (40 u/µl) (Gibco), 1 µl dNTPs 2,5 mM e 1 µl transcriptase reversa (200 u/µl) (Gibco).

Mistura para PCR: 30 µl água, 0,5 µl dNTPs 25 mM, 2,0 µl (1 µg) oligonucleotídeo 1, 2,0 µl (1 µg) oligonucleotídeo 2, 5,0 µl tampão da DNA Taq Polimerase 10x e 0,5 µl DNA Taq Polimerase (5 u/µl) (CENBIOT).

PBS: tampão fosfato 0,01 M pH 7,2 com 0,15 M NaCl e 40 mM KCl.

PBS-leite/BSA: PBS com 1% (p/v) de leite em pó desnatado e 0,5% (p/v) de BSA.

PBS-Tween: PBS com 0,05% (v/v) de Tween 20.

PBS-Tween-leite/BSA: PBS-Tween com 1% (p/v) de leite em pó desnatado e 0,5% (p/v) de BSA.

Revelador: 66 μ l de NBT (5% (p/v) em dimethylformamide 70%(v/v)) e 33 μ l de BCIP (5% (p/v) em dimethylformamide 100%) em 10 ml de tampão da fosfatase alcalina.

Tampão borato 1: tampão borato 0,01 M pH 8,3 acrescido de 0,001 M EDTA.

Tampão borato 2: tampão borato 0,01 M pH 8,3 acrescido de 0,01 M EDTA.

Tampão da fosfatase alcalina: 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M NaCl e 5 mM MgCl₂.

Tampão de amostra de proteína 2x: 4 ml água, 1 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 0,8 ml glicerol, 1,6 ml SDS 10% (p/v), 0,4 ml 2- β -mercaptoetanol e 0,2 ml bromophenol blue 0,05% (p/v).

Tampão de corrida: 0,05 M Tris-HCl pH 8,3, 0,4 M glicina e 0,1% (p/v) SDS.

Tampão de extração de RNA total: isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sódio 25 mM pH 7, N-lauroylsarcosine 0,5% (p/v) e 2-β-mercaptoetanol 0,1 M.

Tampão de extração de vírus: tampão fosfato 0,5 M pH 7,2, 0,01 M EDTA e 0,75% (p/v) Na₂SO₃.

Tampão de transferência: 25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% metanol (v/v), pH 8,1-8,4.

TBE 0,5X: 45 mM ácido bórico, 45 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA pH 8,0.

TBS: 10 mM Tris-HCl pH 7,5 e 150 mM NaCl.

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8 e 1 mM EDTA.

LISTA DE AMINOÁCIDOS E SEUS SÍMBOLOS

A	Ala	alanina
C	Cys	cisteína
D	Asp	ácido aspártico
E	Glu	ácido glutâmico
F	Phe	fenilalanina
G	Gly	glicina
H	His	histidina
I	Ile	isoleucina
K	Lys	lisina
L	Leu	leucina
M	Met	metionina
N	Asn	asparagina
P	Pro	prolina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
S	Ser	serina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
W	Trp	triptofano
Y	Tyr	tirosina