

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fitopatologia

**Caracterização do genoma do *Papaya lethal yellowing virus* e  
estudo da regulação gênica do *Tomato bushy stunt virus***

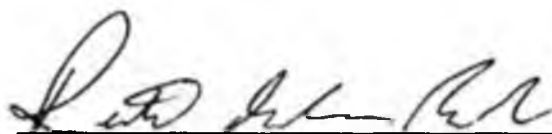
ANA MARIA RODRIGUES DA SILVA

Tese apresentada ao Departamento de  
Fitopatologia do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade de Brasília  
como requisito parcial para a obtenção  
do título de Doutor em Fitopatologia

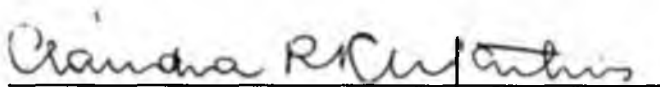
Brasília-DF  
2001

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microscopia Eletrônica (Departamento de Biologia Celular) e Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília sob a orientação do professor Renato de Oliveira Resende e com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca Examinadora:



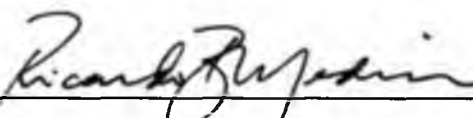
Renato de Oliveira Resende (orientador)  
Universidade de Brasília-UnB



Cláudia Renata Martins (professora)  
Universidade de Brasília-UnB



Bergman Morais Ribeiro (professor)  
Universidade de Brasília-UnB



Ricardo Brilhante Medeiros (professor)  
Universidade de Brasília-UnB



Alice Kazuko Inoue Nagata (pesquisadora)  
Centro Nacional de Hortaliças-CNPH/Embrapa

Dedico esse trabalho aos meus pais Francisco e Helena,  
Por me darem a oportunidade de conquistar  
Esse sonho.

Dedico ao Steven e Ana Gabriela mais essa conquista,  
São vocês, a razão da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Renato Resende pela orientação e dedicação ao longo desses anos. A ele devo grande parte da minha formação profissional. Seus ensinamentos ficarão guardados e muitas saudades ficarão do nosso convívio.

Ao Dr. Herman Scholthof pela grande oportunidade que me concedeu de realizar parte desse trabalho sob sua orientação.

Ao Dr. Elliot W. Kitajima os meus sinceros agradecimentos por toda ajuda na concretização desse trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela revisão do texto.

Ao professor Bergman Morais Ribeiro pelo exemplo de profissional e pesquisador. A você agradeço pela participação na minha formação profissional.

À professora Cláudia Renata por um dia ter acreditado no meu potencial e com isso me possibilitou a realização de um sonho.

A todos do laboratório de microscopia eletrônica meus sinceros agradecimentos.

Aos profissionais da Estação Biológica da Universidade de Brasília, os meus agradecimentos. Ao Sr. Fábio o meu muito obrigado.

Aos amigos Valácia, Murilo, Thor Vinícios, Luciana Pozzer, Tereza Shelly, Reginaldo, Ivany, Carmen, Marcelo Eiras, Bringel, Alice Nagata, Tatsuya, Eni, Paula, Fernanda, Marília, Simone Ribeiro, José Pinedo, Fernando e Hugo pela amizade e recordações que guardarei de todos vocês para sempre.

Ao Dr. David Bertiolli pelo auxílio na análise dos dados de seqüência.

As amigas que surgiram durante o doutorado sandwich. À Cláudia Valéria, Suzana e ao Over Cabrera, Wenping, Jong Won, Jeff e Jorge Rezende, os meus sinceros agradecimentos por terem amenizado as saudades sentidas do Brasil.

À minha família pela compreensão e apoio que me deram todos esses anos. Ao Vovô, a vovó e à Tia Lis, meus sinceros agradecimentos por terem substituído a “mamãe” da Ana Gabriela em tantos momentos de ausência. O carinho e atenção dedicados a ela ficarão eternamente guardados em minha memória.

À minha filha Ana Gabriela, a você eu agradeço por ter se tornado a razão do meu viver. O seu sorriso alimenta a minha alma e me dá forças para lutar.

Ao meu Esposo, Steven, o meu muito obrigado por toda a felicidade que me proporcionou ao longo desses anos. O seu amor e a sua dedicação de esposo e de pai fazem a minha realização.

Enfim, nada disso teria valor se não fosse abençoado por Deus.

## ÍNDICE GERAL

<b>PREFÁCIO</b>	<b>I</b>
<b>DEDICATÓRIA</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE GERAL</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS</b>	<b>VI</b>
<b>CAPÍTULO I: Estudos citopatológicos e caracterização molecular do <i>Papaya lethal yellowing virus</i></b>	<b>01</b>
<b>CAPÍTULO II: Influência da seqüência líder e do contexto em torno do códon de iniciação da proteína P22 na regulação da expressão gênica do <i>Tomato bushy stunt virus</i></b>	<b>75</b>
<b>RESUMO</b>	<b>112</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAFIA CITADA</b>	<b>118</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>129</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

### CAPÍTULO I:

<b>Figura 1.1:</b> Sintomas do mosaico em folha de mamoeiro infectada com o <i>Papaya Lethal Yellowing Virus</i> (PLYV)	3
<b>Figura 1.2:</b> Representação esquemática da organização genômica do <i>Southern cowpea mosaic virus</i> (SCPMV) e do <i>Cocksfoot mottle virus</i> (CfMV)	17
<b>Figura 1.3:</b> Micrografia eletrônica de transmissão de secções ultrafinas de tecido de planta de mamão infectadas com o <i>Papaya Lethal Yellowing Virus</i> (PLYV)	34
<b>Figura 1.4:</b> Detalhes do arranjo tubular das partículas do PLYV	35
<b>Figura 1.5:</b> Resultados dos experimentos de imunomarcção com ouro usando anti-soro contra o PLYV nas secções dos tecidos infectados pelo PLYV	37
<b>Figura 1.6:</b> Detalhes da marcação dos arranjos tubulares das partículas do PLYV em secções longitudinais (A) e transversais (B)	38
<b>Figura 1.7:</b> “Western blotting” da proteína capsial do PLYV. Membrana de nitrocelulose tratada com anti-soro policlonal preparado contra a proteína capsial do <i>Papaya lethal yellowing virus</i> (PLYV) em (A) e do <i>Southern bean mosaic virus</i> (SBMV) em (B)	40
<b>Figura 1.8:</b> Produtos da RT-PCR vistos em gel de agarose 1%	41
<b>Figura 1.9:</b> (A) Estratégias de amplificação do genoma do <i>Papaya lethal yellowing virus</i> (PLYV) via PCR e/ou cDNA. (B) Representação do RNA genômico do PLYV com os oligonucleotídeos randômicos anelando-se ao acaso	42
<b>Figura 1.10:</b> Padrão eletroforético do cDNA do PLYV preparado com dCTP marcado radioativamente com <sup>32</sup> P	44
<b>Figura 1.11:</b> Padrão de restrição do plasmídeo PLYV-3 digerido com as enzimas de restrição <i>Hind</i> III e <i>EcoR</i> I em gel de agarose 1 %	45

<b>Figura 1.12:</b> Esquema representativo do alinhamento da seqüência proveniente do plasmídeo PLYV-28s (senso) e PLYV-28as (anti-senso)	47
<b>Figura 1.13:</b> Esquema do alinhamento das seqüências provenientes dos plasmídeos PLYV-29, PLYV-55, PLYV-60, PLYV-85, PLYV-96, PLYV-99 e PLYV-102	48
<b>Figura 1.14:</b> Esquema de obtenção da seqüência de nucleotídeos do PLYV, que apresenta homologia com os genes da polimerase e da proteína do capsídeo dos sobemovírus	49
<b>Figura 1.15:</b> Amplificação via PCR do genoma do PLYV, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a polimerase e proteína do capsídeo	51
<b>Figura 1.16:</b> Seqüência nucleotídica obtida para o <i>Papaya Lethal Yellowing Virus</i> contendo 3226 nucleotídeos	52
<b>Figura 1.17:</b> Alinhamento de aminoácidos do gene da poliproteína (A) e da proteína do capsídeo (B) do PLYV com as espécies de sobemovírus	58
<b>Figura 1.18:</b> Modelo proposto para a organização genômica do PLYV	68
<b>Tabela 1.1:</b> Características biológicas e moleculares de alguns gêneros de vírus de planta que se assemelham às características apresentadas pelo PLYV	10
<b>Tabela 1.2.</b> Espécies de vírus do gênero <i>Sobemovirus</i> com suas respectivas hospedeiras naturais e formas de transmissão na natureza	14
<b>Tabela 1.3:</b> Relação dos oligonucleotídeos usados nas reações de PCR e/ou cDNA	28
<b>Tabela 1.4:</b> Comparação de homologia de nucleotídeos e aminoácidos entre o PLYV e espécies de sobemovírus, tombusvírus, necrovírus, polerovírus e enamovírus para o gene da polimerase viral	61
<b>Tabela 1.5:</b> Comparação de homologia de nucleotídeos e aminoácidos entre o PLYV e espécies de sobemovírus, tombusvírus, necrovírus, polerovírus e enamovírus para o gene da proteína do capsídeo	62

## CAPÍTULO II:

<b>Figura 2.1:</b> Representação esquemática da organização genômica do <i>Tomato Bushy Stunt Virus</i> (TBSV)	79
<b>Figura 2.2:</b> Representação esquemática de um mRNA típico proposto por Kozak (1989) para a iniciação da tradução de um organismo eucariótico	82
<b>Figura 2.3:</b> Representação esquemática de um mRNA baseado no modelo típico proposto por Kozak (1991), denominado "leaky scanning"	83
<b>Figura 2.4:</b> Representação esquemática da construção do plasmídeo p22AUGcm	91
<b>Figura 2.5:</b> Representação esquemática da construção do plasmídeo p19T	94
<b>Figura 2.6:</b> Representação esquemática da construção de p41 $\Delta$ 51LAUG	98
<b>Figura 2.7:</b> Representação esquemática da construção do plasmídeo p41T16LAUG	99
<b>Figura 2.8:</b> RNA total dos protoplastos de <i>Nicotiana benthamiana</i> visualizados em gel de agarose a 1%	101
<b>Figura 2.9:</b> Análise de "northern blotting" do RNA total dos protoplastos mostrados na figura 8 com a sonda radioativa contra pTBSV-100	101
<b>Figura 2.10:</b> Análise de "western blotting" da proteína do capsídeo (P41) e de movimento (P22) do TBSV, revelado com quimioluminescência	102
<b>Figura 2.11:</b> Análise por "western blotting" das proteínas de movimento do TBSV 3, 5, 6 e 7 dias após a inoculação, com as respectivas construções: p41 $\Delta$ 51LAUG e p41T16LAUG	105



## CAPÍTULO I

# ESTUDOS CITOPATOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PAPAYA LETHAL YELLOWING VIRUS

### INTRODUÇÃO:

Mamoeiros infectados pelo *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) foram inicialmente relatados por Loreto *et al.* (1983). Estes autores alertaram para o perigo potencial que esse vírus poderia representar para grandes áreas produtoras dessa fruteira tropical. Posteriormente, novos surtos dessa virose foram relatados em outras regiões do país [Bahia (Vega *et al.*, 1988); Ceará (Lima & Santos, 1991), Rio Grande do Norte (Kitajima *et al.*, 1992a,b) e Paraíba (Camarço *et al.*, 1996)]. Entretanto, o vírus parece afetar pequenas áreas de plantio, não estando amplamente disseminado (Kitajima *et al.*, 1992a). Este fato minimiza sua importância econômica atualmente.

Vários autores têm estudado as características biológicas do PLYV. Dentre elas pode-se citar: a sintomatologia, o círculo de hospedeiras e a sorologia (Oliveira *et al.*, 1989; Kitajima *et al.*, 1992a,b; Lima *et al.*, 1994). Silva (1996) e Silva *et al.* (1997) elucidaram aspectos biológicos e moleculares que vieram a corroborar com as informações científicas prévias disponíveis na literatura e que são detalhadas a seguir.

#### 1.1. Sintomatologia

Os sintomas causados pelo PLYV em mamão 'Solo' caracterizam-se por uma clorose e mosqueado das folhas parcialmente desenvolvidas no terço superior da copa, podendo essas cair posteriormente. O ponteiro, com a evolução da doença, apresenta-se ligeiramente retorcido, com folhas cloróticas. Com o tempo, essas folhas amarelecem, murcham e morrem, terminando assim, com a morte das plantas. Nos frutos, observa-se murcha generalizada, acompanhada de intensa exudação de látex e nota-se o aparecimento de manchas circulares na casca, primeiramente verde clara e posteriormente amarela, além de ficarem com a maturação retardada e polpa empedrada.

Essa sintomatologia resulta em plantas com menor desenvolvimento e com baixa produtividade (Loreto *et al.*, 1983). Inicialmente, plantas de mamoeiro inoculadas mecanicamente exibem manchas cloróticas nas folhas inoculadas 1-2 semanas após a inoculação, evoluindo para um mosqueado sistêmico e também distorções foliares, do tipo cordão de sapato (Silva *et al.*, 1997) (Figura 1.1).

## 1.2. Transmissão

O modo de transmissão do PLYV na natureza ainda não é conhecido. Loreto *et al.* (1983) não constataram a transmissão por sementes. Carmarço *et al.* (1998) detectaram a presença desse vírus no tegumento das sementes de mamão. No entanto, plantas oriundas dessas sementes permaneceram sadias. Os autores concluíram que essa fonte de vírus pode ser uma importante forma de disseminação do PLYV.

Levantamentos, conduzidos em pomares de diferentes municípios dos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, mostraram graus diferentes de incidência do vírus. O maior grau de incidência foi constatado nas amostras provenientes do Rio Grande do Norte, seguidos de alguns municípios do Ceará e ausência do vírus nas amostras coletadas no Piauí. Esses dados indicam que a possível rota de dispersão do PLYV deve seguir o sentido leste-oeste do nordeste brasileiro (Lima *et al.*, 1993).

O modo de disseminação da doença no pomar, caracterizado por uma maior incidência de plantas infectadas de fora para dentro da área de plantio, indica a dependência de um vetor, como já havia sido sugerido por Loreto *et al.* (1983). Kitajima *et al.* (1992b) realizaram ensaios de transmissão do vírus de maneira não circulativa não-persistente usando *Myzus persicae*. Da mesma forma, Silva (1996) estudou a transmissão do vírus usando besouros crisomelídeos, pertencentes às espécies *Diabrotica speciosa* e *D. bivitula*. Porém, os resultados foram negativos em ambos os trabalhos.



**Figura 1.1:** (A) Sintomas do mosaico em folha de mamoeiro infectada com o *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV). (B) Fruto de mamoeiro infectado com PLYV exibindo manchas circulares amarelas na casca. (C) Planta de mamão infectada com o PLYV, mostrando um mosqueado sistêmico e distorções foliares do tipo cordão de sapato (esquerda), comparada com uma planta de mamoeiro sadia (direita) (Silva, 1996).

Camarço *et al.* (1998) estudaram a presença do PLYV no solo da rizosfera das plantas infectadas. Em seus experimentos, os autores cultivaram plantas de mamão sadias neste solo e depois de 20 dias, as plantas mostraram-se infectadas de acordo com a avaliação conduzida por sintomatologia ou por ELISA. Da mesma forma, a possibilidade de transmissão do PLYV através da água proveniente de rega foi testada. Neste caso, a água usada na rega de plantas infectadas foi coletada e avaliada para a presença do PLYV por ELISA. Simultaneamente, a água de rega foi inoculada mecanicamente em planta de mamão sadia e os resultados também confirmaram a presença do PLYV nesta possível fonte de inóculo. Os autores concluíram que esta pode ser uma importante fonte de disseminação dentro do pomar.

### **1.3. Círculo de hospedeiras**

O PLYV apresenta um círculo de hospedeiras restrito, no qual apenas plantas de mamoeiro 'Solo' ou comum se infectam com o vírus. Este dado foi obtido por inoculação mecânica de extratos de plantas de mamão infectados com o PLYV em plantas-teste (Lima *et al.*, 1994), ou por enxertia de pedaços de pecíolos ou nervuras de plantas doentes (Kitajima *et al.*, 1992a).

Silva (1996) objetivando encontrar fontes de resistência a esse vírus, em materiais provenientes do banco de germoplasma de *Carica papaya* L. do Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura-CNPMP/ Embrapa, avaliou dez genótipos distintos de mamão e todos mostraram-se susceptíveis à infecção pelo PLYV.

### **1.4. Morfologia da partícula viral**

Exames de preparações do tipo "leaf dip", vistas ao microscópio eletrônico de transmissão, demonstraram ser esse vírus formado de partículas isométricas, em torno de 30 nm, presentes em grandes quantidades nas amostras de mamão (Kitajima *et al.*, 1992b). Essas partículas apresentaram-se isoladas ou agrupadas nessas preparações.

O isolado usado por Kitajima *et al.* (1992b) foi purificado por Silva (1996), utilizando tampão fosfato de sódio pH 8.0 ou tampão acetato de sódio pH 5.0. Nessas condições, observou-se que as partículas do PLYV eram sensíveis às condições de pH alcalino (pH 8.0), mostrando-se deformadas. Nas extrações efetuadas em condições de pH ácido (pH 5.0), as partículas permaneceram intactas.

### **1.5. Citopatologia**

Sob o ponto de vista citopatológico, observações ultraestruturais de material infectado com o PLYV mostraram que esse vírus acumula-se no citoplasma e/ou no vacúolo das células, não sendo vistos em outras organelas celulares, tais como núcleo, mitocôndrias e cloroplastos, as quais, aparentemente, não mostraram sinais de degeneração (Silva, 1996). Da mesma forma, a presença de partículas virais nos plasmodesmas ainda não foi relatada.

Nas células infectadas com o PLYV é comum observar-se a formação de inclusões cristalinas no citoplasma e/ou no vacúolo das células. Além disso, é marcante a ocorrência de massas de material amorfo, finamente granular e denso, às vezes adotando contorno oval a elíptico de 1-3  $\mu$ m no maior diâmetro, no citoplasma de células do parênquima. Numa mesma célula, a presença de várias massas, apresentando-se uniformemente densas e com aspecto vacuolizado, também foi observada por Silva (1996). Apesar de não apresentarem um envoltório membranoso, a associação da periferia das massas com elementos do retículo endoplasmático granular, na porção ausente de ribossomos, também foi relatada (Silva, 1996). A presença de vírions no interior das inclusões ou nas suas adjacências foi sugerida por Silva (1996) como um fator indicativo de que essas inclusões amorfas podem ser o viroplasma.

### **1.6. Relacionamento sorológico**

Para se estabelecer o relacionamento sorológico entre o PLYV e outros vírus pertencentes a diversos gêneros de vírus, vários autores testaram extratos de mamão infectados com o PLYV contra o anti-soro policlonal preparado para reconhecer a proteína do capsídeo de espécies

pertencentes aos gêneros *Tymovirus*, *Comovirus*, *Bromovirus*, *Sobemovirus*, *Cucumovirus*, *Nepovirus*, *Necrovirus*, *Potyvirus*, *Carmovirus* e *Tombusvirus* [Oliveira *et al.*, (1989); Lima & Santos (1991); Lima *et al.*, (1994); Kitajima *et al.*, (1992b); Silva, (1996)]. Os dados obtidos por esses autores mostraram que o PLYV parece não apresentar a proteína do capsídeo sorologicamente relacionada com nenhuma das espécies testadas. No entanto, Vega & Rezende (1993) relataram a existência de relação sorológica entre o PLYV e o *Cucumber mosaic virus* (CMV). Segundos os autores, utilizando-se a técnica de MEIAD foi possível capturar partículas não só nas relações homólogas, como também houve uma significativa captura do PLYV com o AS-CMV, bem como decoraçao positiva do PLYV com o mesmo anti-soro. Resultados semelhantes, também foram obtidos por PTA-ELISA, que se mostrou sensível nas reações homólogas e quando usou-se AS-CMV para detectar o PLYV. No entanto, esse relacionamento não foi confirmado por outros autores.

### 1.7. Características moleculares do PLYV

A proteína capsidial do PLYV é formada por uma subunidade protéica com tamanho aproximado de 36 kDa (Oliveira *et al.*, 1989). Silva (1996) também comparou o perfil eletroforético dessa proteína com o das proteínas provenientes de extratos brutos de plantas infectadas em SDS-PAGE. Nesse último, nenhuma banda de tamanho definido pôde ser observada e apenas prováveis produtos de degradação inferiores a 36 kDa puderam ser notados. A origem dessa degradação é desconhecida, porém fator tal como, a presença de protease, induzida pelo vírus ou pelo hospedeiro em resposta à interação patógeno-hospedeiro, provavelmente deve ser produzida pelas plantas infectadas. Essa pode ser uma possível causa da degradação observada em gel de poliacrilamida 12 %.

Trabalhos preliminares de caracterização do PLYV investigaram a natureza do genoma viral (Elliot W. Kitajima, *comunicação pessoal*). Após a purificação do material genético do vírus, este foi incubado na presença de tampão contendo DNase e RNase. A análise da digestão

em gel de agarose 1 % indicou que na presença de DNase, o material genético viral permaneceu intacto e apenas um segmento genômico foi observado. No entanto, na presença de tampão contendo RNase as amostras do PLYV degradavam-se. Esta foi a primeira indicação de que o PLYV era possivelmente formado de RNA composto de fita simples ou dupla. Posteriormente, Oliveira *et al.* (1989) e Silva *et al.* (1997) analisaram o perfil eletroforético desse RNA viral, em gel de agarose a 1 %, e estimaram o seu tamanho em 4,8 kb aproximadamente.

Características tais como: o tamanho do RNA genômico e o número de segmentos genômicos entre os vírus que infectam plantas (Murphy, 1995) e o PLYV foram comparadas e indicaram ser o PLYV um vírus de RNA fita simples. Isto foi atribuído, principalmente, ao fato de o PLYV apresentar apenas um segmento genômico e o tamanho do RNA ser menor que o dos vírus que apresentam RNA de fita dupla como material genético.

Silva *et al.* (1997) também relataram a presença de um possível RNA subgenômico de aproximadamente 0,9 kb. Possíveis formas replicativas desses RNAs, estimadas em 4,8 Kbp e 1,0 Kbp, respectivamente, podem ser facilmente detectadas por eletroforese, a partir da extração de dsRNA, e são muito úteis na caracterização do PLYV de acordo com Silva *et al.* (1997).

Para os estudos de caracterização do material genético do PLYV, Silva (1996) fez várias tentativas de clonagem do cDNA viral obtido após transcrição reversa do RNA viral, porém não obteve-se sucesso. Por isso, optou-se pelo seqüenciamento de peptídeos que compõem a proteína do capsídeo do PLYV, como uma ferramenta alternativa na caracterização do PLYV. Primeiramente, uma provável seqüência de aminoácidos (P1: MAPVGVARAV) da extremidade amino terminal da proteína capsidial foi obtida após redução e S-piridiletilação (Hawke & Yuan, 1987; Wilson & Yuan, 1989) da preparação purificada. Em seguida, seqüências de peptídeos internos (P2: TVGTWL; P3: ATPTVTVDNCMP e P4: GVAVIWSKQT) também foram obtidas após digestão da mesma preparação viral com tripsina.

### 1.8. Posicionamento taxonômico do PLYV

Silva *et al.* (1997) reuniram todas as características biológicas e moleculares, disponíveis naquele momento e sugeriram a inclusão do PLYV como uma possível espécie da família *Tombusviridae*. Dentre as características biológicas comuns consideradas na ocasião, pode-se citar: a sintomatologia, os efeitos citopáticos e a ausência de relacionamento sorológico entre as espécies. E, dentre as moleculares, o tamanho da partícula, o tamanho do RNA genômico e subgenômico, o tamanho da proteína capsidial, a provável ausência de poli(A) na extremidade 3', a homologia dos peptídeos da proteína capsidial (P1, P2, P3 e P4) seqüenciados e a localização dos mesmos em regiões conservadas para as diversas espécies pertencentes ao gênero *Tombusvirus* e *Carmovirus* foram usadas para propor o posicionamento taxonômico do PLYV dentro dessa família.

Baseado na análise de homologia dos aminoácidos dos peptídeos P1, P2, P3 e P4 foi possível indicar um relacionamento mais próximo do PLYV com a espécie-tipo do gênero *Tombusvirus* (*Tomato bushy stunt virus*-TBSV), em virtude dos maiores índices de similaridade (P1: 80,0 %, P2: 83,3 %, P3: 58,3 % e P4: 66,6 %) e identidade (P1: 60,0 %, P2: 33,3 %, P3: 25,0 % e P4: 33,3 %) que esses peptídeos que compõem a proteína do capsídeo do PLYV apresentaram com essa espécie-tipo. Quando a comparação foi feita com a espécie-tipo do gênero *Carmovirus* (*Carnation mottle virus*-CarMV) valores de similaridade (P1: 50,0 %, P2: 62,5 %, P3: 50,0 % e P4: 40,0 %) e de identidade (P1: 40,0 %, P2: 37,5 %, P3: 16,6 % e P4: 30,0 %) menores foram obtidos. Porém, esse estudo incluiu a comparação de apenas duas espécies-tipo dos gêneros *Tombusvirus* e *Carmovirus*, pertencentes à família *Tombusviridae*, consideradas naquele momento como mais próximas ao PLYV (Silva *et al.*, 1997).

Um outro aspecto considerado para sugerir o relacionamento mais próximo do PLYV com o gênero *Tombusvirus* foi o alinhamento dos peptídeos seqüenciados da proteína capsidial do PLYV, dentro de regiões específicas denominadas de “braço” e “capa”, presentes nas seqüências



da proteína do capsídeo de alguns membros dos gêneros *Tombusvirus* e *Carmovirus*. Esses domínios são considerados os mais conservados dentro da proteína do capsídeo dos membros pertencentes a esses dois gêneros (Riviere *et al.*, 1989). A utilização da proteína do capsídeo na classificação de espécies pertencentes a esses dois gêneros é sustentada por dado de literatura, que revela que a proteína do capsídeo parece ser a menos conservada entre as proteínas codificadas pelos tombusvírus (apresentando índices de identidade de aminoácidos variando de 42-48%), comparada com a homologia de seqüência de aminoácidos apresentada pela RNA polimerase dependente de RNA (RpRd), onde valores em torno de 96% de identidade podem ser encontrados (Tavazza *et al.*, 1994).

Os carmovírus e tombusvírus também apresentam características comuns (Tabela 1.1) com outros gêneros de vírus isométricos que infectam plantas, tais como: os *Necrovirus*, *Dianthovirus* e *Machlomovirus*, atualmente reconhecidos como gêneros pertencentes à família *Tombusviridae* (Pringle, 1998). Além desses gêneros, outros não incluídos nesta família, tais como: os *Sobemovirus* e *Polerovirus* (sendo que, este último inclui espécies pertencentes ao subgrupo 2 dos luteovírus) também apresentam características similares ao PLYV (Tabela 1.1). Essa situação dificultou a classificação definitiva do PLYV baseado nas características usadas por Silva *et al.* (1997).

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) considera que, para a separação de espécies de vírus, não só as características biológicas, mas também as moleculares (tamanho da proteína capsidial, elucidação da organização genômica, tamanho e número dos RNAs subgenômicos, homologia na seqüência de nucleotídeos e aminoácidos dos genes virais e caracterização da estratégia de expressão gênica) devem ser consideradas para a definição taxonômica de novas espécies (Pringle, 1998). Dessa maneira, a definição de parâmetros moleculares considerados confiáveis pelo ICTV torna-se ainda mais importante, principalmente nos casos em que as características biológicas e mesmo algumas características moleculares são

**Tabela 1.1.** Características biológicas e moleculares de alguns gêneros de vírus de plantas que assemelham-se ao PLYV (Martelli & Russo, 1995; Morozov & Solvyev, 1999; Silva *et al.*, 1997).

CARACTERÍSTICAS GERAIS	TOMBUSVIRUS CARMOVÍRUS	SOBEMOVIRUS	NECROVIRUS	POLEROVÍRUS	MACHLOMOVÍRUS	ENAMOVÍRUS	PLYV
Tam. RNA genômico (RNAg) aprox.	3,7-5,0	4,0-5,0 Kb	3,8 kb	5,6 kb	4,4 kb	5,7 kb	4,8 kb
Partícula isométrica	30 nm	30nm	28nm	25-30nm	30 nm	25-28 nm	30 nm
Sintomas	mosqueado, encarquilhamento, deformação foliar e em algumas hospedeiras podem ser assintomáticas	mosaico e mosqueado	necrose nas raízes	necrose nos elementos crivados	mosaico suave	mosaico Enação	mosaico mosqueado deformação foliar
RNA subgenômico (RNAsg)	tombusvírus: (1) 2,1 kb (2) 0,9 kb e carmovírus: (1) 1,7 kb (2) 1,45 kb	1,0 Kb	1,6 e 1,3 kb	3,0 kb	1,1 kb	aprox. 1,6 kb	provável RNA sg de aprox. 0,9 kb
Característica da extremidade 3'	não contém poli (A) ou estrutura do tipo tRNA	não contém poli (A) ou estrutura do tipo tRNA	não contém cauda poli (A)	não contém cauda poli (A)	não contém cauda poli(A)	VPg	provavelmente não possui cauda poli(A)
Características da extremidade 5'	não contém proteína associada nem "cap"	VPg associada e essencial à infectividade	não contém proteína associada nem "cap"	VPg	possuem "cap"	VPg	provavelmente Possui VPg

CARACTERÍSTICAS GERAIS	TOMBUSVIRUS CARMOVÍRUS	SOBEMOVÍRUS	NECROVIRUS	POLEROVIRUS	MACHLOMOVÍRUS	ENAMOVÍRUS	PLYV
Distribuição geográfica	restrita a regiões temperadas, mas os carmovírus são encontrados em regiões tropicais	todo o mundo	regiões de clima temperado	varia entre largamente distribuídos a restritos	Argentina, Peru México e Estados Unidos	ND	restrito ao Brasil RN, PE, PB, CE e BA
Efeitos citopáticos	tombusvírus: associação de partículas com o núcleo e presença de corpos multivesiculares carmovírus: partículas no núcleo ausentes	víriões no núcleo e citoplasma e formação de arranjos cristalinos	agregado cristalino e material amorfo eletrodenso	presença de víriões nos tecidos do floema	ND	encontrados no floema e nas células do mesófilo	víriões Localizam-se no citoplasma isolados ou formando agregados cristalinos Inclusões amorfas no citoplasma
Proteína do Capsídeo (aprox.)	tombusvírus: 41 kDa carmovírus: 36-40 kD	30 kDa	30 kDa	23 kDa	25 kDa	21 kDa	36 kDa
Famílias e/ou gêneros com características similares	Gênero <i>Dianthovirus</i> Gênero <i>Necrovirus</i> Gênero <i>Machlomovirus</i>	Gênero <i>Necrovirus</i> Família <i>Tombusviridae</i>	Família <i>Tombusviridae</i> Gênero <i>Sobemovirus</i> , <i>diantho-</i> e <i>machlomovirus</i>	Gênero <i>Sobemovirus</i> , <i>carmo-</i> e <i>enamovirus</i>	Família <i>Tombusviridae</i> , Gêneros <i>Luteovirus</i> e <i>Necrovirus</i>	Gênero <i>Sobemovirus</i> e <i>Polerovirus</i>	Gênero <i>Sobemovirus</i> , <i>Tombusvirus</i> , <i>Carmovirus</i> <i>Luteovirus</i>
Características diferenciais entre gêneros	tamanho da proteína capsidial e do RNAG organização genômica Tamanho do RNAsg	organização genômica transmissão por besouro	organização genômica e vírus satélite sempre presente	organização genômica	hospedeira organização genômica	organização genômica RNAsg expressa 2 proteínas	círculo de hospedeiras restrito (mamoeiro), organização genômica

<b>CARACTERÍSTICAS GERAIS</b>	<b>TOMBUSVIRUS CARMOVÍRUS</b>	<b>SOBEMOVIRUS</b>	<b>NECROVÍRUS</b>	<b>POLEROVÍRUS</b>	<b>MACHLOMOVÍRUS</b>	<b>ENAMOVÍRUS</b>	<b>PLYV</b>
Relacionamento Sorológico	Tombusvírus: variado carmovírus: ausente	existente entre estirpes e algumas espécies	presente entre as estirpes	formam agrupamentos sorológicos entre espécies	presente entre variantes	presente entre isolados transmitidos por afídeos	existente com o SBMV

semelhantes entre as diversas espécies de vírus, como ocorre entre o PLYV e outros vírus isométricos mencionados acima (**Tabela 1.1**).

Dessa forma, comparando-se as características biológicas e moleculares apresentadas pelos vírus pertencentes aos gêneros *Tombusvirus*, *Carmovirus*, *Necrovirus*, *Dianthovirus*, *Machlomovirus*, *Polerovirus* e *Sobemovirus* (**Tabela 1.1**), com os dados citopatológicos e de seqüenciamento parcial do genoma do PLYV, determinados no presente trabalho, constatou-se que este está mais relacionado às espécies pertencentes ao gênero *Sobemovirus*. Deste modo, visando fornecer maiores subsídios, para a discussão comparativa dos resultados obtidos nesse trabalho, a seguir são apresentadas as principais características dos sobemovírus.

#### **Características gerais do gênero *Sobemovirus***

Os sobemovírus são vírus de plantas nomeados como tal devido à denominação da sua espécie-tipo: *Southern bean mosaic virus* (SBMV). Foram reconhecidos pelo ICTV, primeiramente, como grupo (Matthews, 1982) e, posteriormente, como gênero por Hull (1995). Atualmente, o gênero é formado por 11 espécies já definidas e 3 espécies propostas (**Tabela 1.2**) (Tamm & Truve, 2000). Recentemente, um novo agrupamento, baseado em estudos comparativos das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos que compõem o genoma desses vírus (como por exemplo, o gene da RNA polimerase dependente de RNA-RpRd) foi proposto por Morozov & Solovyev, (1999). Esse novo agrupamento sugere que os sobemovírus devem ser colocados em um supergrupo que inclua os vírus do "tipo-sobemovírus" ("sobemo-like"), baseado em semelhanças na organização genômica desses vírus.

Os "sobemo-like" incluem os vírus de planta cujo genoma codifica uma VPg, uma proteína de ligação à extremidade 5' dos RNAs virais. Apesar de codificarem uma poliproteína, com domínios apresentados na ordem de localização no genoma 'protease-VPg-RpRd', dentro de uma única "open reading frame" (ORF), o seu genoma não codifica uma helicase (Koonin & Dolja,

**Tabela 1.2.** Espécies de vírus do gênero *Sobemovirus* com suas respectivas hospedeiras naturais e formas de transmissão na natureza (Tamm & Truve, 2000).

ESPÉCIES DE VÍRUS	HOSPEDEIRAS NATURAIS	TRANS. VETORES	TRANS. SEM.	SIGLAS
<i>Blueberry shoestring virus</i> <sup>1</sup>	<i>Vaccinium orymbosum</i> <i>V. angustifolium</i>	Afideo	Não	SSBV
<i>Cooksfoot mottle virus</i> <sup>1</sup>	<i>Dactylis glomerata</i> <i>Triticum aestivum</i>	besouro	Não	CfMV
<i>Lucerne transient streak virus</i> <sup>1</sup>	<i>Medicago sativa</i>	ND	Não	LTSV
<i>Rice yellow mottle virus</i> <sup>1</sup>	<i>Oryza sativa</i> <i>O. longistaminata</i>	besouro	Não	RYMV
<i>Solanum nodiflorum mottle virus</i> <sup>1</sup>	<i>Solanum nodiflorum</i> <i>S. nitidibaccatum</i> <i>S. nigrum</i>	besouro	Não	SNMoV
<i>Southern bean mosaic virus</i> <sup>1</sup>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	besouro	Sim	SBMV
<i>Southern cowpea mosaic virus</i> <sup>1</sup>	<i>Vigna unguiculata</i>	besouro	Sim	SCPMV
<i>Sowbane mosaic virus</i> <sup>1</sup>	<i>Chenopodium spp.</i> , <i>C. murale</i> , <i>Vitis sp.</i> <i>Prunus domestica</i> <i>Atriplex suberecta</i>	cigarrinha minador	Sim	SoMV
<i>Subterranean clover mottle virus</i> <sup>1</sup>	<i>Trifolium subterraneum</i>	ND	Sim	SCMoV
<i>Turnip rosette virus</i> <sup>1</sup>	<i>Brassica campestris subsp. napus e</i> <i>subsp. rapa</i>	besouro	ND	TRoV
<i>Velvet tobacco mottle virus</i> <sup>1</sup>	<i>Nicotiana velutina</i>	Mirideo	Não	VIMoV
<i>Cooksfoot mild mosaic virus</i> <sup>2</sup>	<i>Phleum pratense</i> , <i>D.</i> <i>glomerata</i> , <i>Agrostis stolonifera</i> , <i>Bromus mollis</i> , <i>Festuca pratensis</i> <i>Poa trivialis</i>	Afideos besouros	Não	CfMMV
<i>Cynosurus mottle virus</i> <sup>2</sup>	<i>Cynosurus cristatus</i> , <i>Lolium</i> <i>perenne</i> , <i>A. tenuis</i> <i>A. stolonifera</i>	afideos	ND	CnMoV
<i>Ginger chlorotic fleck virus</i> <sup>2</sup>	<i>Zingiber officinale</i>	ND	ND	GCFV

<sup>1</sup>Espécies de vírus definidas e espécies de vírus tentativas<sup>2</sup>. ND: Não Determinado

1993), o que os diferencia dos vírus do "tipo-picornavírus" ("picorna-like"). Esse novo agrupamento inclui os vírus que apresentam uma poliproteína, com os genes localizados diferentemente (VPg-protease-RpRd). Os "sobemo-like" incluem os vírus de planta isométricos destituídos de cauda poli(A), do gênero *Sobemovirus*, do gênero proposto *Polerovirus* (subgrupo 2 dos luteovírus) e também os vírus pertencentes ao gênero *Enamovirus* (Pringle, 1998). Caso essa nova proposição venha ser aceita pelo ICTV, o novo agrupamento reunirá 17 espécies definidas e 3 espécies propostas listadas para esses gêneros por van Regenmortel *et al.* (2000).

Na natureza, os sobemovírus são transmitidos por vetores, tais como besouros, afídeos, mirídeos, cigarrinhas e minadores (Tamm & Truve, 2000). O relacionamento dos sobemovírus com os seus vetores é do tipo circulativo-não-propagativo, com exceção do *Cynosurus mottle virus* (CnMoV), o qual é não-circulativo no seu afídeo vetor (*Rhopalosiphum padi*). Já o SBMV pode ser encontrado no trato intestinal, hemolinfa e no regurgitado do besouro vetor (*Ceratoma trifurcata*), o que torna possível a contaminação das partes bucais durante a regurgitação. Em contraste, o *Cooksfoot mottle virus* (CfMV) é excretado no material fecal do inseto vetor (*Lema melanopa*), sendo que a infecção pode iniciar através da deposição dessa fonte de contaminação nos sítios de alimentação (Seghal & White, 1989).

A outra fonte de infecção natural são as sementes. Essas podem carregar partículas virais no embrião ou no tegumento da semente, dependendo da espécie viral, com uma incidência variável (Seghal & White, 1989). Para o *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV), a transmissão pode variar de 3-10%, enquanto para o *Sowbane mosaic virus* (SoMV) a eficiência de transmissão é alta (83%).

Exudados das plantas infectadas, também têm sido relatados como uma fonte de infecção natural, pelo menos para o *Rice yellow mottle virus* (RYMV), o qual pode contaminar a água de irrigação. Da mesma forma, a sobrevivência do SBMV no solo e a possível transmissão via raiz, na ausência de um vetor, é mencionada na literatura (Seghal & White, 1989). O SBMV é

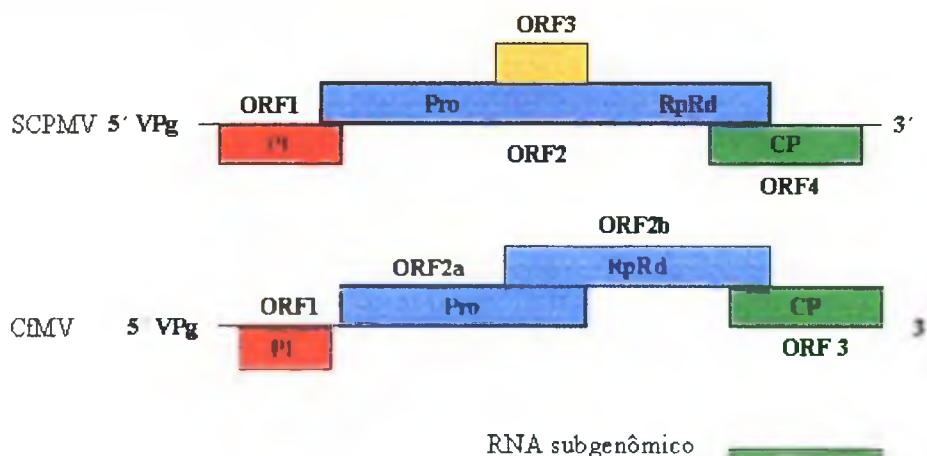
prontamente transmissível mecanicamente, em virtude da alta concentração e estabilidade das partículas.

De um modo geral, os sobemovírus infectam em torno de 15 famílias diferentes, incluindo espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas. Em particular, cada espécie de sobemovírus apresenta um círculo de hospedeira natural relativamente restrito, infectando poucas espécies dentro de uma ou duas famílias de plantas. Sintomatologicamente, os sobemovírus induzem um mosaico persistente, clorose ou mosqueado, freqüentemente acompanhado por uma deformação foliar e nanismo das plantas (Seghal & White, 1989), lesões necróticas e esterilidade. Surtos de infecção assintomática até sintomatologia severa e morte das plantas também podem ocorrer.

As plantas infectadas caracterizam-se por apresentar concentração de partículas relativamente altas. As partículas virais são encontradas predominantemente nos tecidos do mesófilo e nos tecidos vasculares, embora também tenham sido relatadas nas células epidermais, células guardas e da bainha vascular. Nos tecidos vasculares, a localização das partículas virais nas células do parênquima do xilema e nos vasos do xilema é bem característica. A presença de partículas nas células do parênquima floemático e elementos crivados parece ser apenas ocasional (Hartmann *et al.*, 1973; Opalka *et al.* 1998), com exceção do CfMV, que tem sido relatado nos tecidos vasculares do floema (Chamberlain & Catherall, 1976). Na célula, as partículas desses vírus têm sido detectadas no citoplasma e vacúolo, podendo formar arranjos cristalinos no citoplasma.

Os sobemovírus apresentam partículas isométricas em torno de 30 nm de diâmetro, sendo que os vírions contém uma única proteína do capsídeo em torno de 30 kDa, construída de 180 subunidades de acordo com a simetria T<sub>3</sub>. O RNA genômico varia entre 4 e 5 kb e a molécula de RNA subgenômico está em torno de 1 kb (Figura 1.2). A extremidade 5' do RNA tem uma proteína de ligação ao genoma (VPg) enquanto a extremidade 3' é destituída de cauda poli(A).





**Figura 1.2:** Representação esquemática da organização genômica do *Southern cowpea mosaic virus* (SCPMV) e do *Cocksfoot mottle virus* (CfMV), representantes do grupo do SCPMV e do CfMV, respectivamente. Esses vírus codificam uma proteína VPg de ligação à extremidade 5' e não possuem cauda poli(A) na extremidade 3'. O grupo dos SCPMVs caracteriza-se por apresentar uma poliproteína codificada por uma ORF contínua (ORF2). Essa ORF contém regiões codificadoras internas (ORF3), situada em uma fase de leitura -1 em relação a ORF2. Os CfMVs não apresentam a ORF2 contínua e nem a região codificadora representada pela ORF3 do grupo dos SCPMVs. A ORF2 dos CfMVs é representada por duas ORFs sobrepostas (ORF2a e 2b) sendo a poliproteína expressa através do mecanismo ribossomal "frameshift". A ORF4 (correspondente à ORF3 nos CfMVs) codifica a proteína do capsídeo (CP), expressa pelo RNA subgenômico de 1.0 kb. P1: proteína codificada pela ORF1. Pro: protease. RpRd: RNA polimerase dependente de RNA (Tamm & Truve, 2000).

Em adição ao RNA genômico, algumas espécies de sobemovírus encapsidam um RNA satélite (satRNA) com características de viróide (Tamm & Truve, 2000).

O genoma dos sobemovírus é compacto, apresentando, geralmente, quatro ORFs (Figura 1.2). Até o momento, todos os sobemovírus seqüenciados codificam uma pequena ORF, localizada na extremidade 5' (ORF1), que foi recentemente estudada para o RYMV-CI (Sivakumaran *et al.*, 1998) e para o *Southern cowpea mosaic virus*-SCPMV (Bonneau *et al.*, 1998). As proteínas codificadas pela ORF 1 dos diferentes sobemovírus não têm similaridade de seqüência significativa e embora deleções na região da ORF 1 afetem a replicação, a proteína da ORF1 não é essencial para a síntese de RNA. Essa proteína parece estar envolvida no movimento célula-a-célula e no movimento a longa distância (Mäkinen *et al.*, 1995a; Bonneau *et al.*, 1998; Sivakumaran *et al.*, 1998).

Imediatamente após a ORF 1, encontra-se a ORF2, que codifica uma poliproteína cujas evidências indicam que a sua tradução não ocorra a partir de um RNA subgenômico e sim a partir de um RNA genômico, que funciona como um RNA bicistrônico (Sivakumaran & Hacker, 1998). Internamente, diferenças organizacionais dentro dessa poliproteína permitem separar os sobemovírus em dois grupos: os SCPMVs e os CfMVs. O grupo dos SCPMV caracteriza-se por apresentar uma poliproteína codificada por uma ORF contínua (ORF2), contendo regiões codificadoras internas (ORF 3), situada em uma fase de leitura -1 em relação à ORF 2 (Sivakumaran *et al.*, 1998)(Figura 1.2). Esse mecanismo de tradução da ORF3 é conhecido como “frameshift ribossomal” e caracteriza-se por um deslocamento da subunidade ribossomal 40S para a posição -1 em relação à seqüência sinal UUUAAAC. Essa seqüência, indicadora de mudança de fase, apresenta-se seguida de uma estrutura do tipo grampo, resultante do pareamento de bases complementares, localizada antes do provável códon de iniciação potencial da ORF3. Apesar da ORF 3 ser codificada por todas as espécies do grupo dos SCPMVs [SCPMV (Wu *et al.*, 1987), SBMV-Ark (Lee & Anderson, 1998), RYMV-CI (Yassi *et al.*, 1994)

e o LTSV (Jeffries *et al.*, GenBank no. de acesso U31286)], sua função ainda é desconhecida (Sivakumaran *et al.*, 1998). Por outro lado, os isolados de CfMV (CfMV-NO e CfMV-RU) não apresentam a ORF2 contínua e nem a região codificadora representada pela ORF3 no grupo dos SCPMVs (Mäkinen *et al.*, 1995b; Rayabov *et al.*, 1996). Esses isolados apresentam duas ORFs sobrepostas (ORF2a e 2b) com a poliproteína sendo expressa através de mesmo mecanismo "frameshift ribossomal" -1 descrito anteriormente.

Apesar das espécies pertencentes ao grupo dos CfMVs não codificarem para a ORF3, análise de homologia entre seqüências nucleotídicas das poliproteínas dos dois grupos mostraram que a extremidade amino terminal da proteína codificada pela ORF2b é similar à da proteína P3 codificada pela ORF3 dos SCPMVs. O arranjo da extremidade 5' do genoma do CfMV, muito assemelha-se àquele mostrado pelos membros dos gêneros *Enamovirus* e do gênero *Polerovirus* pertencentes a família *Luteoviridae* (D'Arcy *et al.*, 2000).

A poliproteína apresenta no mínimo três domínios funcionais: um domínio do tipo serina-protease, um domínio da proteína VPg e um domínio RpRd. O motivo de serina-protease localiza-se na terceira porção da extremidade amino terminal da poliproteína, no caso das espécies SCPMV e SBMV, e é codificada pela ORF 2a no caso do CfMV. O tipo de protease desses vírus é único entre aquelas de vírus de planta, pelo fato de que ela se assemelha as serina-proteases celulares (Dougherty & Semler, 1993). A VPg é uma proteína de aproximadamente 12 kDa (Ghosh *et al.*, 1981), covalentemente ligada à extremidade 5' do genoma do SBMV ou de 10 kDa no caso do SCPMV (Mang *et al.*, 1982) Em todos os sobemovírus, uma seqüência de aminoácidos conservada triptofano-alanina-ácido aspártico (WAD) ou triptofano-glicina-ácido aspártico (WGD), seguida de regiões ricas em ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E), localizadas imediatamente antes, do sinal UUUAAAC para a mudança de fase, estão presentes nas seqüências de VPgs propostas ou estabelecidas, não só para os sobemovírus mas também para outros vírus dentro do supergrupo "sobemo-like" (*Mushroom bacilliform virus*-MBV,

*Potato leafroll virus*-PLRV e *Beet western yellows dwarf virus*-BWYV, van der Wilk *et al.*, 1997 e 1998). Esse motivo é a única seqüência conservada entre as proteínas VPgs desses vírus, o que leva a considerar que essa seja uma característica das proteínas VPgs dos vírus com arranjos genômicos do tipo sobemo- e polerovírus (Tamm & Truve, 2000). Por último, a extremidade carboxil da poliproteína dos sobemovírus é aceita como a região que codifica a RdRp, baseado no motivo GDD (glicina-ácido aspártico-ácido aspártico) e nas seqüências conservadas localizadas em torno desse peptídeo. Essa proteína tem sido extensivamente usada para avaliar a posição taxonômica de espécies de sobemovírus em relação a outras espécies de vírus de RNA de fita positiva. As similaridades presentes nessa proteína, comparada àquelas observadas em espécies de polerovírus (PLRV e BWYV-RPV), enamovírus (*Pea enation mosaic virus 1*) e barnavírus (MBV), indicam que a RdRp dos polerovírus está mais próxima dos sobemovírus do que dos luteovírus (Koonin & Dolja, 1993).

Por último, os sobemovírus codificam a proteína do capsídeo, através de uma seqüência representada pela ORF3 (CfMV) ou ORF4 (no caso do grupo SCPMV) localizada na extremidade 3' do genoma viral. A tradução da ORF que codifica a proteína do capsídeo requer a formação do RNA subgenômico, que é encapsidado, para a síntese dessa proteína (Tamm & Truve, 2000).

Para a tradução da proteína do capsídeo, não existe um consenso com relação à escolha da localização do AUG para a iniciação da tradução nem entre as espécies de sobemovírus nem mesmo entre as espécies pertencentes ao mesmo grupo dentro do gênero *Sobemovirus*. Para o SCPMV (Hermodson *et al.*, 1982), o sequenciamento de aminoácidos dessa proteína revelou que a iniciação da tradução da proteína do capsídeo ocorre no segundo AUG da ORF4, enquanto que para o RYMV-CI (Yassi *et al.*, 1994) e CfMV-NO (Mäkinen *et al.*, 1995a), a tradução da respectiva proteína ocorre no primeiro AUG da última ORF.

Estudos realizados por Sivakumaran *et al.* (1998) e por Brugidou *et al.* (1995) sugeriram o envolvimento da proteína do capsídeo com a disseminação do vírus nas plantas infectadas. Em seus experimentos clones de cDNA compreendendo ao genoma inteiro do RYMV-CI e do SCPMV apresentando diversas mutações (mutantes de RYMV-CI contendo deleção da extremidade carboxil-terminal e frameshift ribossomal e clones de SCPMV contendo inserções e códons de iniciação) não foram infecciosos em plantas. Nenhuma acumulação de vírus foi detectada nas folhas inoculadas ou sistêmicas, evidenciando que a proteína do capsídeo é essencial para o movimento célula-a-célula e sistêmico do vírus.

Estudos filogenéticos baseados na comparação de aminoácidos da proteína do capsídeo entre espécies de sobemovírus e de diversos outros vírus revelaram que, interessantemente, as proteínas do capsídeo do SCPMV e RYMV-CI se agruparam com a do *Tobacco necrosis virus* (TNV-A), membro da família *Tombusviridae*, ao contrário daquelas pertencentes aos polerovírus. Isto mostra que a CP dos sobemovírus e necrovírus estão filogeneticamente mais próximas, em contraste com os genes das proteases, VPgs e RpRd, os quais estão mais proximamente relacionados com aqueles dos polerovírus (Tamm & Truve, 2000).

Entre os elementos em *cis*, extensas estruturas do tipo “grampo” são encontradas nas extremidades 5' e 3' do genoma dos sobemovírus, as quais provavelmente atuam como sinais para o reconhecimento da replicase. A extremidade 5' do RNA subgenômico viral é encontrado nas vizinhanças ou mesmo dentro das estruturas do tipo “alças”, que têm sido relatadas para todos os sobemovírus seqüenciados. Assim, tem sido proposto que essa estrutura é um elemento essencial do promotor subgenômico (Tamm & Truve, 2000).

As características dos vírus isométricos mencionadas nessa introdução, especialmente aquelas dos sobemovírus, são comparadas com as apresentadas nesse capítulo para o PLYV. Assim, dados de citopatologia do PLYV observados por estudos ultraestruturais dos tecidos da folha e raiz infectados com o PLYV e, também, a detecção dos antígenos virais *in situ* por

imunocitoquímica são mostrados. Esses dados juntamente com os resultados moleculares do seqüenciamento de aproximadamente 70 % do genoma viral foram usados para comparar o PLYV com esses vírus isométricos. A provável organização genômica e a homologia entre as proteínas do PLYV e proteínas similares de outros vírus isométricos são discutidos.

### **3. Hipótese científica do trabalho**

A organização genômica do PLYV é similar a encontrada para membros do gênero *Sobemovirus*.

### **4. Objetivos do trabalho**

- 4.1. Seqüenciar o genoma completo do PLYV
- 4.2. Determinar a organização genômica do PLYV
- 4.3. Determinar a homologia dos genes virais com vírus que apresentam características similares
- 4.4. Comparar a citopatologia do PLYV com aquelas apresentadas por outros vírus isométricos de plantas
- 4.5. Determinar a posição taxonômica do PLYV

## MATERIAIS E MÉTODOS

**1.1. Obtenção e manutenção do isolado do PLYV:** O isolado caracterizado nesse trabalho foi encontrado durante inspeções de campo realizadas no Estado do Rio Grande do Norte, Vale do Açu. Nesta ocasião, amostras de plantas de mamoeiro 'Solo' exibindo sintomas de clorose, mosqueado e nanismo, foram coletadas e a identificação do agente causal foi feita através de sorologia e microscopia eletrônica (Kitajima *et al.*, 1992b). Esse isolado foi mantido em plantas de mamoeiro inoculadas mecanicamente com extratos do PLYV, diluídos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e sulfito de sódio 0,1 %. Utilizou-se celite como abrasivo e as plantas foram mantidas sob condições de casa-de-vegetação.

**1.2. Microscopia eletrônica de contrastação negativa.** Extrato bruto de folhas de mamão infectado com PLYV foi contrastado negativamente com acetato de uranila 1% para se observar partículas em suspensão (Kitajima, 1965).

**1.3. Estudos ultraestruturais.** Para a citopatologia, pequenos pedaços de folhas exibindo sintomas característicos do PLYV e raízes de plantas infectadas foram fixadas em 2,5 % glutaraldeído + 2,5 % paraformaldeído, preparados em 0,05 M de tampão cacodilato, pH 7,2. Após duas horas, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1 % no mesmo tampão por 1 hora, corado com 0,5 % de acetato de uranila, desidratado em acetona e embebido em meio Spurr de baixa viscosidade (Kitajima, 1965). Amostras similares de plântulas não inoculadas foram preparadas da mesma maneira para servir como controle. Os blocos foram seccionados em ultramicrótomo Reichert Ultracut equipado com faca de diamante Diatone e as secções coradas com acetato de uranila 3 % e citrato de chumbo de Reynold (Kitajima, 1965).

**1.4. Imunocitoquímica:** Para a detecção *in situ* do antígeno da proteína do capsídeo PLYV, tecidos de folhas e raízes de mamoeiro infectados com o PLYV foram fixados em uma solução de aldeído e emblocados em resina LRWhite. Secções foram montadas em grades de níquel cobertas com filme de Formvar e imunocoradas com anti-soro policlonal anti-PLYV produzido em coelho



(Silva *et al.*, 1997) seguindo-se o procedimento descrito por van Lent *et al.* (1990). O anti-soro foi diluído (1:1000) e o ouro coloidal conjugado com a proteína A (Sigma) 1:50 (Roth, 1983). Exames de microscopia eletrônica foram conduzidos em microscópio JEOL 100C ou Zeiss EM 900.

**1.5. Purificação do RNA viral:** Após a purificação do vírus, de acordo com o procedimento descrito para o *Carnarion ringspot virus* (Tremaine & Dodds, 1985) e modificado por Silva *et al.* (1997), o RNA viral foi extraído a partir de 200 µl de vírus purificado. Essa alíquota foi diluída em 300 µl de tampão de extração de RNA (200 ml de 0.2 M acetato de sódio, pH 5.2 e 100 µl de 1% SDS). À preparação de vírus purificado e diluído, adicionou-se igual quantidade de fenol, seguida de extrações com fenol / clorofórmio (1/1) como descrito por Ausubel *et al.* (1990). A precipitação do RNA foi feita com etanol absoluto e as lavagens após precipitação, com etanol 70 %. A análise do RNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1.0 % em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) e conduzida a 120 V.

**1.6. Relacionamento Sorológico:** Para o estudo do relacionamento sorológico entre o PLYV e as espécies-tipo SBMV e TBSV, primeiramente, procedeu-se uma eletroforese da proteína capsidial desses vírus em gel descontínuo SDS-PAGE (**anexo 1.5**), segundo Laemmli (1970). A amostra do vírus purificado (PLYV) foi preparada fazendo-se uma diluição de 1 µl do vírus purificado com 25 µl de água, aplicando-se no gel uma mistura de 4 µl dessa diluição com 6 µl de tampão de amostra. Para a extração da proteína total das plantas de mamoeiro sadias ou infectadas com o PLYV e de *Nicotiana benthamiana* sadia ou infectada com o TBSV, procedeu-se como descrito no **anexo 1.6** e 20 µl da amostra (10 µl da extração da proteína total e 10 µl do tampão de amostra) foram aplicados no gel de SDS-PAGE. Após a transferência dessas amostras para a membrana de nitrocelulose (**anexo 1.7**), as amostras foram tratadas com anti-soro

policlonal preparado contra a proteína capsidial do PLYV, TBSV e SBMV. A diluição usada foi de 1:1000.

**1.7. Produção dos cDNAs virais:** Uma vez obtido o RNA genômico do PLYV, este foi utilizado também como molde para a síntese das fitas complementares de DNA (cDNA). Essa etapa foi conduzida utilizando-se aproximadamente 1 µg do RNA purificado que foi misturado a 1 µl (1 µg) dos oligonucleotídeos randômicos ou degenerados (PLYV-8as). Esse cDNA, diferentemente de todos os outros produzidos no decorrer do trabalho, foi preparado para ser visualizado em gel de agarose 1 %. Para visualizá-lo, adotou-se uma metodologia que pudesse permitir o monitoramento da produção do cDNA. Assim, após a etapa de anelamento dos oligonucleotídeos com o RNA viral, a amostra foi dividida em duas partes iguais e foram utilizadas em duas estratégias distintas. Em uma delas, adicionou-se à amostra todos os dNTPs e na outra parte adicionou-se todos, menos o nucleotídeo CTP, que foi substituído pelo dCTP marcado com <sup>32</sup>P. Parte da amostra que continha o cDNA marcado radioativamente foi aplicada no gel para monitoramento do cDNA produzido e a eletroforese foi conduzida como citado anteriormente no **item 1.5**. Após a corrida, o gel foi exposto ao filme autoradiográfico. A outra parte da amostra seguiu para a clonagem do cDNA de fita dupla descrita abaixo. Essa estratégia originou o clone PLYV-3 (veja resultados para detalhes), cuja seqüência foi usada para a construção dos oligonucleotídeos PLYV-16as e PLYV-17s (**Tabela 1.3**). Como não foi possível, na época da execução dos experimentos, identificar a orientação da seqüência do PLYV-3, a denominação de senso e anti-senso para o PLYV-16as e PLYV-17s foi adotada arbitrariamente. Para os demais cDNAs produzidos, não procedeu-se tal monitoramento e aproximadamente 1 µg do RNA viral purificado foi misturado a 1 µl (1 µg) dos oligonucleotídeos randômicos, degenerado (PLYV-8as) ou específicos (PLYV-16as e o PLYV-17s). Dessa maneira, à mistura do RNA viral purificado com os oligonucleotídeos, adicionou-se água até um volume final de 12 µl que foi aquecida a 65 °C por 10 minutos e imediatamente resfriados no gelo. A essa mistura, adicionou-se 4 ml de

tampão de primeira fita (5X), 2 µl de DTT (100 mM), 1 µl dNTP (12.5 mM) (no caso do cDNA radioativo, adicionou-se 1.0 µl dos dNTPs sem citosina e 1µl do dCTP marcado com <sup>32</sup>P, nas mesmas concentrações mencionadas anteriormente) e 1 µl da enzima transcriptase reversa (SuperScript II). Essa reação foi incubada por 1 hora a 45 °C e imediatamente aquecida a 65 °C por 15 minutos. Após a condução da reação de primeira fita, à mistura adicionou-se 1 µl de RNase H (incubou-se por 2 minutos à temperatura ambiente), 1 µl de dNTPs (12.5 mM), 10 µl de tampão da DNA polimerase (10X), 1 µl de DNA polimerase I e 70 µl de água. Incubou-se por 4 horas a 15 °C seguido da inativação da DNA polimerase I a 65 °C por 15 minutos. Um µl de Klenow DNA polimerase foi adicionado à mistura e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, 1 µl de dNTPs 12.5 mM foi adicionado e novamente incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. O DNA de fita dupla foi purificado com o kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.

**1.8. Amplificação dos fragmentos do PLYV por PCR:** O RNA viral foi extraído como descrito anteriormente (item 1.5) e a transcrição reversa (RT-PCR, ver protocolo em anexo 1.8) foi feita utilizando-se aproximadamente 0,2 µg de RNA de vírus purificado e várias combinações de oligonucleotídeos. Nenhum dos oligonucleotídeos tinha posição de anelamento conhecida no genoma do PLYV, já que os mesmos eram específicos para o TBSV (TBSV 5' senso e TBSV-3' anti-senso; Tabela 1.3) ou eram degenerados (PLYV-6s, PLYV7as e PLYV-8as). Os oligonucleotídeos TBSV 5's e TBSV-3'as anelavam-se nas extremidades 5' e 3' do TBSV, respectivamente. Os oligonucleotídeos PLYV-6s e PLYV-7as foram desenhados baseado em regiões conservadas dentro da RNA polimerase de vírus relacionados com os carmovírus (Morozov *et al.*, 1995) e correspondiam aos oligonucleotídeos senso e anti-senso, respectivamente (Tabela 1.3). O oligonucleotídeo PLYV-8as (Tabela 1.3) foi sintetizado de

**Tabela 1.3.** Relação dos oligonucleotídeos usados nas reações de PCR e/ou cDNA.

NOME DO OLIGONUCLEOTÍDEO	REGIÃO DE ANELAMENTO	SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS
TBSV 5'senso	Extremidade 5' do RNA do TBSV	5' CCTAGTTCGTTT ATCTGGTGA3'
TBSV 3'anti-senso	Extremidade 3' do RNA do TBSV	5' CCGGTTGTCCG GTAGTGCTTCC3'
PLYV-6 senso	Regiões conservadas dentro da RNA polimerase de vírus relacionados com o carmovírus	5' GNNCTGCAGNA CNCANTCNTCNC NTTNTT 3'
PLYV-7as	Regiões conservadas dentro da RNA polimerase de vírus relacionados com o carmovírus	5' AANGTCGACCC GNNCCNNGNGTN ATNCAAC 3'
PLYV-8 anti-senso	Região conservada da proteína do capsídeo dos sobemovírus	5' CGNAGCCANGT NCCNACNGT 3'
PLYV-16as	Na seqüência do clone PLYV-3 obtido nesse trabalho	5' CAGCCATCAGA GACACC 3'
PLYV-17s	Na seqüência do clone PLYV-3 obtido nesse trabalho	5' CCTTAACTCCTG GCC 3'
PLYV-32s	Gene da provável polimerase do PLYV obtido nesse trabalho. Nucleotídeos 1793 a 1807	5' CCAGGACTGAT GAAG 3'
PLYV-33as	Gene da provável proteína do capsídeo do PLYV obtido nesse trabalho. Nucleotídeos 32 a 47	5' CCCTTCCCAAC AGTTG 3'

acordo com a seqüência de aminoácidos da proteína do capsídeo do PLYV (TVGTWLR) obtida por sequenciamento automático peptídeos da capa protéica do PLYV (Silva, 1996). Com o objetivo de amplificar-se novas regiões do genoma viral, novos oligonucleotídeos (PLYV-32s e PLYV-33-as) foram sintetizados baseados nas seqüências nucleotídicas consenso obtidas no decorrer desse trabalho. O oligonucleotídeo PLYV-32s, correspondeu aos nucleotídeos 1793 a 1807 de uma seqüência consenso representando a provável polimerase do PLYV e o PLYV-33as, correspondendo aos nucleotídeos 32 ao 47 da seqüência do fragmento correspondente à proteína do capsídeo do PLYV. Esses oligonucleotídeos foram usados em reações de PCR e suas respectivas regiões de anelamento encontram-se indicadas na **Tabela 1.3**. Os produtos obtidos via PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% e a eletroforese conduzida como citado anteriormente no **ítem 1.5**.

**1.9. Preparo do plasmídeo:** O plasmídeo usado para a clonagem de fragmentos obtidos via cDNA ou PCR foi o pUC 119 (New England Biolabs) digerido com *Sma* I. Após digestão do plasmídeo, procedeu-se uma purificação do fragmento digerido através de uma eletroforese em gel de agarose 0,5%. Após a corrida, o fragmento foi purificado do gel utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction Kit (QUIAGEN) e quantificado por eletroforese em gel de agarose 1 %.

**1.10. Clonagem dos produtos obtidos via PCR ou cDNA:** Após a produção do cDNA de fita dupla e RT-PCR do PLYV (**ítems 1.7 e 1.8**) procedeu-se a clonagem desses fragmentos no vetor pUC119. Para a clonagem dos produtos de PCR, após a amplificação, estes foram extraídos com fenol/clorofórmio (**anexo 1.9**) e usados nas reações de ligação (**anexo 1.11**) com o plasmídeo pUC119 (preparado como descrito no **ítem 1.9**). A clonagem do PCR nesse vetor foi proporcionada pelo fato da enzima Vent polimerase amplificar fragmentos com extremidades abruptas, que puderam ser ligados às extremidades do vetor, produzidas pela digestão com a enzima *Sma* I. A etapa de clonagem teve início com a ligação do fragmento (aproximadamente 200 ng) com cerca de 100 ng do vetor (**anexo 1.11**). Essa ligação foi utilizada para a

transformação das células de *Escherichia coli* (XL1-blue), preparadas com cloreto de rubídio (**anexo 1.1**) e transformadas por choque térmico. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB agar, contendo penicilina, e cultivadas a 37 °C por uma noite. As colônias transformantes foram selecionadas com base no gene marcador da  $\beta$ -galactosidase e aquelas brancas foram inoculadas em meio LB por mais uma noite a 37 °C. Dessas colônias, mini-preparações de DNA plasmidial (**anexo 1.3**) foram conduzidas e a verificação da clonagem do DNA viral e especificidade foram realizadas utilizando-se das enzimas de restrição *Hind* III e *Eco*R I. Os produtos da digestão enzimática dessa transformação foram visualizados em gel de agarose a 1% (Ausubel *et al.*, 1990).

**1.11. Hibridação:** Para verificar-se a especificidade dos clones obtidos como sendo do PLYV, a digestão do DNA plasmidial com *Hind* III e *Eco*R I foi analisada em agarose 1% e o DNA transferido por capilaridade para uma membrana de nylon, durante uma noite, na presença de tampão SSC 10X (3 M NaCl, 0,3 M citrato de sódio, pH 7,0). A fixação do DNA na membrana foi feita na presença de luz ultravioleta por 1 minuto e as membranas, seguiram a etapa de pré-hibridação em tampão 2X SSPE contendo 1 % de SDS, por quatro horas a 65°C. A sonda radioativa usada foi preparada em dois passos distintos: o primeiro, constituiu-se de uma desnaturação do RNA e concomitante anelamento dos oligonucleotídeos, através de uma mistura de 200 ng de RNA extraído de uma purificação viral (**item 1.5**) e 1  $\mu$ g dos oligonucleotídeos: específico (PLYV-8as) ou randômicos. Essa mistura foi aquecida a 95°C por 5 minutos e imediatamente resfriada no gelo. Na segunda etapa, à essa reação adicionou-se 4 $\mu$ l do tampão (5X) da primeira fita [2  $\mu$ l de DTT 100 mM, 1  $\mu$ l de dNTPs (12,5 mM, sem dCTP), 2  $\mu$ l de <sup>32</sup>P-dCTP, 1  $\mu$ l de transcriptase reversa SuperScript II, água a um volume total de 20  $\mu$ l] e aqueceu-se a 45 °C por uma hora. Essa sonda foi desnaturada por 5 minutos a 95°C e adicionada à membrana pré-hibridada, a qual permaneceu hibridando por uma noite nas mesmas condições. Depois desse

período, a membrana foi lavada por duas vezes em solução contendo SSPE 2X e 0,1 % de SDS durante 15 minutos cada lavagem. Após secagem, à temperatura ambiente, esta foi exposta ao filme autoradiográfico. Para o “northern blotting”, cerca de 1µg de RNA viral purificado foi aplicado no gel de agarose 1 % e após transferência para membrana de nylon e pré-hibridação como descrita acima, esta foi hibridada com uma sonda preparada contra o fragmento de DNA do PLYV-4, obtida via PCR. Essa sonda foi preparada usando-se 50 ng de DNA, 1,0 µl de oligonucleotídeos randômicos (1µg/µl), 2.5 µl de tampão da DNA polimerase Klenow, 2.5 µl dNTPs, 3.0 µl dCTP marcado com <sup>32</sup>P e 1 µl da enzima DNA polimerase klenow. A mistura foi incubada durante 12 horas à temperatura ambiente e aquecida a 95 °C antes da adição da mesma à membrana pré-hibridada (Sambrook *et al.*, 1989).

**1.12. Seqüenciamento dos produtos de amplificação do PLYV via cDNA ou PCR:** Após a verificação da identidade desses clones como sendo do PLYV, procedeu-se a maxi-preparação do DNA plasmidial dos mesmos (**anexo 1.4**) e estes foram enviados para o seqüenciamento automático ou no Laboratório de sequenciamento automático de DNA da Universidade de Kingston, Ontario (Queen’s University), Canadá ou no Centro Nacional de Recursos Genéticos-CENARGEN/Embrapa, Brasília-DF. Alguns desses clones também foram seqüenciados manualmente, a fim de se conferir a identidade viral, antes do envio para o laboratório de seqüenciamento automático. Ambos os procedimentos de seqüenciamento seguiram o princípio geral do método de terminação dideoxi em cadeia (Sanger & Coulson, 1975). Para o seqüenciamento manual, utilizou-se o kit Sequenase T7 DNA polimerase versão 2.0, de acordo com as recomendações do fabricante (USB). Após a purificação do DNA plasmidial das células de *E. coli* transformantes (usando-se métodos padrões de extração), o DNA molde foi anelado por um oligonucleotídeo sintético e a síntese do DNA conduzida em duas etapas. O primeiro passo consistiu na marcação do DNA usando-se dATP marcado com <sup>35</sup>S, DTT, tampões adequados e a DNA polimerase Sequenase. O segundo passo de terminação em cadeia foi

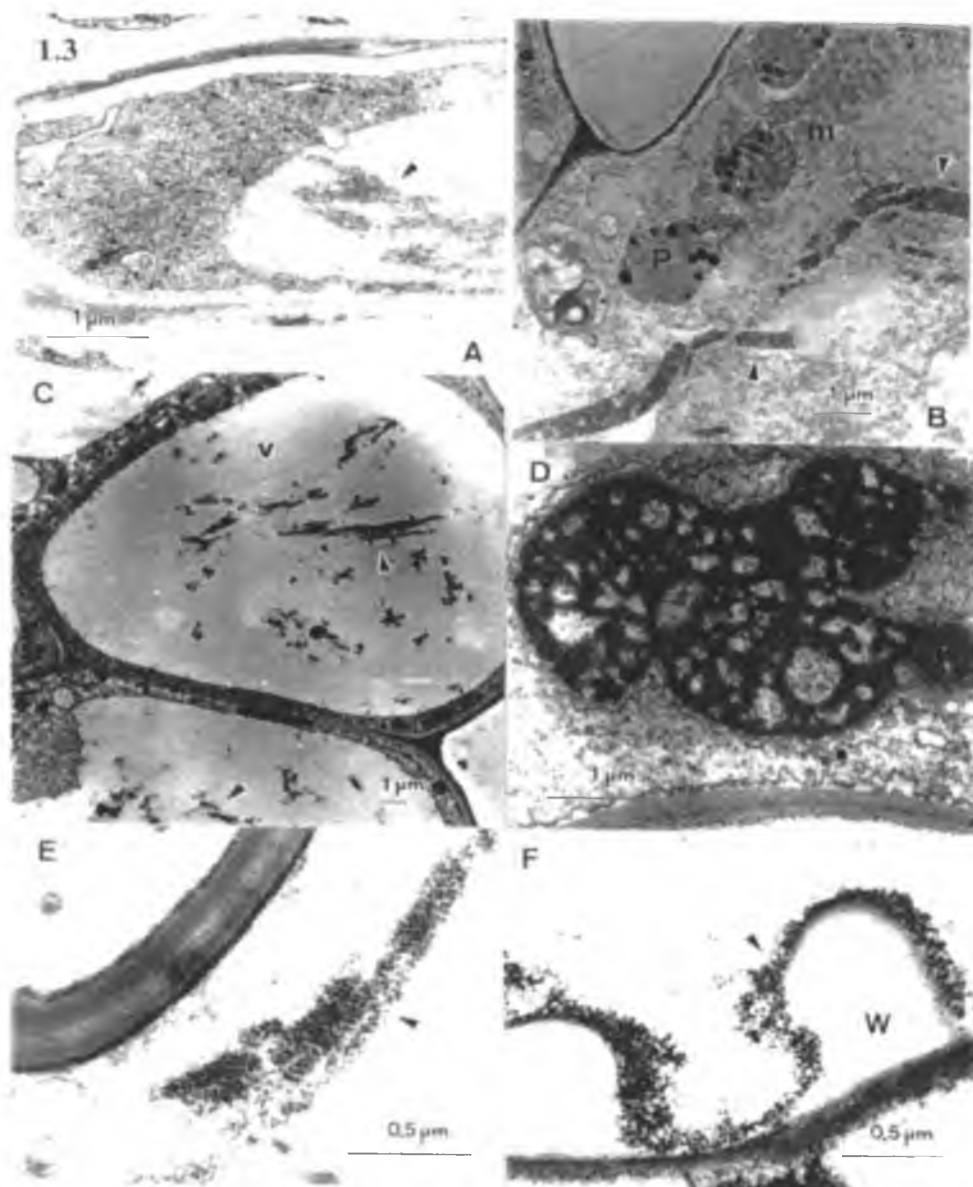
conduzido adicionando-se dideoxynucleotídeos, seguida da paralisação da reação com uma solução de EDTA e formamida. As reações, após desnaturação, foram aplicadas em gel de sequenciamento, e após a corrida foi exposto ao filme autorradiográfico. As seqüências obtidas por qualquer dos métodos foram analisadas usando-se o programa UWGCG (University of Wisconsin Genetic Computer Group). Dentro desse programa, os subprogramas utilizados foram: gelenter, gelassembly, gelmerge, gap, map e translate.



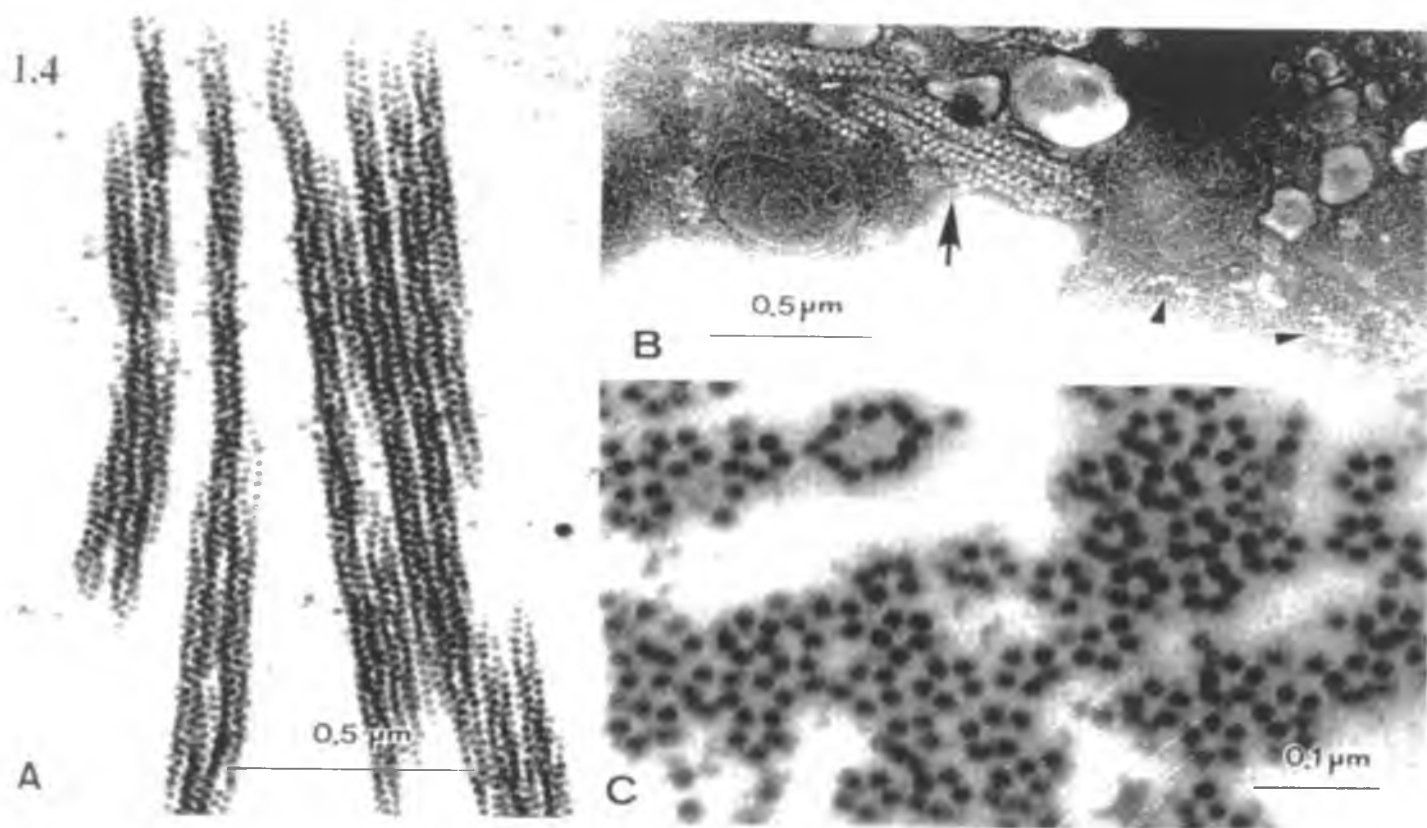
## RESULTADOS:

Como mencionado na introdução, Silva (1996) e Silva *et al.* (1997) elucidaram parcialmente as características da proteína capsidial e do RNA do PLYV, cujos resultados permitiram a comparação preliminar do PLYV com outros vírus isométricos. O presente trabalho é uma continuação do estudo sobre o PLYV (iniciado anteriormente durante o mestrado) e reuniu um volume significativamente maior de informações referentes a citopatologia e características moleculares do vírus e os principais resultados são apresentados a seguir.

**1.1 Citopatologia:** Partículas isométricas *ca.* 25 nm de diâmetro foram consistentemente encontradas em grande quantidade nas folhas e nos tecidos das raízes de plantas de mamão infectadas pelo PLYV. Essas partículas ocorreram independente do tipo de célula, incluindo células da bainha vascular, mesófilo e epiderme e se localizaram no citoplasma ou mais comumente no vacúolo central (**Figuras 1.3, 1.4**). Quando secções ultrafinas de folhas infectadas ou raízes foram imunomarcadas com ouro coloidal utilizando-se o anti-soro policlonal do PLYV, partículas de ouro foram especificamente localizadas sobre as partículas virais e associadas com inclusões do tipo viroplasma. As partículas estavam espalhadas no citoplasma ao acaso ou formando pequenos agregados (**Figuras 1.3A, B, E**). Tais partículas puderam ser facilmente distinguidas dos ribossomos devido ao perfil mais delgado. Ocasionalmente, massas densas, provavelmente representando os viroplasmas, foram também encontradas no citoplasma intercaladas com partículas do PLYV (**Figura 1.3D**). No vacúolo, parte das partículas virais apareceu espalhada ao acaso, porém mais comumente elas apareceram formando arranjos paralelos de estruturas tubulares com comprimento variável, algumas vezes com alguns micrômetros de comprimento (**Figuras 1.3C, 1.4A**). Nas secções transversais desses túbulos, vírions apareceram como sendo arranjos de maneira helicoidal consistindo de cinco partículas por volta (**Figura 1.4C**). Em contrastação negativa dos extratos brutos, esses agregados



**Figuras 1.3.** Micrografia eletrônica de transmissão de secções ultrafinas de tecido de planta de mamão infectadas com o *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV). (A). Célula cortical do ápice da raiz mostrando o citoplasma tomado por vírions, os quais também estavam presentes no vacúolo (seta). (B). Célula do parênquima esponjoso das áreas cloróticas da folha. Partículas do PLYV formam arranjos paracrystalinos no citoplasma (setas), (m) mitocôndrias. (C) Parênquima paliçádico foliar mostrando células com partículas virais formando arranjos tubulares (setas) no vacúolo. (D) Massas do tipo viroplasma vacuolizadas densas no citoplasma de uma célula do parênquima esponjoso foliar intercaladas com partículas de vírus. (E) Detalhe da célula da epiderme do ápice da raiz de mamão infectada com o PLYV. Agregados de vírions (seta) podem ser vistos no citoplasma. (F) Parede celular secundária (W) de um vaso do xilema em uma folha infectada pelo PLYV. Note as partículas virais (setas) aderidas na parede celular secundária (W) e espalhadas no lúmen. (P) plastídeo.



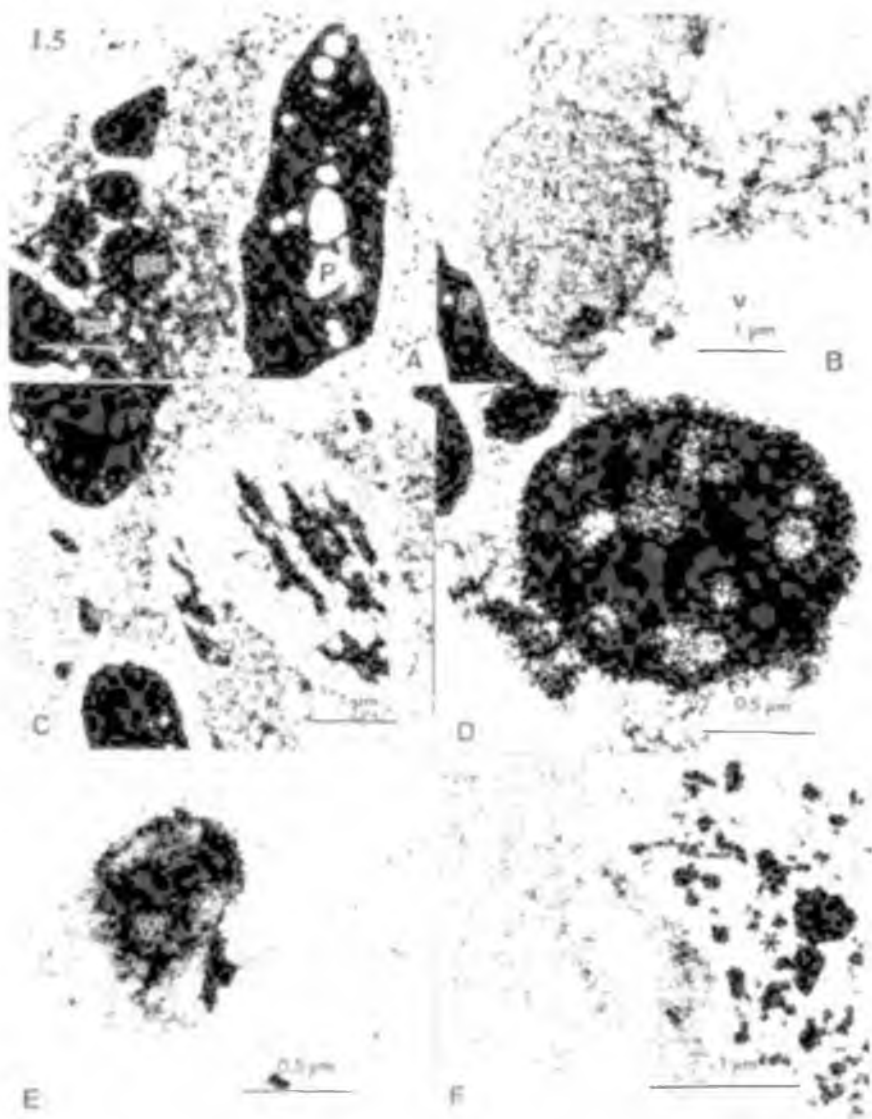
**Figura 1.4.** Detalhes do arranjo tubular das partículas do PLYV. (A) Secção longitudinal. Víriões exibem um arranjo helicoidal. (B) Contrastação negativa dos extratos foliares mostrando esses agregados tubulares das partículas do PLYV *in vitro* (seta). Víriões livres também podem ser vistos. (C) Secção transversal dos arranjos tubulares das partículas virais, mostrando claramente 5 partículas por volta na hélice.

tubulares de partículas do PLYV puderam ser observados, em adição aos vírions livres (**Figura 1.4B**). Vírions não puderam ser encontrados nos tubos crivados ou laticíferos mas eles estavam comumente presentes nos vasos do xilema ou aderidos na parede secundária ou nas suas vizinhanças (**Figura 1.3F**). Os cloroplastos das áreas cloróticas estavam freqüentemente alterados, com desorganização da lamela e acúmulo de gotículas de lipídeos (**Figura 1.3B**). Esses efeitos citopáticos não foram observados nas amostras utilizadas como controle (tecidos das plantas sadias de mamão). Nos tecidos das raízes, partículas de PLYV foram encontradas em todas as células epidérmicas e corticais (**Figura 1.3E**). Em algumas células epiteliais rompidas, agregados de vírions estavam ainda visíveis, algumas vezes apresentando minerais de argila aderidos na camada externa das raízes (**Figura 1.5E**).

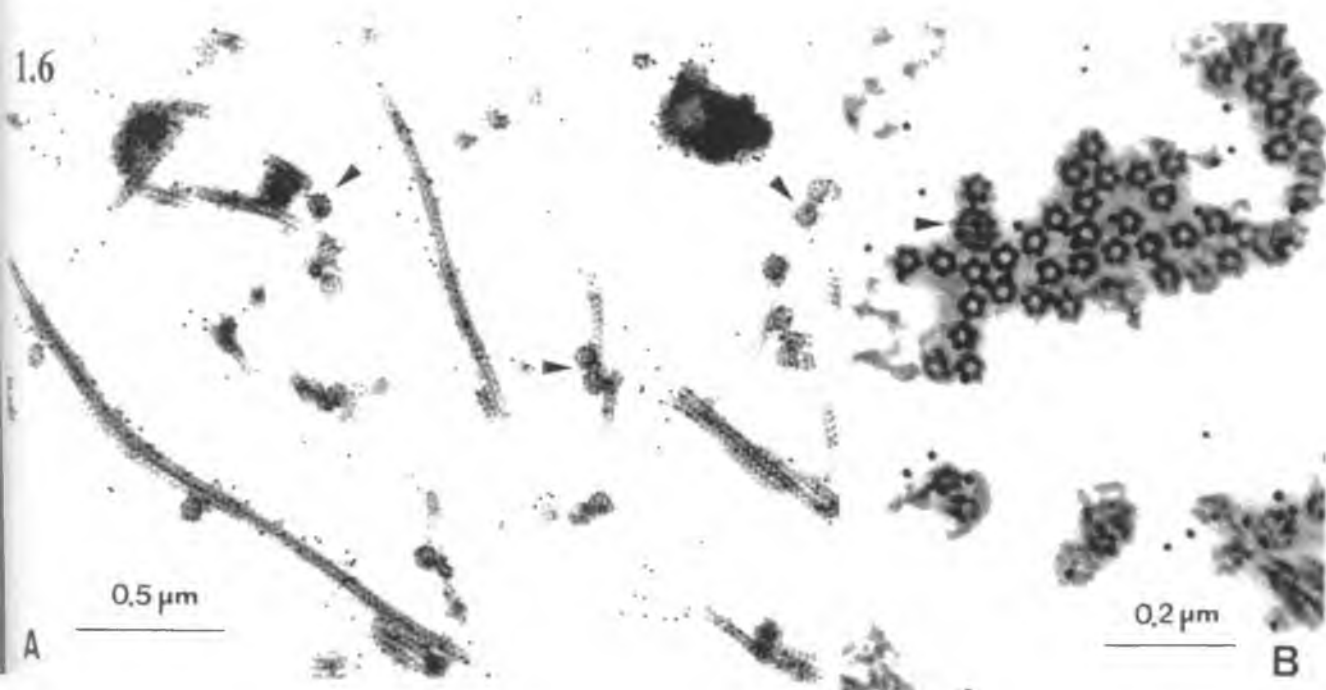
Essas partículas localizadas no citoplasma ou no vacúolo reagiram consistentemente com o anti-soro específico contra proteína do capsídeo do PLYV, como demonstrado por imunomarcção com ouro (**Figuras 1.5, 1.6**). As partículas presentes nos vasos do xilema reagiram com o anti-soro (**Figura 1.5E**), confirmando sua natureza viral. Estruturas do tipo viroplasma no citoplasma também reagiram positivamente como o anti-soro do PLYV (**Figura 1.5D**). Nenhuma imunomarcção com ouro coloidal específica pode ser observada em organelas tais como: núcleo, cloroplasto, mitocôndria, peroxissoma, complexo de golgi e parede celular.

## **1.2. Relacionamento sorológico entre o PLYV, SBMV e TBSV**

Após a eletroforese da proteína capsial do PLYV, esta foi testada com os anti-soros produzidos contra a proteína do capsídeo do PLYV, TBSV (previamente descrito como relacionado ao PLYV; Silva *et al.*, 1997) e SBMV por “western blotting”. Os resultados mostraram que o anti-soro produzido contra a proteína do capsídeo do PLYV reconheceu especificamente o seu homólogo, ou seja a proteína do capsídeo do PLYV usada como antígeno (**Figura 1.7A**). Porém, nenhuma reação sorológica foi observada quando a proteína do capsídeo do TBSV foi usada como antígeno ou quando o anti-soro contra a proteína do capsídeo do



**Figura 1.5.** Resultados dos experimentos de imunomarcção com ouro usando anti-soro contra o *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) nas secções dos tecidos infectados pelo PLYV. (A) Parte da célula do parênquima paliádico foliar . Partículas com ouro coloidal foram amplificadas com prata. Marcações são evidentes no citoplasma, mas não em outras organelas. P-cloroplasto; px-peroxissoma. (B) Parte da célula do parênquima esponjoso foliar. Marcação com ouro coloidal aparece no citoplasma e na massa das partículas de vírus no vacúolo (v), mas são ausentes no núcleo (N) e cloroplastos (P). (C) Similar a B, com marcação evidente no citoplasma e no grupo de arranjos tubulares das partículas do PLYV (setas) no vacúolo. m: mitocôndria. (D) Marcação na inclusão do tipo viroplasma. Note que as partículas de ouro aparecem distribuídas igualmente. (E) Parede da célula secundária (W) de um vaso do xilema na folha. Marcação é evidente nas partículas aderidas na parede celular. (F) Célula epitelial do ápice da raiz rompida. Massas de partículas virais marcadas aparecem intercaladas com mineral do tipo argila (\*) proveniente do solo aderido nas raízes.



**Figura 1.6.** Detalhes da marcação dos arranjos tubulares das partículas do PLYV em secções longitudinais (A) e transversais (B). Em ambas figuras arranjos polidrais de partículas virais, com 5 partículas no perímetro (setas).

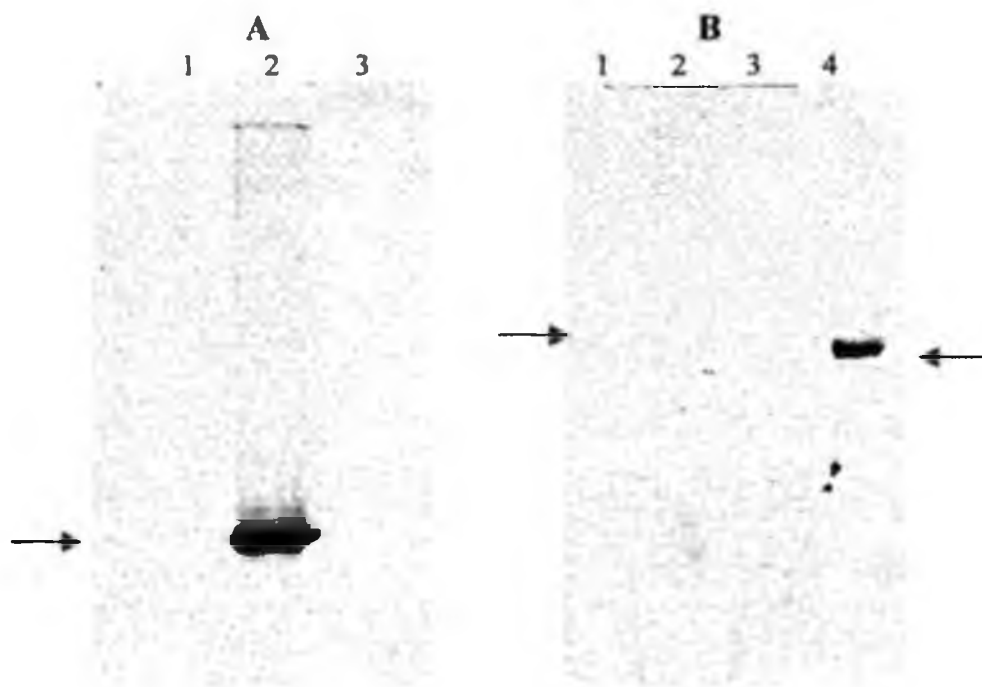
TBSV foi testado com o PLYV empregado como antígeno (dados não mostrados). Por outro lado, o anti-soro contra a proteína do capsídeo do SBMV reconheceu sorologicamente a proteína do capsídeo do PLYV (**Figura 1.7B**), tanto em extrato total de planta infectada com o PLYV, como na amostra da proteína originada do vírus purificado.

### **1.3. Fragmentos genômicos do PLYV obtidos via RT- PCR**

Utilizando-se a técnica de RT-PCR foi possível amplificar um fragmento estimado em 0,6 kb, resultante da utilização do par de oligonucleotídeo PLYV-6s e PLYV-8as (**Figura 1.8**; amostra 5 e **Figura 1.9**). Além desse fragmento, outros produtos de amplificação foram detectados no gel de agarose 1 % (**Figura 1.8**; amostra 1), quando os oligonucleotídeos TBSV 5's e o TBSV 3'as (**Figura 1.9**) foram usados. Outras combinações de oligonucleotídeos também foram testadas, porém os resultados foram negativos ou inespecíficos. Assim, os DNAs das amostras 1 e 5 foram purificados com fenol/clorofórmio e clonados em pUC119, no sítio para *Sma* I. Nessa etapa, 19 clones foram encontrados, de acordo com o padrão de restrição das enzimas *Eco*R I e *Hind* III (dados não mostrados). A especificidade desses clones como sendo do PLYV foi confirmada por "Southern blotting", utilizando-se como sonda o cDNA desse vírus produzido com dCTP marcado com <sup>32</sup>P (dados não mostrados). A amostra PLYV-4 do produto de PCR foi usada para se detectar a especificidade viral também por "northern blotting" (dados não mostrados). Diante da confirmação da origem viral desses fragmentos clonados em pUC119, alguns clones foram seqüenciados manualmente ou automaticamente e as análises das respectivas seqüências encontram-se descritas abaixo (**item 1.5**).

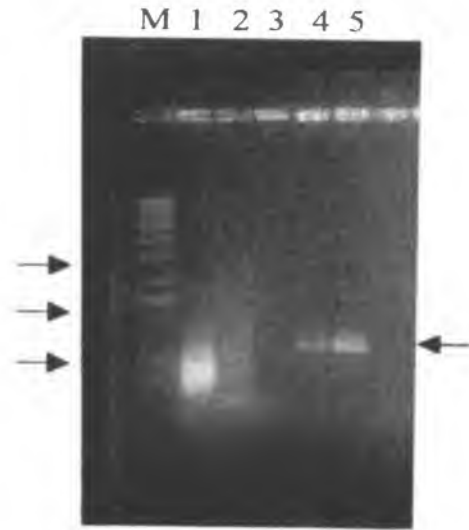
### **1.4. Produção de biblioteca de cDNA do PLYV**

Uma vez obtido o RNA genômico do vírus em estudo (PLYV), este foi também utilizado como molde para a síntese das fitas complementares de DNA (cDNA). Essa etapa foi conduzida através da transcriptase reversa e oligonucleotídeos randômicos ou específicos (PLYV-8as, PLYV-16as e PLYV-17s, **Figura 1.9**). Com essa estratégia, utilizando-se oligonucleotídeos

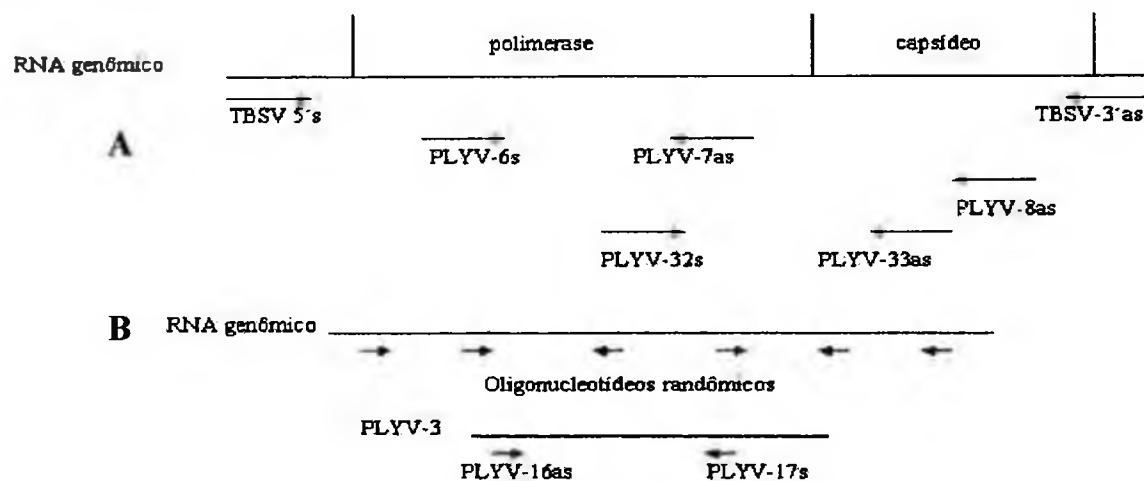


**Figura 1.7:** “Western blotting” da proteína capsidial do *Papaya lethal yellowing virus*. **(A)** Membrana de nitrocelulose tratada com anti-soro policlonal preparado contra a proteína capsidial do PLYV. Amostra 1: extrato de proteína total de mamoeiro sadio, a amostra 2: proteína capsidial do PLYV extraída da preparação do vírus purificado e a amostra 3: extrato de proteína total de *N. benthamiana* infectada com o *Tomato bushy stunt virus* (TBSV). **(B)** Membrana de nitrocelulose tratada com anti-soro policlonal preparado contra a proteína capsidial do *Southern bean mosaic virus* (SBMV). Amostras 1 e 3: extrato de proteína total de mamoeiro sadio, a amostra 2: extrato de proteína total de plantas de mamão infectada com o PLYV e a amostra 4: proteína do PLYV purificada de preparação do vírus purificado. As setas mostram a proteína capsidial do PLYV em torno de 36 kDa, que foi estimado de acordo com o padrão do marcador de proteína SW-SDS-70L (Sigma).





**Figura 1.8:** Produtos da RT-PCR vistos em gel de agarose 1%. Amostras 1, 2 e 3: RT-PCR usando TBSV 5's e TBSV-3'as. como oligonucleotídeos, e os RNA do PLYV, do TBSV como moldes e sem RNA, respectivamente. M: marcador de peso molecular 1 kb ladder. Amostra 4: RT-PCR usando-se TBSV-5's e TBSV-3'as como oligonucleotídeos e o PLYV como molde. Amostra 5: RT-PCR usando-se PLYV-6s e PLYV-8as como oligonucleotídeos e o PLYV como molde. As setas à direita indicam os respectivos tamanhos do marcador: 0,5, 1,6, 3,0 kb e à esquerda indica um fragmento de amplificação de aproximadamente 0,6 kb.

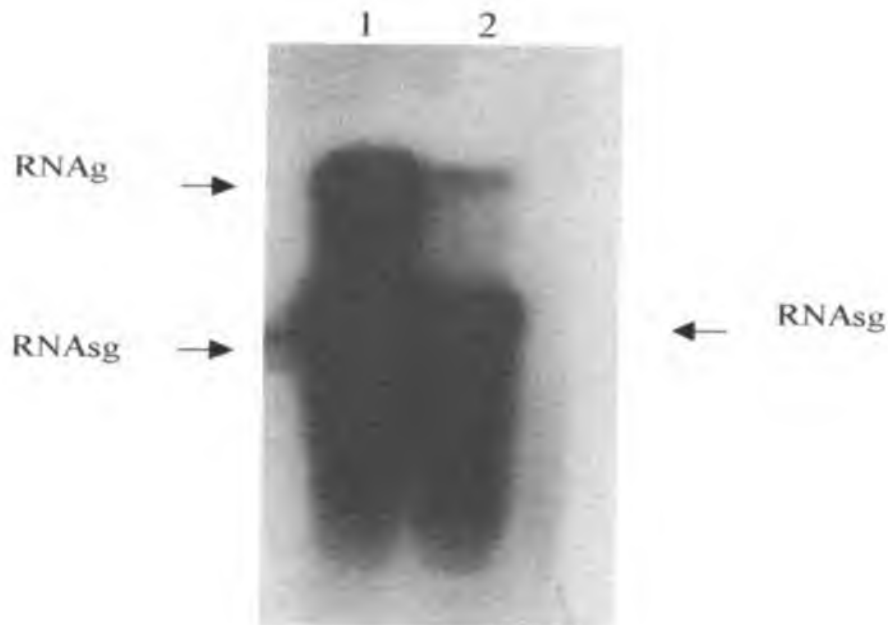


**Figura 1.9:** (A) Estratégias de amplificação do genoma do *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) via PCR e/ou cDNA mostrando a provável localização dos oligonucleotídeos utilizados nesses experimentos. TBSV-5's e TBSV-3'as são específicos para as extremidades 5'e 3' do TBSV. PLYV-6s e PLYV-7as foram desenhados baseados em regiões conservadas do gene da polimerase de vírus relacionados aos carmovirus (Morozov *et al.*, 1995). PLYV-8as foi desenhado a partir da seqüência de aminoácidos da proteína do capsídeo do PLYV (Silva *et al.*, 1996). Os oligonucleotídeos PLYV-32s e PLYV-33as foram desenhados baseados em seqüências previamente obtidas do PLYV. As posições tentativas para os genes da polimerase e da proteína do capsídeo do PLYV são indicadas baseado na localização dos respectivos genes em espécies do gênero *Sobemovirus*. (B) Representação do RNA genômico do PLYV com os oligonucleotídeos randômicos anelando-se ao acaso. O fragmento PLYV-3 foi obtido com essa estratégia e as posições dos oligonucleotídeos específicos (PLYV-16as e PLYV-17s) são indicadas. As siglas s e as significam senso e anti-senso. A representação não encontra-se exibida em escala.

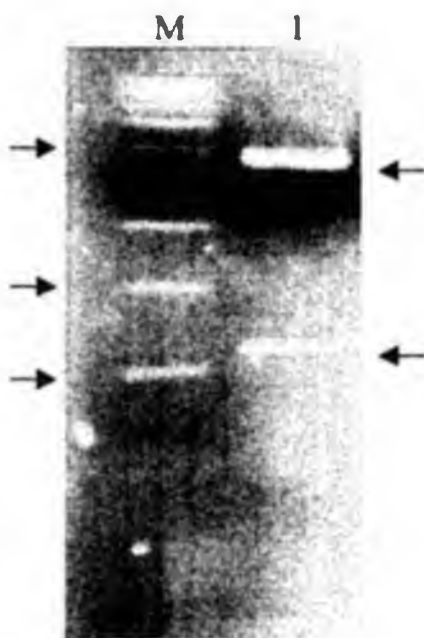
randômicos obteve-se um cDNA (**Figura 1.10**) que deu origem ao primeiro clone (PLYV-3), cuja digestão com *Hind* III e *Eco*R I é mostrada na **Figura 1.11**. Apesar de não se obter nenhum clone utilizando-se o oligonucleotídeo PLYV-8as nesta etapa, a **Figura 1.10** mostra claramente que o cDNA não foi a etapa limitante para a obtenção dos transformantes. Além disso, observou-se que, a reação preparada com o oligonucleotídeo PLYV-8as mostrou a presença de um provável RNA subgenômico do PLYV, que só foi possível ser detectado quando marcado radioativamente (**Figura 1.10**). A marcação radioativa além de indicar a presença do RNA subgenômico encapsidado nas partículas virais, ou co-purificado com o RNA genômico, também sugere que este deve codificar a proteína do capsídeo, pois o oligonucleotídeo PLYV-8as utilizado foi desenhado para se anelar nessa região do RNA. Por outro lado, a reação produzida a partir dos oligonucleotídeos randômicos, mostrou marcação em ambos RNAs: genômico e subgenômicos (**Figura 1.10**).

Assim, após a obtenção dos fragmentos de cDNA de fita dupla, esses foram clonados no vetor pUC119, utilizando-se do respectivo sítio de clonagem para a enzima de restrição *Sma* I. Nesta etapa, obtiveram-se 16 clones, utilizando-se oligonucleotídeos randômicos e 19 clones, utilizando-se o oligonucleotídeo específico PLYV-17s. Apesar do oligonucleotídeo PLYV-17s ter sido desenhado para se anelar em um sítio específico do clone PLYV-3 (**Figura 1.9**), não foi possível prever o tamanho dos fragmentos amplificados, que se mostraram variáveis (à semelhança daqueles amplificados com os oligonucleotídeos randômicos), de acordo com o padrão de restrição das enzimas *Hind* III e *Eco*R I. Porém, nenhum transformante foi obtido, quando o cDNA produzido com o oligonucleotídeo PLYV-16as foi utilizado.

Para se verificar a especificidade desses clones como sendo do PLYV, os DNAs plasmidiais, digeridos e fixados em membranas de nylon, foram hibridados com o cDNA viral do PLYV, preparado com dCTP marcado com  $^{32}\text{P}$ . Os resultados da hibridação mostraram que todos os clones eram específicos para o PLYV (dados não mostrados).



**Figura 1.10:** Padrão eletroforético do cDNA do PLYV preparado com dCTP marcado radioativamente com  $^{32}\text{P}$ . O cDNA da amostra 1 foi preparado com os oligonucleotídeos randômicos e a amostra 2 com o PLYV-8as. As setas indicam os prováveis cDNAs correspondente ao RNA genômico (RNAg) e possível RNA subgenômico (RNAsg) do PLYV. Os tamanhos desses cDNAs foram estimados em 4,8 kb e 0,9 kb, respectivamente, baseado no tamanho do RNA genômico e subgenômico viral estimado por Silva *et al.* (1997).

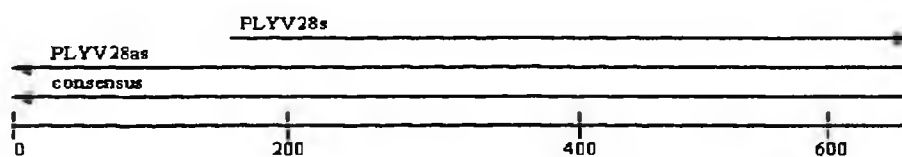


**Figura 1.11:** Padrão de restrição do plasmídeo PLYV-3 digerido com as enzimas de restrição *Hind* III e *Eco*R I em gel de agarose 1 %. As setas localizadas à esquerda indicam os pesos moleculares de 0,5, 1,0 e 3,0 kb, respectivamente, do marcador 1 kb ladder (GIBCO BRL). As setas localizadas à direita indicam um fragmento de aproximadamente 0,6 kb e de 3,0 kb, que representam o inserto do PLYV liberado e o vetor (PUC119) linearizado, respectivamente.

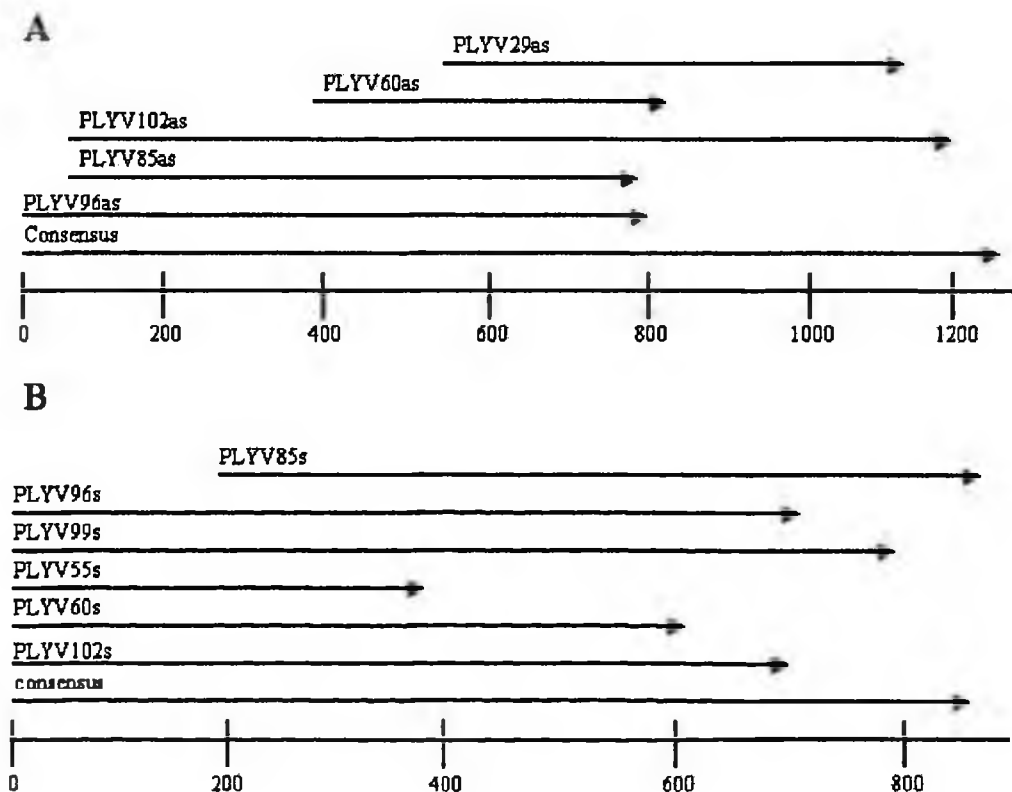
### 1.5. Análise das seqüências obtidas por seqüenciamento automático e/ou manual

Nessa etapa do trabalho, aproximadamente 111 clones foram obtidos a partir da clonagem dos fragmentos amplificados por PCR ou cDNA. Porém, após seqüenciamento apenas 22 seqüências foram utilizadas para obter o alinhamento que deu origem a seqüência apresentada nesse trabalho.

O programa UWGCG usado para essa análise permitiu montar três grupos de seqüências de acordo com a homologia entre elas. O primeiro grupo foi composto pela seqüência nucleotídica do plasmídeo PLYV-28 (**Figura 1.12**), o qual apresenta 667 nucleotídeos. O segundo foi o resultado do agrupamento de dez clones de seqüências anti-senso representado pelos clones PLYV-85as, PLYV-29as, PLYV-60as, PLYV-96as e PLYV-102as, constituíram uma seqüência de 1357 nucleotídeos (**Figura 1.13A**). Por último, um agrupamento de doze seqüências senso (s), representado pelos clones PLYV-85s, PLYV-55s, PLYV-96s, PLYV-99s, PLYV-60s e o PLYV-102s, deu origem a uma seqüência consenso de 957 nucleotídeos (**Figura 1.13B**). Os consensos de cada um desses grupos foram novamente submetidos a um rearranjo no programa UWGCG e a nova disposição dos fragmentos é mostrada na (**Figura 1.14**). Como o conhecimento dessas seqüências não informava a orientação na qual os fragmentos se encontravam na seqüência genômica do vírus, procurou-se analisar a homologia dessas seqüências com outras presentes em bancos de dados. Durante essa etapa, observou-se que as seqüências do PLYV tinham maior homologia com as proteínas do capsídeo e da poliproteína dos sobemovírus (os dados de homologia são discutidos a seguir no **item 1.6**). Essa descoberta auxiliou a encontrar a correta orientação dos fragmentos, baseado na presença de regiões conservadas para esses vírus, que também estavam presentes nas seqüências obtidas para o PLYV (**item 1.7**). Assim, adotou-se a orientação representada na **Figura 1.14**, como sendo àquela presente no genoma do PLYV. Esse alinhamento dos consensos criou duas seqüências: uma de 1848 nucleotídeos, originada da sobreposição dos dois consensos PLYV-96as-consenso (PLYV-96as-

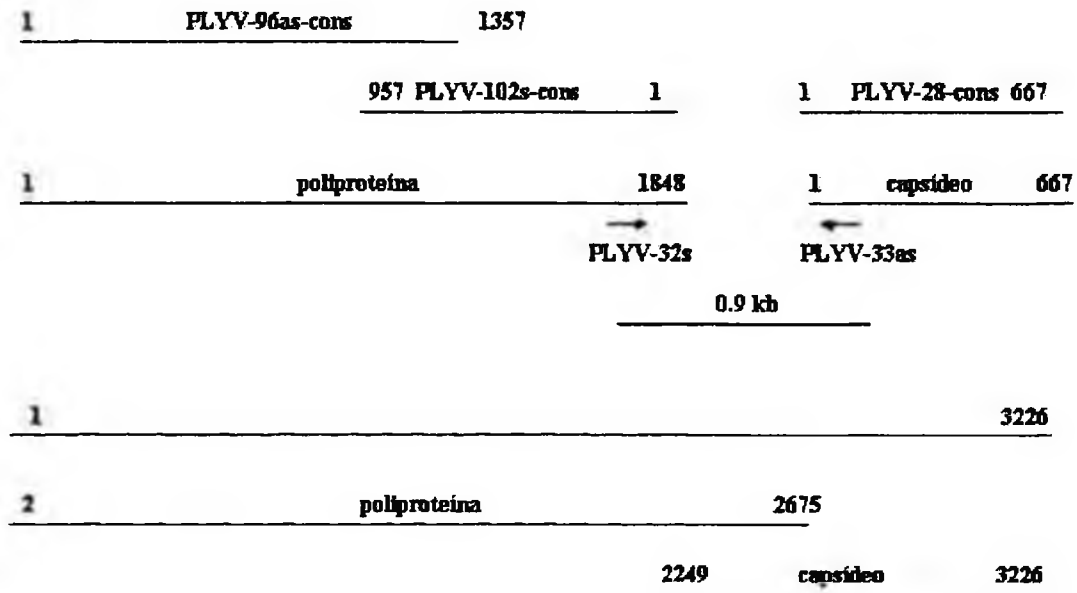


**Figura 1.12:** Esquema representativo do alinhamento da seqüência proveniente do plasmídeo PLYV-28s (senso) e PLYV-28as (anti-senso). Esse plasmídeo foi obtido via PCR e o alinhamento da sua seqüência, em ambas direções, originou um consenso de 667 nucleotídeos.



**Figura 1.13:** Esquema representativo do alinhamento das seqüências provenientes dos plasmídeos PLYV-29, PLYV-55, PLYV-60, PLYV-85, PLYV-96, PLYV-99 e PLYV-102. As siglas “s” e “as”, indicam as seqüências senso e anti-senso, respectivamente. A figura **A** mostra o alinhamento das seqüências dos plasmídeos que originaram o consenso PLYV-96as-cons e a figura **B** mostra o alinhamento das seqüências dos plasmídeos que originaram o consenso PLYV-102s-cons.



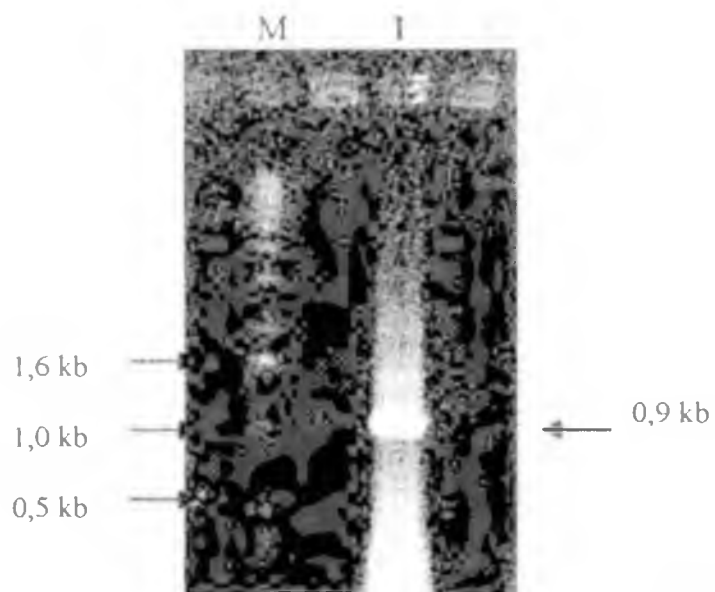


**Figura 1.14** Representação esquemática da obtenção da sequência nucleotídica do PLYV, que apresenta maior homologia com os genes da polimerase e da proteína do capsídeo dos sobemovirus. As sequências PLYV-96as-consenso e PLYV-102s-consenso foram alinhadas, utilizando-se o pacote de programas UWGCG. Esse alinhamento originou uma sequência de 1848 nucleotídeos contendo motivos da RNA dependente de RNA polimerase e de VPg-serina protease de sobemovirus. Motivos característicos da proteína do capsídeo dos sobemovirus foram encontrados na sequência nucleotídica do PLYV-28-consenso. Oligonucleotídeos específicos (PLYV-32s e PLYV-33as) foram desenhados para as extremidades 3' da sequência da polimerase e para a extremidade 5' da sequência da proteína do capsídeo. O fragmento de 0,9 kb foi obtido por PCR, utilizando-se esses oligonucleotídeos, e um novo alinhamento foi criado. Esse alinhamento originou uma sequência contínua de 3226 nucleotídeos com sobreposição da sequência da polimerase com a sequência da proteína do capsídeo.

cons) e do PLYV-102s-cons (**Figura 1.13**), e outra representada pelo consenso da seqüência PLYV-28 (**Figura 1.12**), com 667 nucleotídeos. A partir desse momento, essas seqüências foram denominadas de seqüências da poliproteína e da proteína do capsídeo, em virtude da sua homologia com as respectivas proteínas presentes no genoma dos sobemovírus e a presença de domínios protéicos nas mesmas. Usando-se estas seqüências, novos oligonucleotídeos foram desenhados (**Figura 1.14**) e um fragmento de aproximadamente 0,9 kb foi obtido (**Figura 1.15**) e seqüenciado automaticamente. A análise dessa seqüência, com aquelas geradas com o alinhamento dos clones apresentados na **Figura 1.14**, mostrou que esse fragmento correspondia à região de sobreposição das seqüências da poliproteína e da proteína do capsídeo (**Figura 1.14**), como havia sido previsto. Esse alinhamento possibilitou-nos criar uma seqüência contínua de 3226 nucleotídeos que corresponde a cerca de 70 % do genoma estimado em 4.8 kb do PLYV.

#### **1.6. Identificação das ORFs e motivos conservados na seqüência do PLYV**

A seqüência nucleotídica obtida do PLYV (3226 nucleotídeos) foi analisada no programa UWGCG e duas possíveis ORFs (**Figura 1.16**) foram identificadas. A primeira delas foi identificada por estar longa e aberta, desde o nucleotídeo 2 até o 2674. Isso é uma indicação de que esta deve ser uma ORF funcional à semelhança do que acontece com os sobemovírus. Assim, a análise dessa seqüência em bancos de dados mostrou que essa ORF apresenta homologia com a poliproteína dos sobemovírus, baseado na presença de motivos conservados para essa proteína nesse gênero de vírus (**Figura 1.17**). Baseado nessa suposição, essa ORF foi denominada ORF POL. Apesar da presença ainda de alguns nucleotídeos não identificados (representados pela letra N), é possível afirmar que a ORF POL é a que provavelmente codifica a poliproteína do PLYV. Diante dos dados disponíveis, que não representam o genoma completo do PLYV, ainda não é possível prever, com exatidão, na seqüência obtida nesse trabalho, a localização do códon de terminação para essa proteína. Porém, considerou-se o códon UAA, localizada entre os nucleotídeos 2672 a 2674, como o possível códon de terminação para a poliproteína do PLYV.



**Figura 1.15:** Amplificação via PCR do genoma do PLYV, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a polimerase (PLYV-32s) e proteína do capsídeo (PLYV-33as). M: marcador de peso molecular 1kb ladder. Amostra 1: Produto da RT-PCR utilizando-se o RNA viral do PLYV. A localização de anelamento dos oligonucleotídeos encontra-se representada na Figura 3.

```

AAGCCCNCTTGCTGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCTGGAATGGCCGTTATACGG
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TTCGGGNGAACGACGGACGTCCAGCTGAGATCTCCTAGGGGACCTTACCGGCAATATGCC

Provável S P L A A C R S T L E D P L E W P L Y G -20
ORF POL
CTCTNAAAATATTGAAGGGATCTCAGGAGGTCTCAGTAGATGCTTCTATGTATACTGCAA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GAGANTTTTATAACTTCCCTAGAGTCCCTCCAGAGTCATCTACGAAGATACATATGACGTT

S ? N I E G I S G G L S R C F Y V Y C K -40

AGTATTTCTGNGAGGATCTACGAGTGGATTTTCGCAATGGCGCCCATACCAGAGCCAATCT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TCATAAAGACNCTCCTAGATGCTCACCTAAAGCGTTACCGCGGGTATGGTCTCGGTTAGA

V F L ? G S T S G F R N G A H T R A N L -60

GGACCAAGTTGGGCGTAAAAGCGAGNAATCTGTCTACAATGTCCCGCACGTCGCTGATAA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CCTGGTTCAACCCGCATTTTCGCTCNTTAGACAGATGTTACAGGGCGTGCAGCGACTATT

D Q V G R K S E ? S V Y N V P H V A D K -80

ATGTGTACGGAGGGGCAGATCCAACGAAGCTGAAATGCTCGTCGGCGAAAGCTGTGAAGG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TACACATGCCTCCCCGTCTAGGTTGCTTCGACTTTACGAGCAGCCGCTTTCGACACTTCC

C V R R G R S N E A E M L V G E S C E G -100

CAGAGTACTCCCACCAGATTGTGCACTATGCTACTACCGGCGGAGGCTGGAGTGGCACCC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GTCTCATGAGGGTGGTCTAACACGTGATACGATGATGGCCGCCCTCCGACCTCACCGTGGG

R V L P P D C A L C Y Y R R R L E W H P -120

CTTTATACTANAATGGAGCGGTTGTAGGAATGCATACCGGCTCTATCAAGTTGGGGGAGA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GAAATATGATNTTACCTCGCCAACATCCTTACGTATGGCCGAGATAGTTCAACCCCTCT

F I L ? W S G C R N A Y R L Y Q V G G E -140

GCAANAGAGGAGTCAATGTAGCCATGTTGTTAACTTGGCTTGCAGACCGTATTCAGNG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CGTTNTCTCCTCAGTTACATCGGTACAACAATTTGAACCGAACGCTCTGGCATAAGTCNC

Q ? R S Q C S H V V K L G L R D R I Q ? -160

AAATAACGTACACCGAGATNGATTTCNGACTTAGCCCTCGAAAGGGATTATGGCTTCATNG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TTTATTGCATGTGGCTCTANCTAAGNCTGAATCGGGAGCTTTCCTAATACCGAAGTANC

N N V H R D ? F ? L S P R K G L W L H ? -180

AAGTCGAAATCCACGGCAAGGGGAAGTTTGCCTGGGAAAGGGNGAATGGTACGCTGTGC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TTCAGCTTTAGGTGCCGTTCCCCTTCAAACGGGACCCTTCCCNCTTACCATGCGACAGC

S R N P R Q G E V C P G K G ? M V R C R -200

```

TNGAGCGTGTTCGGGCTCCAGCAATGGAGCTGTTCAAGATAAGCATAGAGATCGAGTCGT  
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
 ANCTCGCACAAAGCCCGAGGTCGTTACCTCGACAAGTTCCTATTCGTATCTCTAGCTCAGCA  
 ? A C S G S S N G A V Q D K H R D R V V -420  
 TACAGCCGTTGTGGCCAGACCAAATTTATTATCTGAAAAGAAAATTGATTATGATCCAGT  
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320  
 ATGTCGGCAACACCGGTCTGGTTAAATAATAGACTTTTCTTTTAACTAATACTAGGTCA  
 T A V V A R P N L L S E K K I D Y D P V -440  
 TCAACTGGTGCAGTTTGGCTATTGGGATCCAAATTGCCAGNGAGATTGTTTGNAAAGCAA  
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380  
 AGTTGACCACGTCAAACCGATAACCCTAGGTTTAAACGGTCNCTCTAACAAACNTTTCGTT  
 Q L V Q F G Y W D P N C Q ? D C L ? S K -460  
 GAACCTCATTCTCNGAAGAAGATTACCTGAGGGGCGTTTCCGTTGGATCTCTTCCGTGTC  
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440  
 CTTGGAGTAAGAGNCTTCTCTAATGGACTCCCCGCAAAGGCAACCTAGAGAAGGCACAG  
 N L I L ? R R L P E G R F R W I S S V S -480  
 TCTGGTGGACCAACTCGTTGAAAAGATGATATTTGGACCCCAGAATGAGCTTGAGATAAC  
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500  
 AGACCACCTGGTTGAGCAACTTTCTTACTATAAACCTGGGGTCTTACTCGAACTCTATTG  
 L V D Q L V E R M I F G P Q N E L E I T -500  
 TAGGTGGCGAAATATTCCATCTAAACCCGGAATGGGGTGTCTCTGGAGGAGCAAGCCCA  
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560  
 ATCCACCGCTTTATAAGGTAGATTTGGGCCTTACCCCAACAGAGACCTCCTCGTTCGGGT  
 R W R N I P S K P G M G L S L E E Q A Q -520  
 GACAATTTGGTCTGATTTGAGCTACAAACATCTGGAACACCCCGCTGCTGAAGCGGATAT  
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620  
 CTGTTAAACCAGACTAAACTCGATGTTTGTAGACCTTGTGGGGCGACGACTTCGCCTATA  
 T I W S D L S Y K H L E H P A A E A D I -540  
 TTCTGGATTTGACTGGTCTGTTCAAGACTGGGAACTTTGGGCTGATCTCAAAATGCGAAT  
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680  
 AAGACCTAAACTGACCAGACAAGTTCTGACCCTTGAACCCGACTAGAGTTTACGCTTA  
 S G F D W S V Q D W E L W A D L K M R I -560  
 CGAATTAGGGAACATGGAGGGTAGGTTAAAGATCGCTGCGATCAATAGATTCACATGCTT  
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740  
 GCTTAATCCCTGTACCTCCCATCCAATTTCTAGCGACGCTAGTTATPCTAAGTGTACGAA  
 E L G N M E G R L K I A A I N R F T C F -580  
 CATGAACTCGGTTTTCCAGCTTTCCGACGGAAGTTGGATACCACAAGGGAAACCAGGACT  
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800  
 GTACTTGAGCCAAAAGGTCGAAAGGCTGCCTTCAACCTATGGTGTTCCTTTGGTCCTGA  
 M N S V F Q L S D G S W I P Q G K P G L -600

GATGAAGTCCGGAAGCTATTGCACTTCAAGTACGAATTCTCGTATAAGGTGTCTGATGGC  
 1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860  
 CTACTTCAGGCCTTCGATAACGTGAAGTTCATGCTTAAGAGCATATTCCACAGACTACCG  
  
**M K S G S Y C T S S T N S R I R C L M A -620**  
 TGAGTTAATTGGGGCGCCCTGTTGTATAGCAATGGGTGATGACTCGGTTGAAGGTTATGT  
 1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920  
 ACTCAATTAACCCCGCGGGACAACATATCGTTACCCACTACTGAGCCAACCTCCAATACA  
  
**E L I G A P C C I A M G D D S V E G Y V -640**  
 CCCAAATGCTCGTAGGAAATATGAGGAATTGGGTGATGTCTGCAAAGACTACATGCCTTG  
 1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980  
 GGGTTTACGAGCATCCTTTATACTCCTTAACCCAGTACAGACGTTTCTGATGTACGGAAC  
  
**P N A R R K Y E E L G H V C K D Y M P C -660**  
 TAAGGTCGATTCTGAGGGGAACCTGGAAAAGGTTAACTTTTGCTCCCATGACCTGTCTGA  
 1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040  
 ATTCCAGCTAAGACTCCCTTGGACCTTTTCCAATTGAAAACGAGGGTACTGGACAGACT  
  
**K V D S E G N L E K V N F C S H D L S E -680**  
 AGGGAAATTTGGCTGACAAGTTGGCCGAAAACGGTATTTAGGTATCTCAACTCCAAGGC  
 2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100  
 TCCCTTTAAAACCGACTGTTCAACCGGCTTTTGCCATAAATCCATAGAGTTGAGGTTCCG  
  
**G K F W L T S W P K T V F R Y L N S K A -700**  
 TCCTGAGATAGGGGACTTGAAGGCAGAGTTGTGGGGGAACCCTCACTGGGGAAGAATCTA  
 2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160  
 AGGACTCTATCCCCTGAACTTCCGTCTCAACACCCCTTGGGAGTGACCCCTTCTTAGAT  
  
**P E I G D L K A E L W G N P H W G R I Y -720**  
 TGAGGTGTTGGCGTTGAAGACCGGGCCAACAAAATTTGGAATCAAATGATTTAGCCG  
 2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220  
 ACTCCAACAACCGCAACTTCTGGCCCGGTTGTTTTAAAACCTTAGTTTACTAAAGTCGGC  
  
**E V V G V E D R A N K I L E S N D F S R -740**  
 GTCGAGTGAGGCGGCAACTATCAAGAATGAAGAATGCCGCTCGGGCGGCAGCGAAAGTT  
 2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280  
 CAGCTCACTCCGCGGTTTGATAGTTCTTACTTCTTACGGCGAGCCCGCCGTCGCTTTCAA  
  
**Provável ORF CP M K N A A R A A A K V -11**  
**S S E A A N Y Q E \* R M P L G R Q R K L -760**  
 GCTTGTTCACAGGCTCAGCGGTTCAACAGGTAGCGCCGAAAGGTATGAATGCGAAACA  
 2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340  
 CGAACAAAGTTGTCGAGTCGCGCAAGTTGTCCATCGCGGCTTTCCATACTTACGCTTTGT  
  
**A C S T G S A R S T G S A E R Y E C E T -31**  
**L V Q Q A Q R V Q Q V A P K G M N A K Q -780**  
 ACGGAAGGCCTTGCAGGAAGAAGATGCTTCAAAGTACAGCGAGTGTACAGACCAAACAG  
 2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400  
 TGCCTTCCGGAACGCCTTCTTCTACGAAGTTTCATGTCGCTCACAATGTCTGGTTTTGTC

T E G L A E E D A S K Y S E C Y R P K Q -51  
 R K A L R K K M L Q S T A S V T D Q N R -800  
  
 GTTCACTGCCCCCTACTGCCAAAAGAATTGTTGCAAGGTNGAAAAACNGGGCCTAATGCC  
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460  
 CAAGTGACGGGGGATGACGGTTTTCTTAACAACGTTCCANCTTTTTGNCCCGGATTACGG  
  
 V H C P L L P K E L L Q G ? K T G P N A -71  
 F T A P Y C Q K N C C K V E K ? G L M P -820  
  
 CTTAACTCCTGGCCGTTTTCCAAAGGGAAGCTCCTTGTTCACGTTGGGTTATAACCTCCTG  
 2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520  
 GAATTGAGGACCGGCAAAGGTTTTCCCTTCGAGGAACAAGTTGCACCCAATATTGGAGGAC  
  
 L N S W P F P K G S S L F N V G Y N L L -91  
 L T P G R F Q R E A P C S T W V I T S W -840  
  
 GAAGGAATGGATCTGGAAAGGCGAATCGAAGGTCCATGGATCCATCAGGCGCCATTCCGCC  
 2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580  
 CTTCTTACCTAGACCTTTCCGCTTAGCTTCCAGGTACCTAGGTAGTCCGCGGTAAGCGG  
  
 E G M D L E R R I E G P W I H Q A P F A -111  
 K E W I W K G E S K V H G S I R R H S P -860  
  
 ATTCAGGTTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGTTGCGGGCCTCTTCGCTATTACCCAG  
 2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640  
 TAAGTCCAACGCGTTGACAACCCTTCCCGCTAGCAACGCCCGGAGAAGCGATAATGGGTC  
  
 I Q V A Q L L G R A I V A G L F A I T Q -131  
 F R L R N C W E G R S L R A S S L L P S -880  
  
 TTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGTTTTCCCCAG  
 2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700  
 AACCGCTTTCCCCCTACACGACGTTCCGCTAATTCAACCATTGCGGTCCAAAAGGGGTC  
  
 L A K G G C A A R R L S W V T P G F P Q -151  
 W R K G D V L Q G D \* V G \* R Q V F P S -900  
  
 TCACGACGTTGTA AACGACGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGAGCCACGTACCT  
 2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760  
 AGTGCTGCAACATTTTTGCTGCGGGTCACTTAAGCTCGAGCCATGGGCCTCGGTGCATGGA  
  
 S R R C K T T P S E F E L G T R S H V P -171  
  
 ACGGTTACGGTGGATAACTGTATGCCATACACAGTGGGAACATGGTTACGAGGAGTGGCC  
 2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820  
 TGCCAATGCCACCTATTGACATACGGTATGTGTCACCCTTGTACCAATGCTCCTCACCGG  
  
 T V T V D N C M P Y T V G T W L R G V A -191  
  
 TCCAACTGGTCGAAATGGAGATGGAGGAAGTTACGGTTCTATTATCTACCATCTTGTGCT  
 2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880  
 AGGTTGACCAGCTTTACCTCTACCTCCTTCAATGCCAAGATAATAGATGGTAGAACACGA  
  
 S N W S K W R W R K L R F Y Y L P S C A -211  
  
 ACCACTACCCGGGATCTGTGCATATGGGGTTAACGTATGATCAGTATGATACTGTACCG  
 2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940  
 TGGTGATGGGGCCCTAGACACGTATACCCCAATTGCATACTAGTCATACTATGACATGGC  
  
 T T T P G S V H M G L T Y D Q Y D T V P -231

**Tabela 1.4:** Comparação de homologia de nucleotídeos e aminoácidos entre o PLYV e espécies de sobemovírus (vermelho), tombusvírus (azul), necrovírus (verde), polerovírus (laranja) e enamovírus (lilás) para o gene da polimerase viral. Os valores das percentagens representados à esquerda da diagonal (representada pela homologia de 100 % entre a mesma espécie) indicam as homologias de aminoácidos entre os genes da polimerase (Pol) das espécies pertencentes a esses gêneros de vírus e à direita os valores das percentagens de homologia de nucleotídeos. Os dados para comparação foram obtidos do banco de dados, utilizando os números de acesso disponíveis em Tamm & Truve, 2000.

	PLYV	SBMV	RYMV	LTSV	SCPMV	CfMV	TBSV	CymRSV	CuNV	TNV-A	OLV	LWSV	PLRV	PEMV
PLYV	<b>100</b>	51,7	51,3	52,6	49,7	40,4	39,4	38,6	40,3	39,5	39,5	39,1	43,5	43,1
SBMV	35,4	<b>100</b>	48,0	48,4	57,4	45,12	36,11	38,4	36,4	36,9	37,5	38,2	38,8	43,5
RYMV	38,9	40,4	<b>100</b>	51,2	49,3	47,9	38,7	39,8	40,7	39,0	37,5	38,9	43,7	40,7
LTSV	35,7	41,0	44,8	<b>100</b>	52,4	41,9	38,5	38,5	37,0	37,9	38,2	39,3	43,7	43,8
SCPMV	38,1	50,4	41,0	49,3	<b>100</b>	47,6	38,6	38,9	40,7	38,5	39,1	39,1	43,6	43,3
CfMV	18,2	16,6	32,7	37,2	33,1	<b>100</b>	38,4	39,6	39,0	39,1	39,5	37,6	36,3	35,9
TBSV	31,5	50,0	42,8	26,0	30,7	33,3	<b>100</b>	86,3	37,0	49,1	45,4	48,7	37,6	37,5
CymRSV	31,5	50,0	50,0	27,2	33,3	33,3	94,6	<b>100</b>	81,9	47,8	47,1	47,7	37,3	37,8
CuNV	40,0	50,0	42,8	26,0	30,7	28,5	94,0	91,3	<b>100</b>	49,5	44,9	48,8	39,2	38,9
TNV	25,0	28,5	25,0	38,0	25,0	25,0	47,8	48,0	48,6	<b>100</b>	47,4	61,1	40,3	39,5
OLV	31,2	25,0	16,6	33,3	25,0	15,3	42,8	43,2	41,5	46,1	<b>100</b>	46,1	37,1	41,7
LWSV	33,3	50,0	14,2	37,5	28,5	26,3	46,3	46,2	46,3	68,2	43,4	<b>100</b>	39,5	38,2
PLRV	34,3	32,6	33,2	32,2	32,7	27,2	28,5	28,5	28,5	33,3	40,0	50,0	<b>100</b>	46,7
PEMV	33,4	36,7	32,0	30,8	32,1	29,8	25,0	27,3	25,0	33,3	33,3	16,6	46,7	<b>100</b>

**Observação:** PLYV(*Papaya lethal yellowing virus*), RYMV (*Rice yellow mottle virus*, L20893), LTSV(*Lucerne transient streak virus*, U31286), SCPMV(*Southern cowpea mosaic virus*, M230216), CfMV(*Cooksfoot mottle virus*, Z48630), TBSV(*Tomato bushy stunt virus*, M21958), CYRSV(*Cymbidium ringspot virus*, X15511), CuNV(*Cucumber necrosis virus*, M25270), TNV-A (*Tobacco necrosis virus*, M33002), OLV (*Olive latent virus 1*, X85989), LWSV (*Leek white stripe virus*, X94560), PLRV (*Potato leafroll virus*, Y07496), PEMV (*Pea enation mosaic virus*, L04573).



**Tabela 1.5:** Comparação de homologia de nucleotídeos e aminoácidos entre o PLYV e espécies de sobemovírus, tombusvírus, necrovírus e um polerovírus para o gene da proteína do capsídeo. Os valores das percentagens representados à esquerda da diagonal (representada pela homologia de 100 % entre a mesma espécie) indicam as homologias de aminoácidos entre o gene da proteína do capsídeo (CP) do PLYV e das espécies pertencentes a esses gêneros de vírus e à direita os valores das percentagens de homologia de nucleotídeos. Os dados para comparação foram obtidos do banco de dados, utilizando os números de acesso disponíveis em Tamm & Truve, 2000.

	PLYV	SBMV	RYMV	LTSV	SCPMV	CfMV	TBSV	CymRSV	CuNV	TNV-A	OLV	LWSV	PLRV	PEMV
PLYV	<b>100</b>	42,5	39,1	43,4	47,3	41,2	37,7	37,9	40,3	42,9	41,0	41,0	36,7	40,0
SBMV	37,4	<b>100</b>	44,0	41,5	66,5	39,2	38,6	38,9	41,2	38,0	40,6	39,7	37,2	39,6
RYMV	31,1	33,3	<b>100</b>	41,4	43,5	46,1	38,4	38,7	41,4	42,8	38,3	39,7	36,9	30,0
LTSV	31,3	38,0	30,4	<b>100</b>	44,6	42,9	41,8	38,3	38,1	42,7	39,5	40,3	39,9	16,6
SCPMV	37,4	80,5	34,1	39,7	<b>100</b>	43,1	37,7	38,2	36,7	43,2	40,7	39,4	37,8	38,3
CfMV	26,9	27,0	40,8	29,5	30,2	<b>100</b>	38,5	38,2	37,6	37,9	37,4	35,3	37,6	38,3
TBSV	15,3	31,4	33,3	19,0	30,3	18,2	<b>100</b>	52,9	48,3	41,6	41,0	37,2	40,7	37,7
CymRSV	33,3	29,0	26,7	29,2	23,2	31,2	53,7	<b>100</b>	49,0	39,5	38,3	37,7	42,9	39,6
CuNV	22,2	30,2	25,9	27,2	26,0	36,3	49,0	46,6	<b>100</b>	40,2	39,2	41,6	38,2	40,4
TNV	29,0	35,3	28,7	34,7	34,8	28,0	27,3	26,6	20,7	<b>100</b>	47,3	43,2	38,6	37,9
OLV	27,2	31,2	28,0	34,6	34,0	25,6	66,6	22,2	33,3	46,5	<b>100</b>	42,5	38,9	41,2
LWSV	29,7	35,4	30,4	34,3	37,0	29,3	50,0	21,4	27,3	36,0	38,8	<b>100</b>	38,9	42,4
PLRV	22,2	21,7	25,0	25,0	18,2	29,4	40,0	22,7	25,0	50,0	28,5	30,7	<b>100</b>	44,2
PEMV	42,8	33,3	30,0	16,6	16,6	14,3	14,3	50,0	25,0	26,6	28,6	33,3	40,4	<b>100</b>

**Observação:** PLYV (*Papaya lethal yellowing virus*), RYMV (*Rice yellow mottle virus*, L20893), LTSV (*Lucerne transient streak virus*, U31286), SCPMV (*Southern cowpea mosaic virus*, M230216), CfMV (*Cooksfoot mottle virus*, Z48630), TBSV (*Tomato bushy stunt virus*, M21958), CYRSV (*Cymbidium ringspot virus*, X15511), CuNV (*Cucumber necrosis virus*, M25270), TNV-A (*Tobacco necrosis virus*, M33002), OLV (*Olive latent virus 1*, X85989), LWSV (*Leek white stripe virus*, X94560), PLRV (*Potato leafroll virus*, Y07496), PEMV (*Pea enation mosaic virus*, L04573).

comparados, observou-se que apenas os tombusvírus apresentam uma alta homologia de aminoácidos (variando de 91,3 a 94,6 %) para a poliproteína, nas espécies comparadas (CUNV, TBSV e CymRSV). No entanto, essa alta homologia na seqüência de aminoácidos da polimerase, não é observada quando a comparação foi feita com a seqüência nucleotídica da mesma proteína. Esses valores de homologia variaram de 37,0 % entre o CUNV e TBSV a 86,3 % entre o TBSV e o CymRSV. As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da proteína do capsídeo também mostraram baixos valores de homologia na comparação entre todos os gêneros, exceto entre o TBSV e o OLV (66%), que apesar de representarem espécies filogeneticamente distantes, apresentaram um maior relacionamento.

Para os sobemovírus e necrovírus, a homologia de nucleotídeos e aminoácidos para ambas proteínas analisadas, dentro do mesmo gênero, sempre apresentou valores baixos de homologia (em torno de 50 %, **Tabelas 1.4 e 1.5**).

## DISCUSSÃO:

Silva (1996) e Silva *et al.* (1997) estudando o PLYV determinaram algumas características biológicas (a morfologia da partícula com aproximadamente 30 nm, o círculo de hospedeiros restrito a plantas de mamão, a sintomatologia e os efeitos citopáticos) e moleculares (o padrão eletroforético do RNA fita simples e dupla, o perfil eletroforético da proteína do capsídeo e o seqüenciamento de peptídeos da proteína capsidial) para esse vírus. Os dados obtidos até aquele momento mostraram que o PLYV apresentava características mais similares ao gênero *Tombusvirus* (Tabela 1.1). Como esses parâmetros não são suficientes para a definição da classificação de uma espécie dentro da família *Tombusviridae*, e mesmo entre outras famílias de vírus isométricos, a organização genômica e a estratégia de expressão dos genes virais necessitavam ser elucidados, a fim de se esclarecer a posição taxonômica do PLYV. As características destacadas, juntamente com o tamanho da proteína do capsídeo, são requeridas pelo ICTV para a classificação de vírus isométricos, tais como: os tombusvírus, sobemovírus, necrovírus, polerovírus e enamovírus.

O estudo de parte desses parâmetros apresentado nesse capítulo indica que o PLYV tem maior similaridade com o gênero *Sobemovirus* e não com o gênero *Tombusvirus*, como havia sido anteriormente proposto (Silva *et al.*, 1997). A primeira indicação dessa semelhança veio com os estudos de relacionamento sorológico da proteína do capsídeo do PLYV com as espécies SBMV e TBSV determinados nesse trabalho. A proteína capsidial do PLYV foi testada com os anti-soros produzidos contra a proteína do capsídeo desse vírus e também do SBMV e TBSV por “western blotting”. Os resultados mostraram que existe um relacionamento sorológico entre o PLYV e SBMV e nenhuma reação foi observada com o TBSV. Essa falta de relacionamento era esperada, já que o PLYV mostrou um dos menores valores de homologia de aminoácidos (15,3 %) e nucleotídeos (37,7 %) para a proteína capsidial, quando comparado ao TBSV (Tabelas 1.4 e 1.5). Por outro lado, quando a mesma comparação foi feita entre o PLYV e o SBMV, valores

superiores foram observados para a homologia de aminoácidos (37,4 %) e nucleotídeos (42,5 %), o que pode ter sido responsável pelo relacionamento sorológico encontrado entre essas duas espécies.

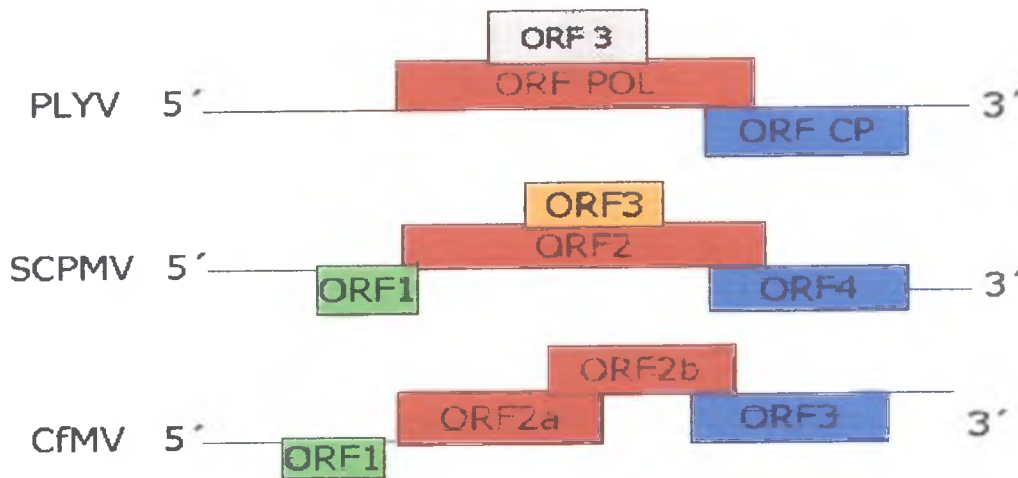
A falta de relacionamento sorológico do PLYV com um grande número de espécies de vírus isométricos pertencentes aos gêneros *Tymovirus*, *Comovirus*, *Bromovirus*, *Sobemovirus*, *Cucumovirus*, *Nepovirus*, *Necrovirus*, *Carmovirus* e *Tombusvirus* (Oliveira *et al.*, 1989; Lima & Santos, 1991 e Lima *et al.*, 1994; Silva, 1996), por ELISA ou por imunodifusão dupla, tem sido mencionado na literatura. No entanto, Vega e Rezende (1993) observaram a captura de partículas do PLYV pelo anti-soro preparado contra a proteína capsidial do *Cucumber mosaic virus* (CMV). Porém, este possível relacionamento sorológico não foi testado por outros autores. A reação sorológica observada nesse trabalho entre o PLYV e o SBMV, em “western blotting”, pode também ser explicada pela presença de uma seqüência peptídica consenso (MPYTVGTWLRGVASNWSK), localizada internamente na proteína do capsídeo do PLYV (ORF CP) e evidenciada após o sequenciamento parcial dessa proteína. Essa seqüência está presente também em algumas espécies do gênero *Sobemovirus*: SBMV (Othman & Hull, 1995), SeMV (no. de acesso no banco de dados AY004291) e SCPMV (Wu *et al.*, 1987). Após a desnaturação da proteína capsidial do PLYV, essa seqüência peptídica consenso (epitopos internos da proteína) foi provavelmente exposta, possibilitando o seu reconhecimento pelo anti-soro do SBMV. Reconhecimento de epitopos internos, já havia sido relatado para o SBMV (Seghal & White, 1989), quando anticorpos monoclonais foram utilizados para estudar, sob condições desnaturantes, interações entre as subunidades protéicas que formam a proteína do capsídeo do SBMV. Os trabalhos demonstraram reações diferenciadas, quando a proteína foi usada intacta ou na forma desnaturada. Tal fato pode explicar porque Silva (1996) não detectou anteriormente o relacionamento sorológico entre o PLYV e o SBMV em ELISA. A reação sorológica positiva com o anti-soro do SBMV observada em testes de “western blotting”,

associada à presença desse motivo conservado reforçam a conclusão de que a possível ORF CP é a que codifica para a proteína do capsídeo do PLYV à semelhança do que ocorre com os sobemovírus. Portanto, a ORF CP deve corresponder às ORF 3 do SCPMV (Wu *et al.*, 1987) ou 4 do CfMV (Mäkinen *et al.*, 1995b).

Na etapa de caracterização molecular do genoma do PLYV, que permitiu a construção de uma sequência consenso de 3226 nucleotídeos, correspondendo a aproximadamente 70% do genoma do PLYV, além da ORF CP, a análise dessa sequência também possibilitou a identificação da possível ORF POL. A análise de homologia da possível ORF POL mostrou que essa ORF apresenta motivos conservados presentes nas poliproteínas codificadas por várias espécies de sobemovírus [SBMV (Othman & Hull, 1995), SCPMV (Wu *et al.*, 1987), RYMV (Yassi *et al.*, 1994) e LTSV (Jeffries *et al.*, gen Bank no. acesso U31286, citado por Tamm & Truve, 2000) e CfMV (Mäkinen *et al.*, 1995b)]. Nessa poliproteína, o motivo GDD, característico das RpRds (Koonin, 1991; Koonin & Dolja, 1993; Zanotto *et al.*, 1996), foi identificado sugerindo que essa ORF é a que, provavelmente, codifica a polimerase viral. Por isso, acredita-se que a ORF POL é a que representa a ORF 2 dos sobemovírus. Nesse gênero de vírus, a extremidade carboxil-terminal da poliproteína é responsável por codificar a RpRd viral baseada na presença do motivo GDD. As RpRds de sobemovírus tem grandes similaridades com as RpRds de vírus de RNA fita simples, incluindo os polerovírus, enamovírus e barnavírus (Koonin, 1991; Koonin & Dolja, 1993). Essas posições têm sido usadas para avaliar a posição taxonômica do SCPMV em relação a outros vírus de RNA de fita positiva. (Koonin & Dolja, 1993). Esse parâmetro permitiu agrupar as espécies SCPMV, BWYV, PLRV e PEMV-1 dentro do supergrupo “Sobemo-like”, indicando que as RpRds de polerovírus são mais similares aos dos sobemovírus do que as RpRds dos luteovírus. A análise de homologia de nucleotídeos da polimerase viral do PLYV mostrou que essa proteína apresenta os maiores valores de similaridade com as espécies de sobemovírus e a espécie de polerovírus comparada nesse trabalho (**Tabela 1.4**

e 1.5). Esse maior relacionamento do PLYV com os sobemovírus e polerovírus mostra que, da mesma forma que é descrita para os sobemovírus, o PLYV também apresenta a sua polimerase relacionada aos polerovírus. Isso reforça a suposição de que a ORF POL é a que provavelmente codifica a polimerase viral e que o PLYV é provavelmente uma espécie pertencente ao gênero *Sobemovirus*. Se comparados a provável organização genômica do SCPMV e do CfMV podemos observar várias semelhanças com o PLYV (Figura 1.18). Primeiro, o PLYV provavelmente apresenta a ORF da poliproteína sobreposta à ORF da proteína do capsídeo, a semelhança do que é observado para essas duas espécies. Os sobemovírus geralmente apresentam uma sobreposição em torno de 200 nucleotídeos. Segundo, a presença de domínio que indica que a proteína VPg é codificada pelo RNA viral desses vírus é evidente na sequência nucleotídica proposta para o PLYV (Figura 1.16; ORF 3). E por último, a localização do domínio GDD, na porção carboxil terminal indica que a RpRd é expressa por regiões comuns entre essas três espécies.

Apesar da ORF 2 dos sobemovírus apresentar o motivo da VPg na extremidade 5' da poliproteína, no PLYV esse motivo só foi identificado na fase de leitura 3 (nesse trabalho denominada de ORF3) da porção seqüenciada. Esse motivo é representado por uma sequência consenso WAD, seguida de uma região rica em D e E, que antecede uma sequência nucleotídica (UUUAAAC), indicadora da mudança de fase do ribossomo (“ribossomal frameshift -1”) [SBMV (Othman & Hull, 1995), SeMV (no. de acesso no banco de dados AY004291), SCPMV (Wu *et al.*, 1987), RYMV (Yassi *et al.*, 1994), LTSV (Jeffries *et al.*, gen Bank no. acesso U31286, citado por Tamm & Truve, 2000) e CfMV (Mäkinen *et al.*, 1995b)]. A presença dessa sequência conservada indica que o PLYV, também, deve codificar a proteína VPg, presente em todos os sobemovírus. Essa organização diferente encontrada para o PLYV, pode ser atribuída a um erro na sequência consenso obtida, o que pôde ter colocado a proteína VPg fora de fase de leitura com a poliproteína. Além disso, a hipótese de uma organização genômica diferente para o PLYV, apresentando um terceiro tipo de organização genômica entre os sobemovírus não pode ser



**Figura 1.18:** Modelo proposto para a possível organização das ORFs da poliproteína (ORF<sup>POL</sup>) e da proteína do capsídeo (ORF<sup>CP</sup>) do PLYV, comparada com a organização genômica das espécies de sobemovírus: SCPMV e CfMV. A representação esquemática mostra a possível organização da ORF<sup>POL</sup> sobreposta à ORF<sup>CP</sup>, à semelhança do que é observado para as diversas espécies de sobemovírus (Tamm & Truve, 2000). Na figura a ORF<sup>POL</sup> representa possivelmente a ORFs 2 (SCPMV) ou a ORF 2a/2b (CfMV). A ORF<sup>CP</sup> representa possivelmente a ORF 3 (CfMV) ou a ORF 4 do SCPMV. A ORF 3 do PLYV pode representar uma possível fase de aberta de leitura identificada através da localização do domínio da VPg.

descartada (**Figura 1.18**). Essa nova disposição e expressão de proteínas parece combinar características encontradas para membros do grupo do SCPMV e vírus dos grupo do CfMV. Mesmo assim, a conclusão sobre a organização genômica definitiva para o PLYV só pode ser confirmada após o completo seqüenciamento do genoma.

Além dos motivos protéicos característicos da polimerase viral e da proteína VPg, a seqüência obtida também apresenta outros motivos conservados que estão presentes nas poliprotéínas de alguns sobemovírus. Dentre eles, podemos destacar a seqüência EGRFRWISSVSLVDQLVERMIFGPQN e HPAAEADISGFDWSVQDWELWAD, que apesar de não terem sido ainda relacionados com alguma função específica (Wu *et al.*, 1987; Yassi *et al.*, 1994; Othman & Hull, 1995), também foram identificados na seqüência elucidada para o PLYV.

Para se estabelecer a posição taxonômica de um novo vírus, como uma nova espécie dentro de um gênero, o ICTV requer que as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos que compõem esse novo táxon, sejam comparadas com aquelas apresentadas por espécies relacionadas, as quais já possuem a sua classificação elucidada. Para a proposição de novas espécies dentro do gênero *Sobemovirus*, o ICTV considera que diferença na seqüência igual ou superior a 40 % entre espécies seja o limite requerido (Hull *et al.*, 2000). As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos do PLYV, que compõem os genes da poliproteína e da proteína do capsídeo, elucidadas nesse trabalho, indicaram que quando essas seqüências são comparadas àquelas disponíveis para diversas espécies de sobemo-, necro-, tombus-, polero- e enamovírus, disponíveis em bancos de dados, o PLYV mostrou os maiores valores de similaridade de nucleotídeos para a poliproteína com os sobemovírus LTSV (52,6 %), SBMV (51,7 %), RYMV (51,3 %) e SCPMV (49,7 %). Esse dado indica que o PLYV apresentou valores de similaridade de seqüência dentro dos padrões requeridos pelo ICTV para a proposição de nova espécie dentro do gênero *Sobemovirus*. Com a relação à homologia de seqüência de nucleotídeos da proteína do capsídeo observou-se que valores de similaridade em torno de 40 % também foram encontrados nas comparações



efetuadas com as mesmas espécies de vírus. Nessa comparação, no entanto, além dos maiores valores de homologia encontrados com os sobemovírus [SCPMV (47,3 %); LTSV (43,4 %), SBMV (42,5 %), CfMV (41,2 %) e RYMV (39,1 %)], o PLYV também apresentou maiores valores de similaridade com as espécies de necrovírus comparadas [TNV-A (42,9 %); OLV (41,0 %) e LWSV (41,0 %)], ao contrário do que foi observado para a poliproteína viral. Esse fato é conhecido para os sobemovírus, quando em estudos filogenéticos, tentou-se comparar a proteína do capsídeo do SCPMV e RYMV (Yassi *et al.*, 1994) com a de diversos outros vírus (Dolja & Koonin, 1991). Diferentemente, a proteína do capsídeo do SCPMV agrupou-se com a do TNV, ao invés de agrupar-se com as dos polerovírus, mostrando que a proteína do capsídeo do SCPMV e do TNV são filogeneticamente relacionadas. Isso difere para as proteases, VPgs e RpRd, as quais são mais relacionadas com as dos polerovírus. A semelhança da proteína do capsídeo do PLYV com a dos necrovírus, e não com a dos polerovírus, é mais uma similaridade encontrada entre o PLYV e os sobemovírus nesse trabalho.

A diferenciação de espécies empregada para os sobemovírus, tombusvírus, necrovírus e polerovírus difere significativamente daquela empregada para diferenciar novas espécies pertencentes a outros gêneros e famílias como os *Tospovirus* (Bezerra *et al.*, 1999), *Geminivirus* (Padidam *et al.*, 1997) e *Potyvirus* (Shukla *et al.*, 1994). No gênero *Tospovirus* por exemplo, além das características biológicas (círculo de hospedeiras, especificidade com o tripses vetor), aspectos moleculares, tal como a homologia do gene do nucleocapsídeo, (abaixo de 90 %), são critérios confiáveis para a separação de espécies de tospovírus. Para os geminivírus, homologia em torno de 90 % na proteína do capsídeo é considerada limite para a diferenciação de espécies dentro do gênero. Os baixos valores de homologia observados nessa comparação mostram que essa característica não permite definir o PLYV como um sobemovírus, no entanto, essa característica também não diferencia as espécies de sobemovírus já definidas de outros gêneros. Portanto, a determinação da posição taxonômica dos vírus isométricos está principalmente ligada

à elucidação da organização genômica dos vírus, assim como, na identificação da presença de motivos conservados presentes nas proteínas codificadas pelos vírus, notadamente na poliproteína e na proteína do capsídeo (Morozov & Solovyev, 1999).

Embora as características moleculares sejam muito importantes na diferenciação de espécies, as características biológicas, também, são consideradas para a classificação politética de novas espécies de acordo com o ICTV. Nesse trabalho, características citopatológicas foram estudadas e as análises desses resultados mostraram algumas semelhanças entre o PLYV e os sobemovírus através dos efeitos citopáticos, que ambos induzem nas células de suas hospedeiras. As partículas virais são encontradas espalhadas, predominantemente, nos tecidos vasculares, tecidos do mesófilo, epiderme, células-guarda e bainha vascular. Nos tecidos vasculares, a localização das partículas virais nos vasos do xilema e nas células do parênquima do xilema também é característica dos sobemovírus (Tamm & Truve, 2000). Partículas do PLYV não foram localizadas nos tecidos do floema. De maneira similar, a presença de partículas virais no parênquima floemático e nos elementos crivados é ocasional para os sobemovírus. Subcelularmente, partículas virais do PLYV têm sido detectadas no citoplasma e no vacúolo das células infectadas. Geralmente, essas partículas apresentam-se espalhadas ou agregadas em feixes. Nenhuma localização de partículas tem sido mostrada para o PLYV ou para os sobemovírus nas mitocôndrias e cloroplastos. Porém, partículas de sobemovírus são geralmente encontradas no núcleo (Francki *et al.*, 1985). Isso têm sido relacionado à presença de um peptídeo motivo presente na extremidade amino terminal da proteína do capsídeo desses vírus (Yassi *et al.*, 1994), que é similar ao motivo de ligação ao núcleo (Dingwall & Laskey, 1991). Como o PLYV não apresenta essa sequência motivo no N-terminal da proteína do capsídeo, a ausência de partículas virais no núcleo era esperada.

As partículas isométricas encontradas em alta concentração nos tecidos das folhas e de raízes de plântulas de mamão analisadas nesse estudo são de vírions do PLYV *in situ*, como

demonstrado pela imunomarcção com ouro coloidal, usando-se o anti-soro contra a proteína do capsídeo do PLYV. Também foi demonstrado que as partículas dos extratos brutos de folhas infectadas pelo PLYV foram morfológicamente indistinguíveis daquelas presentes em preparações altamente purificadas e infectivas (Silva *et al.*, 1997). As amostras controle (plantas saudas, ausência de soro específico ou o uso de anti-soro contra outros vírus não relacionados (dados não mostrados) nas reagiram sorologicamente quando amostras infectadas com o PLYV foram testadas. A marcação nas células infectadas foi intensa, confirmando a alta concentração do PLYV nas plantas infectadas. Quando vírions estavam presentes no citoplasma eles foram algumas vezes difíceis de serem distinguidos dos ribossomos exceto quando eram abundantes ou formavam agregados. No vacúolo, no entanto, eles eram facilmente visíveis mesmo quando dispersos. Notavelmente, as partículas do PLYV tenderam a formar arranjos tubulares os quais são semelhantes aqueles descritos para o fabavírus *Broad bean wilt virus* (BBWV, Taylor & Stubbs, 1972). No caso do PLYV, os tubos consistiram de vírions arranjados em grupos de 5 partículas por volta, enquanto alguns isolados do BBWV, os tubos mostram 9 partículas em secção transversal ou apresentam um perfil quadrado (Silva *et al.*, 1997). Não existe relato anterior de estruturas poliedrais como as produzidas pelo PLYV. Estruturas do tipo viroplasma, similares àquelas observadas nesse estudo têm sido relatadas em associação com alguns outros vírus isométricos como tobusvírus e bromovírus (Francki, *et al.*, 1985; Russo *et al.*, 1987), mas a função permanece desconhecida. Nesse estudo, estruturas do tipo viroplasma reagiram com anti-soros contra o PLYV, mas a reação positiva foi atribuída à presença dos vírions associados a elas. A presença constante de vírions no vacúolo de células aparentemente intactas é intrigante.

Além dos dados moleculares e dos efeitos citopáticos apresentados nesse trabalho, várias características biológicas do PLYV, também se assemelham àquelas apresentadas por várias espécies do gênero *Sobemovirus*. Com relação ao círculo de hospedeiras, à semelhança das espécies que compõem esse gênero de vírus de planta, o PLYV também é bastante restrito.

Apesar de exaustivas tentativas de inoculação do PLYV em hospedeiras alternativas, Kitajima *et al.* (1992a), Lima *et al.* (1994) e Silva (1996) mostraram que o PLYV só foi capaz de infectar plantas de mamão. Nessas plantas, o vírus desenvolve sintomas de clorose, mosqueado e deformação foliar, comprometendo o desenvolvimento das plantas e a produção de frutos em condições experimentais. Essa sintomatologia é comum para as espécies de sobemovírus, em diversos tipos de hospedeiras, podendo causar grandes perdas nas plantas infectadas (Francki *et al.*, 1985).

Apesar de ainda não se conhecer o vetor responsável pela disseminação do PLYV, a semelhança mostrada nesse trabalho entre o PLYV e os sobemovírus pode ajudar a encontrar o possível vetor desse vírus na natureza. É possível que, como os sobemovírus, o PLYV possa ser transmitido por outras espécies de afideos ou besouros, que não as testadas por Kitajima *et al.* (1992a) e Silva (1996), respectivamente. Recentemente, a semente de mamão foi considerada um agente de disseminação do PLYV, visto que a sobrevivência do vírus no tegumento foi observada por Camarço *et al.* (1998). Os autores encontraram o vírus na superfície das sementes de mamão provenientes de frutos infectados. Apesar dessas sementes não terem dado origem a nenhuma planta infectada, os autores consideraram que as sementes poderiam constituir uma fonte de inóculo para a transmissão. A transmissão via semente é uma característica comum para os membros do gênero *Sobemovirus*. Camarço *et al.* (1998) também investigaram a possível transmissão do PLYV pelo solo. De acordo com os autores, o cultivo de planta de mamão sadio em solos provenientes da rizosfera de plantas infectadas com o PLYV, ou em solo esterilizado e irrigado com extrato de planta infectada diluído na água, é possível recuperar plantas infectadas com o PLYV. Essa forma de transmissão foi relatada para o RYMV, o qual pode contaminar a água de irrigação através de exudados da planta infectada (Hull, 1995). Também, o SBMV tem a capacidade de sobreviver no solo e ser transmitido na ausência de um vetor (Seghal & White, 1989). A presença de partículas virais do PLYV em células rompidas da epiderme da raiz pode

explicar essa forma de transmissão para o PLYV.

Esse trabalho reuniu as características citopatológicas do PLYV com aquelas moleculares, para sugeri-lo como uma possível espécie pertencente ao gênero *Sobemovirus*, contrariando as suposições anteriores que sugeriam que o PLYV seria um tombusvírus (Silva *et al.*, 1997). Mesmo assim, a elucidação completa do genoma deve ser concluída para que uma classificação definitiva seja apresentada para o PLYV.

## CAPÍTULO II

### INFLUÊNCIA DA SEQUÊNCIA LÍDER E DO CONTEXTO EM TORNO DO CÓDON DE INICIAÇÃO DA PROTEÍNA P22 NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO *TOMATO BUSHY STUNT VIRUS*

O *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) foi escolhido como um sistema de estudo de expressão de proteínas virais devido às suas similaridades [morfologia e tamanho da partícula, tamanho do ssRNA e RNA subgenômico, efeitos citopáticos, possível transmissão pelo solo (Camarço *et al.*, 1998) e homologia de peptídeos da proteína do capsídeo] com o *Papaya lethal yellowing virus-PLYV* (Silva *et al.*, 1997). Por isso, todo o trabalho apresentado nesse capítulo foi realizado no Laboratório de Virologia Molecular da Universidade do Texas (Texas A&M University), no programa doutorado "sandwich". O grupo de trabalho, no referido laboratório, foi coordenado pelo Dr. Herman B. Scholthof que possui uma vasta experiência com a biologia molecular de vírus do gênero *Tombusvirus* e *Carmovirus*. Devido às semelhanças entre o PLYV e o TBSV, tinha-se por objetivo principal aproveitar o treinamento desenvolvido com o TBSV para futuramente empregá-lo no estudo do PLYV em plantas. Essas informações poderiam não só auxiliar na sua classificação, mas também levar ao entendimento dos mecanismos bioquímicos envolvidos na patogênese viral. A aplicação das mesmas metodologias para o estudo de vírus relacionados, representaria a implementação das mesmas tecnologias pelo Grupo de Virologia de Plantas da Universidade de Brasília. Dessa maneira, estudando-se a regulação da tradução de proteínas do TBSV, como um exemplo, pretendia-se utilizar os dados gerados em estudos comparativos sobre a regulação da expressão gênica do PLYV.

Visando fornecer subsídios para o entendimento das estratégias empregadas nesse trabalho para o estudo da expressão de proteínas do TBSV, as características gerais do vírus, a

organização genômica e os mecanismos de regulação da expressão gênica são apresentadas a seguir.

## **1. Características gerais do TBSV**

### **1.1. Importância econômica**

O TBSV foi por muito tempo estudado mais como uma curiosidade científica do que como um patógeno economicamente importante, em virtude da sua rara ocorrência na natureza. No entanto, a partir da década de 60, o número de isolados do TBSV, bem como o de vírus sorologicamente relacionados à essa espécie, tem aumentado significativamente, causando sérias perdas para muitas plantas cultivadas (Martelli, 1981).

### **1.2. Círculo de hospedeiras e distribuição do vírus**

Até o momento, diversos isolados desse vírus têm sido encontrados na natureza infectando mais de 20 espécies de plantas dicotiledôneas, incluindo as de ciclo anual ou perene e de hábito variado como as trepadeiras, as rastejantes, as ornamentais e os cactus nas bacias do Mediterrâneo e em diferentes países do continente Americano e Europeu (Martelli, 1981). No Brasil, ainda não existe relato da ocorrência desse vírus.

### **1.3. Transmissão do vírus**

A disseminação desse vírus na natureza pode se dar por propagação de material vegetativo contaminado, contato ou através de sementes. Além disso, a facilidade pela qual esses vírus são encontrados em ambientes naturais, tais como: a superfície das águas e solo (Buttner & Nienhaus, 1989; Li *et al.*, 1992; Fuchs *et al.*, 1994), fazem com que esses vírus sejam adquiridos sem a necessidade da presença de vetores. Experimentalmente, a transmissão é feita por inoculação mecânica para uma gama de hospedeiros relativamente grande.

### **1.4. Características da partícula**

O TBSV apresenta partículas isométricas com contorno granular e um diâmetro de aproximadamente 30 nm, exibindo uma simetria icosaedral (T=3) e 180 subunidades protéicas.

Estudos estruturais refinados conduzidos por Harrison *et al.* (1978) para o TBSV mostraram que cada subunidade protéica apresenta os domínios **R**, **S** e **P**. O domínio **R**, onde se encontra localizada a região amino terminal da proteína do capsídeo, apresenta seus aminoácidos interagindo com o RNA. A região **S** conecta-se ao domínio **R** por um braço, e é considerada a região do domínio conservado entre as proteínas do capsídeo presentes nas espécies dessa família. Por último, o domínio **P**, que contém a região da extremidade carboxil da proteína, encontra-se projetado para o exterior da partícula.

### 1.5. Sintomatologia

O TBSV ficou conhecido por causar nanismo acompanhado por uma deformação foliar e amarelecimento das folhas baixas em tomates cultivados. O vírus freqüentemente limita-se ao sistema radicular, mas também pode invadir outras partes da planta. O estabelecimento da doença pode ser observado através de sintomas como os de mosqueado, encarquilhamento, deformação foliar e algumas espécies de vírus podem infectar hospedeiras assintomáticas (Martelli & Russo, 1995).

### 1.6. Posição taxonômica do TBSV

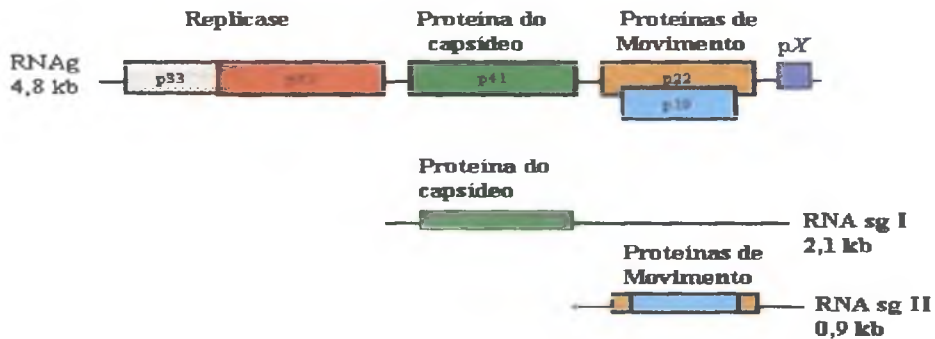
Durante o 9º Congresso Internacional de Virologia realizado em Glasgow, na Escócia, em 1993, propôs-se a criação da família *Tombusviridae*, que foi aprovada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Martelli & Russo, 1995). Nesta ocasião, foram incluídos nessa família, dois gêneros de vírus que possuíam características comuns, mas distintas de outros grupos de vírus: o gênero *Tombusvirus* e o gênero *Carmovirus* (Martelli & Russo, 1995). Os autores consideraram o TBSV como a espécie-tipo do gênero *Tombusvirus*, pertencente à família *Tombusviridae*. Recentemente, com o progresso das informações sobre os relacionamentos evolucionários, que emergiram de estudos comparativos das seqüências de nucleotídeos e proteínas, a taxonomia dessa família sofreu modificações. Atualmente, são reconhecidos pelo ICTV cinco gêneros: *Tombusvirus*, *Carmovirus*, *Machlomovirus*, *Necrovirus* e *Dianthovirus*. A



separação entre esses gêneros reside, principalmente, na diferença que os mesmos apresentam na organização dos seus RNAs genômicos (Pringle, 1998).

### 1.7. Características moleculares

O TBSV apresenta um genoma de RNA positivo monopartido com 4.7 kb, que codifica cinco proteínas funcionais. Na terminação 5' do genoma do TBSV está localizada a ORF que codifica para uma proteína de 33 kDa, que foi sendo proposta por Hillman *et al.* (1989) como envolvida com a replicação viral (**Figura 2.1**). No entanto, não foram encontrados motivos característicos dessa função. Logo a seguir, no genoma é encontrada a ORF que codifica para a proteína de 92 kDa. Esta proteína é originária do produto de fusão, decorrente da presença do códon de terminação âmbar [âmbar: códon fraco de terminação (UAG)] apresentado por alguns vírus, o qual não é reconhecido como códon de terminação pelos ribossomos, que continuam a tradução resultando em uma proteína de fusão. Essa proteína (P92) apresenta motivos altamente conservados, encontrados em subunidades catalíticas da RNA polimerase dependente de RNA e é traduzida pelo mecanismo denominado “readthrough”, devido à presença do códon âmbar (Hillman *et al.*, 1989). A proteína do capsídeo (41 kDa) é codificada pela ORF 3, e as proteínas P19 e P22, relacionadas com sintomatologia e movimento são codificadas por duas ORFs próximas à extremidade 3', que se sobrepõem (ORF 4 e 5). Os produtos das ORFs 3, 4 e 5 são traduzidos a partir de dois mRNAs subgenômicos, os quais são sintetizados durante a infecção (**Figura 2.1**). Os RNAs do TBSV, assim como dos demais membros desse gênero, não são poliadenilados, e baseado nas análises com o *Carnation italian ringspot virus* (CIRV), também não possuem a estrutura “cap” na terminação 5' (Russo *et al.* 1994). A estrutura “cap” na extremidade 5' é formada por um resíduo de 7-metilguanosina ligado ao primeiro nucleotídeo por um grupo trifosfato (5'-a-5'), representada por m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')N (Alberts *et al.*, 1994).



**Figura 2.1:** Representação esquemática da organização genômica do TBSV. O esquema mostra as cinco ORFs codificadas pelo TBSV. Os tamanhos dos produtos de cada ORF são mostrados dentro dos retângulos representativos das ORFs, com suas respectivas funções citadas acima dos retângulos. As ORFs que codificam as proteínas P33 e P92 são traduzidas diretamente do RNA genômico. A proteína P92 (92K) é produto da “readthrough” da proteína P33 (33K). As ORFs das proteínas P41, P19 e P22, são traduzidas a partir dos mRNAs subgenômicos (sg) I (2,1 kb) e II (0,9 kb), respectivamente. Os tamanhos de cada RNA encontram-se indicados na figura. Observe o detalhe de sobreposição das ORFs que expressam as proteínas P22 e P19. Essas são traduzidas a partir de um único mRNA subgenômico (II), através do mecanismo denominado “leaky scanning” dos ribossomos. O TBSV é destituído de “cap” ou cauda poli(A) nas suas extremidades 5’ e 3’ respectivamente, ou mesmo de qualquer outra estrutura secundária conhecida. Além dessas ORFs, o TBSV apresenta uma pequena ORF denominada ORF pX (produto de aproximadamente 8 kDa), localizada abaixo das ORFs que codificam para as proteínas P22 e P19, respectivamente. Figura adaptada de Martelli & Russo, (1995).

Além dessas ORFs, o TBSV, assim como todos os tombusvírus, possuem uma pequena ORF designada de gene *pX*. Esta ORF está localizada após as ORFs 4 e 5 (P22 e P19, respectivamente) e o seu comprimento varia entre os tombusvírus (**Figura 2.1**). Para o TBSV, o gene *pX* pode potencialmente codificar um produto de aproximadamente 8 kDa (Boyko & Karasev, 1992). Oster *et al.* (1998) sugeriram que uma seqüência com cerca de 167 nucleotídeos, chamada de região 3,5, localizada na dentro da ORF *pX*, está relacionada com a promoção da tradução eficiente para o TBSV. Posteriormente, essa sugestão foi confirmada por Wu & White (1999), que demonstraram que um segmento na extremidade 3' do genoma, incluindo a região 3,5, está envolvido na tradução independente de "cap".

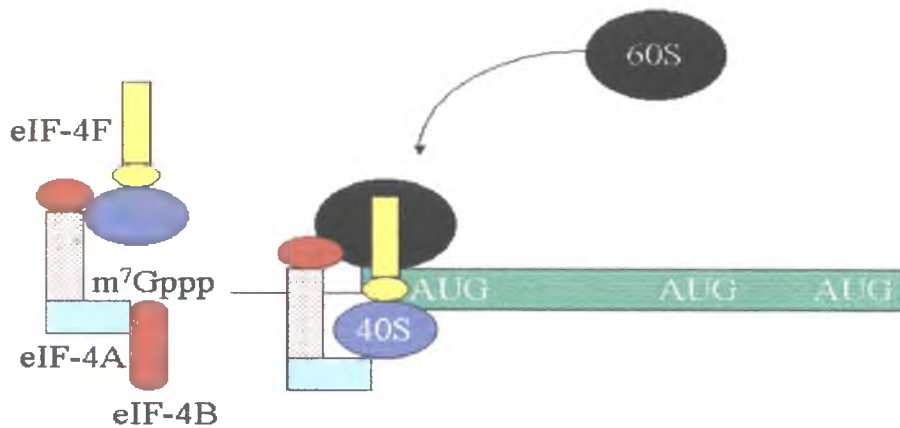
### 1.8. "Leaky Scanning"

Tomando como exemplo a organização genômica do TBSV, é bem claro que ao contrário de muitos mRNAs eucarióticos (monocistrônicos), os mRNAs virais são policistrônicos, contendo códons de iniciação (AUG) localizados internamente. Mesmo assim, são acessíveis ao sistema de tradução eucariótica, em virtude da habilidade que os ribossomos possuem de rastrear o mRNA mensageiro e reconhecer sítios de ligação mais favoráveis à iniciação da tradução, em adição ou em substituição ao primeiro AUG. Esse modelo é denominado de "leaky scanning" e tem sido demonstrado para vários sistemas de vírus animal (Fouillot *et al.*, 1993) e de planta (Dinesh-Kumar & Miller, 1993).

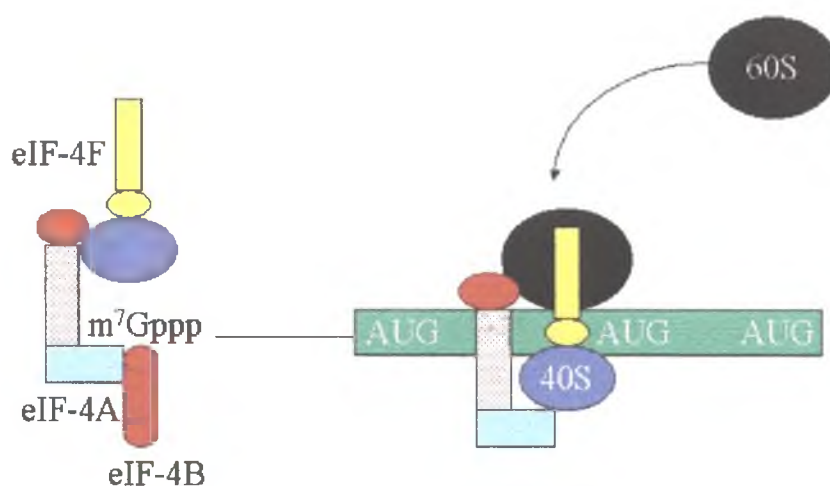
Esse modelo segue o princípio básico do mecanismo proposto por Kozak (1986), mas com algumas modificações. Para Kozak (1986), a tradução de mRNAs monocistrônicos ocorre a partir do momento no qual o fator de transcrição eIF-4F liga-se à estrutura "cap", presente na extremidade 5', seguido dos fatores eIF-4A e eIF-4B, que se ligam ao mRNA através da associação com eIF-4F e o "cap". Juntos, eIF4A e eIF-4B funcionam como uma RNA-helicase dependente de ATP que desfaz qualquer estrutura secundária, no extremo 5', que possa ser capaz de inibir a varredura da subunidade 40S. Após a remoção da estrutura secundária, a subunidade

40S (contendo eIF-2, GTP e o iniciador Met-tRNA ligados) associa-se à extremidade 5' do mRNA e começa a "varrer" a seqüência líder. Quando a subunidade 40S atinge o códon de iniciação, a subunidade 60S junta-se ao complexo para criar um ribossomo 80S ativo, garantindo a tradução (**Figura 2.2**). Dessa maneira, o processo de tradução eucariótica pode ser dividido em três fases: **(1)** a iniciação, na qual a subunidade ribossomal 80S monta-se no códon de iniciação do mRNA e inicia a formação do primeiro peptídeo ligado à proteína nascente; **(2)** a elongação, que consiste no deslocamento do ribossomo ao longo da ORF, resultando na produção da proteína; **(3)** a terminação, que resulta na liberação de ambos: a subunidade 80S e a proteína completa (Gallie, 1996).

O mecanismo denominado "leaky scanning" difere do modelo proposto por Kozak (1986), porque a regulação da tradução está sob a influência de vários fatores (**Figura 2.3**). Um deles é a presença de uma seqüência consenso favorável, em torno do códon AUG, que possa garantir início do sistema de tradução. Nos animais, de uma maneira geral, essa seqüência é representada por CCACCAAUGG (Kozak, 1984) e tem duas posições altamente conservadas: uma purina, preferencialmente um A, na posição -3 (em relação ao AUG), que é considerada o resíduo mais conservado em vertebrados, plantas e fungos. Uma mutação nessa posição afeta a tradução profundamente, muito mais do que em qualquer outro nucleotídeo. Nos casos onde o resíduo da posição -3 não é uma purina, as posições remanescentes, particularmente a posição +4, exercem a sua influência. Em plantas, comparações de seqüências em torno do códon de iniciação mostraram que a seqüência consenso é representada por AACAAAUGGC (Joshi, 1987), apesar de apresentar controvérsias a respeito das posições nucleotídicas que regulam mais fortemente a escolha do início da tradução.



**Figura 2.2:** Representação esquemática de um mRNA típico proposto por Kozak (1989) para a iniciação da tradução de um organismo eucariótico. Os fatores de iniciação eIF-4F, eIF-4A e eIF-4B são mostrados associados com a estrutura "cap" presente na terminação 5' do mRNA. O papel dos fatores de iniciação é o de carrear o mRNA, as subunidades ribossomais e o iniciador Met-tRNA para que juntos possam montar um complexo de tradução funcional no códon de iniciação. Assim, o fator de transcrição eIF-4F liga-se à estrutura "cap" presente na extremidade 5', seguido dos fatores eIF-4A e eIF-4B que se ligam ao mRNA através da associação com eIF-4F e o "cap". Juntos, eIF4A e eIF-4B funcionam como uma RNA-helicase dependente de ATP que desfaz qualquer estrutura secundária na extremidade 5', que possa inibir a varredura pela subunidade 40S. Após a remoção da estrutura secundária, a subunidade 40S (a qual eIF-2, GTP e o iniciador Met-tRNA são ligados) associa-se à extremidade 5' do mRNA e então começa a varrer a seqüência líder não traduzida. Uma vez que a subunidade 40S atinge o códon de iniciação, a subunidade 60S junta-se ao complexo para criar um ribossomo 80S ativo para garantir a tradução. AUG: códon de iniciação da tradução. 40S e 60S são as unidades ribossomais.



**Figura 2.3.** Representação esquemática de um mRNA baseado no modelo típico proposto por Kozak (1986), denominado "leaky scanning". À extremidade 5' encontram-se os fatores de tradução ligados à estrutura "cap". No segundo, o códon de iniciação AUG, a subunidade ribossomal 40S, junto com os fatores de tradução, associa-se à subunidade ribossomal 60S, para formar o complexo de tradução 80S. A figura mostra o complexo de tradução sendo montado no códon de iniciação (AUG), localizado internamente, ao invés do primeiro, como normalmente ocorre para os mRNAs monocitrônicos de eucariotos. Isto é possível devido à habilidade que os ribossomos possuem de rastrear o mRNA mensageiro e reconhecer sítios de ligação mais favoráveis à iniciação da tradução, em adição ou em substituição ao primeiro AUG, como no caso dos mRNAs virais policitrônicos.

Em alguns estudos a posição -3 não parece ser um importante modulador da tradução (Lehto & Dawson, 1990). Em outros casos, modificações simultâneas de nucleotídeos nas posições -3, +4 e +5 evidenciaram a importância de uma ou mais dessas posições na regulação da tradução. RNAs mensageiros em que, no primeiro códon AUG, faltam esses nucleotídeos têm uma propriedade especial de iniciar a tradução no primeiro e no segundo códon AUG, produzindo duas proteínas a partir de um único mRNA (McElroy *et al.*, 1991).

A importância que essas posições exercem sobre a regulação da tradução de mRNAs virais bistrônicos em plantas foi primeiramente demonstrada por Johnston & Rochon (1996). Os autores, investigando a influência da sequência contexto e do comprimento da sequência líder sobre a regulação da tradução de duas proteínas codificadas pelo RNA subgenômico de 0.9 kb (p20 e p21) do *Cucumber necrosis virus* (CuNV), mostraram que pequenas substituições de nucleotídeos em torno do AUG de p21 são suficientes para modificar a regulação da tradução dessas duas proteínas que se sobrepõem. Os autores demonstraram que substituições de nucleotídeos introduzidas nas posições -3 e +4 em relação ao códon de iniciação AUG de P21, são favoráveis quando essas posições são ocupadas por purinas. No entanto, substituições nas posições +5, só são claramente demonstradas quando as posições -3 ou +4 são ocupadas por pirimidinas. Além disso, os autores observaram que o aumento do comprimento da sequência líder do mRNA subgenômico afetou negativamente a expressão da proteína (P20) localizada logo após o códon de iniciação de P21. Essas observações obtidas por Johnston & Rochon (1996) foram as primeiras que evidenciaram a presença de "leaky scanning" como um mecanismo regulatório da expressão das proteínas localizadas na extremidade 3' dos tombusvírus.

Apesar do grande volume de dados nessa área, a existência de um sistema genético que pudesse revelar novas informações a respeito dos mecanismos que regulam a expressão de proteínas virais *in vivo*, coordenando-as às suas atividades biológicas, só foi recentemente relatado por Scholthof *et al.* (1999). Os autores demonstraram a relevância biológica de tal

sistema, associada ao mecanismo de tradução das duas proteínas codificadas (P19 e P22) por genes sobrepostos, localizados na terminação 3' do RNA genômico do TBSV e traduzidos a partir do RNA subgenômico II. A sequência nucleotídica ao redor do códon de iniciação de P22 mostra um baixo grau de similaridade (GUUCAUGGA) com a sequência consenso ótima para a tradução em plantas (Joshi, 1987), enquanto o códon de iniciação de P19 (AACCAUGGA) forma um contexto mais similar à sequência ótima. Essas observações levaram à suposição de que o mecanismo que opera sob a expressão dessas duas proteínas é o "leaky scanning", à semelhança do que foi observado para o CNV (Johnston & Rochon, 1996). Por isso, Scholthof *et al.* (1999), para provar essa hipótese, primeiramente construíram um mutante cujo contexto de iniciação de P22 foi substituído pelo contexto de P19 e vice-versa. Os resultados mostraram uma acumulação da proteína P22 *in vitro* e *in vivo* aumentada em relação ao isolado original (pTBSV-100). Esse aumento da proteína P22 foi acompanhado por um decréscimo severo na tradução da proteína P19. As evidências desse trabalho sugerem que o contexto relativamente fraco em torno de P22 provoca uma alta incidência de "leaky scanning" dos ribossomos que, subsequentemente, iniciam a tradução no contexto ótimo do AUG de P19. A partir dessa primeira observação, os mesmos autores, a fim de otimizar ainda mais o códon de iniciação da tradução de P22 utilizaram mutações sítio-dirigidas e induziram uma mudança que causou uma alteração substancial na taxa de expressão da referida proteína *in vitro* e *in vivo*. Essa construção apresentava variações na sequência contexto (CCAAACCAUGG), na qual uma substituição na posição -3 (U → A) foi introduzida a fim de verificar se a base purina A era essencial para a super expressão de P22. Utilizando-se desse mutante, os autores mostraram que essa substituição estimulou altos níveis de expressão da proteína P22, em detrimento da expressão de P19, quando comparada com a inoculação da construção selvagem (pTBSV-100), que apresenta um contexto fraco (CCAGUUCAUGG), em torno do códon AUG de P22. Assim, essa observação se ajustou à hipótese de "leaky scanning" dos ribossomos proposta por Kozak (1989). Além dessas



modificações, outras também foram introduzidas em torno do códon de iniciação de P22, tais como: as mudanças nas posições -2 (U → C) e -4 (G → A). Porém, os efeitos isolados dessas mutações não foram estudados e não se sabe se a super expressão de P22 teve a influência das referidas variações. Para os autores, embora tenha ocorrido mudança na expressão de P22 e P19, nenhuma alteração foi observada na replicação viral ou no movimento em hospedeiras que suportam infecção sistêmica (*Nicotiana* spp.). No entanto, ensaios biológicos mostraram que, em hospedeiras de *Nicotiana* hipersensíveis, altas taxas de expressão de P22 conduziram a um aumento no tamanho das lesões mediadas pela proteína P19, enquanto aquelas induzidas pela proteína P22 tenderam a diminuir. Além disso, os níveis reduzidos de P19 preveniram o estabelecimento das necroses apicais letais nas plantas de *N. benthamiana* infectadas sistemicamente, enquanto que em hospedeiras de infecção sistêmica, como o espinafre, o aumento da taxa de expressão da proteína P22 impediu que TBSV infectasse-as sistemicamente.

Segundo Kozak (1995), o modelo de tradução baseado em “leaky scanning”, dependente da seqüência contexto em torno do AUG, exemplificado para o TBSV, só pôde operar porque estava ligado a outros fatores relevantes (Kozak, 1995). Entre eles podemos citar uma seqüência líder não traduzida pequena (aproximadamente de 16 nucleotídeos), ausência de uma estrutura secundária estável entre o AUG de P22 e P19 e a relativa proximidade entre os dois códons de iniciação (29 nucleotídeos).

Apesar da influência que a seqüência contexto em torno do AUG de P22 exerce sobre a expressão de ambas proteínas P22 e P19 do TBSV ter sido claramente demonstrada por Scholthof *et al.* (1999), a interferência do balanço na expressão de quaisquer dessas proteínas na regulação da expressão do gene que codifica a proteína do capsídeo (P41) era um fato desconhecido. Esse capítulo apresenta observações que mostram que alterações na seqüência contexto em torno do AUG de P22, afeta a expressão da proteína do capsídeo (P41). Além disso, o comprimento da seqüência líder como um fator que promove a alta incidência de “leaky

scanning" dos ribossomos é investigado sob a expressão de P19 e P22.

Sob o ponto de vista prático, essas informações são extremamente valiosas na análise de novas seqüências gênicas completas que são geradas. Kozak (1996) destacou essa importância listando uma série de seqüências que tiveram que ser novamente interpretadas devido à desconsideração dos aspectos que regulam a escolha do códon de iniciação da tradução. Segundo a autora, aspectos como: o contexto em torno do códon de iniciação (AUG) potencial e a presença de códon de terminação antes do mesmo, são usados para marcar o extremo 5' de uma ORF. Para Kozak (1996) esses não são critérios suficientes na indicação de seqüências codificadoras completas, pois podem manter seqüências derivadas de introns na extremidade 5'.

## **2. Hipótese do trabalho:**

A super expressão da proteína P22 do TBSV afeta a expressão de P41.

## **3. Objetivos do trabalho:**

**3.1.** Estudar a regulação da tradução das proteínas P19 e P22 do TBSV *in vitro* e *in vivo* e determinar se a expressão dessas duas proteínas está sob a influência do mecanismo denominado "leaky scanning".

**3.2.** Investigar se a expressão de P22 e P19 é influenciada por um contexto mais favorável à tradução e por uma seqüência líder maior em torno do códon de iniciação da tradução da proteína P22.

**3.3.** Investigar se a expressão de mutantes contendo um contexto melhorado em torno de P22 pode influenciar na expressão da proteína do capsídeo (P41)

## MATERIAIS E MÉTODOS

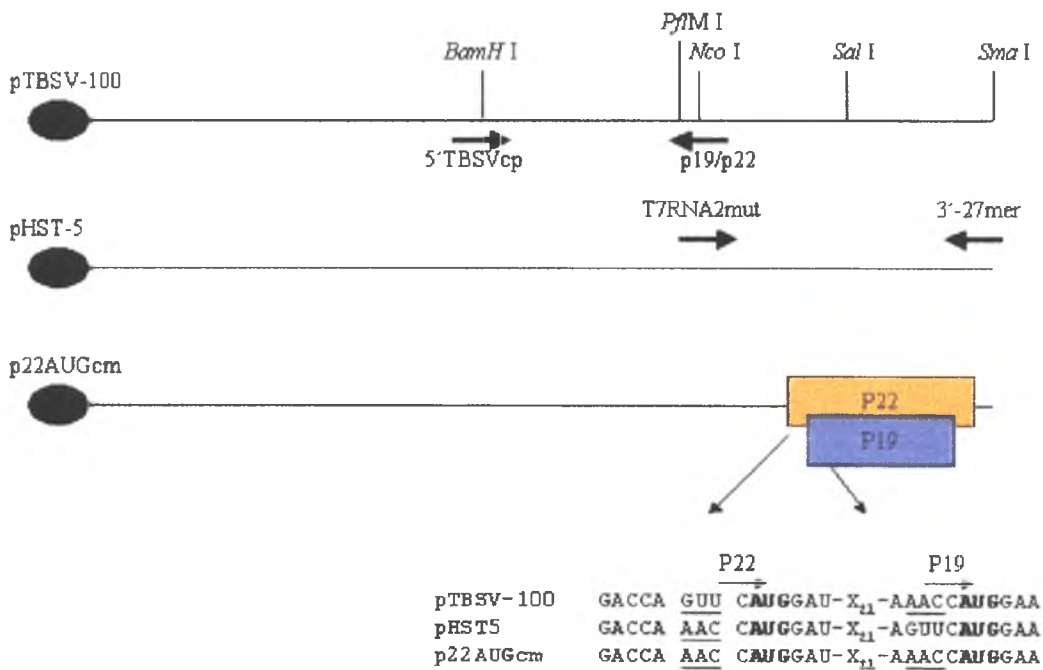
### 1. Efeito da super expressão da proteína de movimento (P22) na acumulação da proteína do capsídeo (P41):

**1.1. Construção dos plasmídeos recombinantes.** Plasmídeos recombinantes foram construídos de acordo com os protocolos padrões de biologia molecular descritos por Sambrook *et al.* (1989). Esses plasmídeos estavam disponíveis para serem utilizados antes do início deste trabalho e a seguir, a maneira como foram construídos é descrita para o melhor entendimento dos resultados.

**1.1.1. p22AUGcm** [vetor contendo a seqüência contexto em torno de P22 mais favorável (melhorado) à tradução em relação ao isolado selvagem-pTBSV-100, que contém a seqüência completa do TBSV clonada no vetor]. Para a construção desse vetor, um oligonucleotídeo senso (T7RNA2mut) foi usado em combinação com um anti-senso (3'-27mer) em reações de PCR, utilizando-se pTBSV-100 como molde (**Figura 2.4**). O oligonucleotídeo T7RNA2mut contém o promotor da polimerase T7, imediatamente antes das seqüências correspondentes à extremidade 5' do RNA subgenômico II e apresenta seqüências mutantes ao redor do ATG de P22, na extremidade 3' do oligonucleotídeo. O 3'-27mer foi desenhado de maneira que este pudesse cobrir o sítio de restrição para *Sma* I e anelar-se na extremidade 3' do TBSV. O fragmento amplificado dessa reação foi digerido com *Pf*MI e *Sal*I, para substituir o fragmento correspondente de pHST5 (Scholthof *et al.*, 1999). O pHST5 foi produzido através dos oligonucleotídeos 5' TBSVcp (senso) e P19/P22 (anti-senso), para substituir o fragmento correspondente em pTBSV-100, localizado entre os sítios de *Bam*H I e *Pf*M I. Esse plasmídeo foi utilizado porque ele continha mutações em ambos os códons de iniciação das proteínas P22 e P19. Ou seja, nesse plasmídeo, P22 está sob a seqüência contexto (promotor) de P19, e a proteína P19 sob o controle de tradução da seqüência contexto de P22. Sem a utilização desse plasmídeo intermediário, durante a digestão com *Pf*M I, o contexto melhorado de P22 seria perdido. A

introdução do novo fragmento recuperou as seqüências originais ao redor do ATG da perdido. A introdução do novo fragmento recuperou as seqüências originais ao redor do ATG da proteína P19 do pTBSV-100 (Hillman *et al.*, 1989), incluindo o sítio original *Nco* I. Conseqüentemente, p22AUGcm continha dois sítios *Nco* I, um no ATG de P22 e um no ATG de P19 (Scholthof *et al.*, 1999).

**1.1.2. p19T** (vetor contendo a seqüência de isolado original, com P19 truncada). Esse plasmídeo foi proveniente da construção pHS138, que apresentava o gene GUS clonado em uma região de clonagem múltipla do TBSV (**Figura 2.5**) e P19 truncada. Essa mutação foi introduzida através de PCR, utilizando-se, oligonucleotídeos desenhados para as regiões que compreendem aos nucleotídeos 4031 a 4060 e a região que sobrepõe o sítio de restrição da enzima *Sph* I no nucleotídeo 4085 do TBSV. O produto dessa reação introduziu uma mutação no nucleotídeo 4044 de C para T, a qual levou à introdução de um códon de parada prematuro na proteína P19, porém deixando P22 intacta. Esse produto de PCR foi digerido com *EcoR* I e *Hpa* I e o fragmento resultante substituiu a região em pTBSV-100, criando pHS 138. Para criar p19T, a região compreendendo ao gene GUS foi removida e substituída pela seqüência do plasmídeo original (pTBSV-100). Assim, recuperou-se p19T semelhante a pTBSV-100 (vírus original), porém com P19 truncada (Scholthof *et al.*, 1983). Para todas essas construções, cerca de 0,2 µg do plasmídeo foi utilizado para proceder a amplificação do DNA em células de *Escherichia coli* (isolado XL1-blue) competentes, preparadas com cloreto de rubídio (**anexo 1.1**). As colônias recombinantes resultantes dessa transformação foram colocadas em 200 ml de meio LB, contendo penicilina, e imediatamente incubadas a 37 °C sob agitação por uma noite. Após essa etapa, procedeu-se a extração do DNA plasmidial das bactérias usando-se o procedimento de lise alcalina, seguida de centrifugação em gradiente de cloreto de cézio (maxi-preparação do DNA plasmidial descrita em **anexo 1.4**). Em seguida, cerca de 0,1 µg de DNA de cada



**Figura 2.4:** Representação esquemática da construção do plasmídeo p22AUGcm. As linhas horizontais representam o genoma do TBSV, com o respectivo promotor da T7 RNA polimerase na extremidade 5' (●). As linhas verticais representam os principais sítios das enzimas de restrição usadas para clonagem. A localização e orientação dos oligonucleotídeos usados nas reações de PCR encontram-se indicadas por setas. As ORFs das proteínas P22 e P19, localizadas na extremidade 3' do genoma do TBSV, com as suas respectivas seqüências originais (pTBSV-100) e mutantes (pHST5 e p22AUGcm) são mostradas. Nessas seqüências, os nucleotídeos sublinhados (pHST5 e p22AUGcm) representam aqueles que sofreram mutações, comparado com o original (pTBSV-100). Os nucleotídeos em negrito simbolizam os códons de iniciação de P19 e P22.

preparação plasmidial foi digerido com *Sma* I e empregado na seguinte reação de transcrição. Para essa reação usou-se 100 ng de DNA, 2.5 µl de tampão para a T7 RNA polimerase (1X), 2.5 µl NTPs (5mM), 2.0 µl DTT (100mM), 0.5 µl inibidor da RNase, 0.5 µl T7 RNA polimerase para 25 µl de reação. O produto da reação de transcrição foi visualizado em gel de agarose 1 %.

## **1.2. Influência da expressão da proteína de movimento (P22) na expressão da proteína do capsídeo (P41) *in vivo*:**

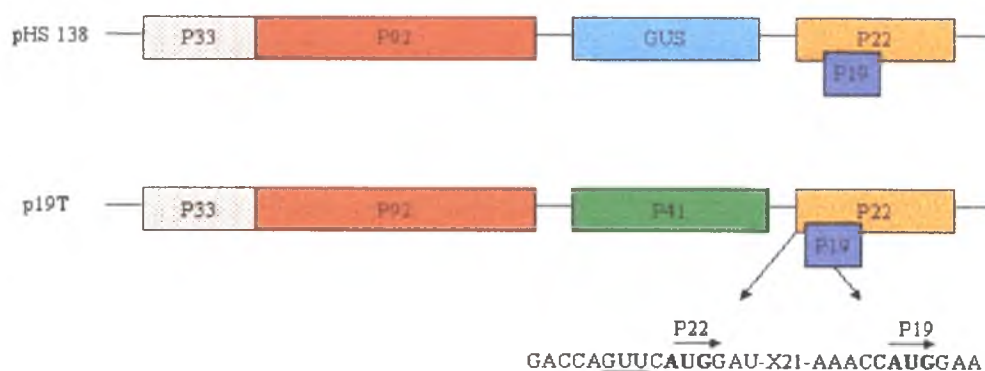
As construções plasmidiais descritas no item 1.1 foram analisadas também *in vivo*, através de experimentos com protoplastos e plantas. O acompanhamento das amostras foi monitorado por “western blotting” (protocolo em anexo 1.7) utilizando-se anti-soro específico para cada proteína diluídos de 1:1000.

**1.2.1. Preparo dos protoplastos:** Para a preparação dos protoplastos, folhas de *Nicotiana benthamiana* exibindo pleno vigor foram coletadas e cortadas em pedaços finos, em torno de 2 mm de largura, descartando-se as nervuras principais. Os pedaços foram colocados em 20 ml de uma solução enzimática fresca (10 % manitol, 0,3 g celulase, 0,05 g macerozime, 0,15 g BSA) e incubados a 26° C no escuro por 4-5 horas sob lenta agitação. Após essa incubação, o tecido de folha digerida foi peneirado em uma malha de nylon diretamente em tubo Corex de 30 ml e centrifugado a 630 g por 5 min para precipitar os protoplastos. O sobrenadante foi removido e os protoplastos lavados através da ressuspensão em 10 ml de manitol a 10 %. Novamente, os protoplastos foram centrifugados à mesma rotação e ressuspensos como no passo anterior. Colocou-se 5-6 ml de uma solução de sacarose 20 % em um tubo contendo os protoplastos, que após nova centrifugação, nas mesmas condições, foram coletados da interface entre o manitol a 10 % e a sacarose a 20%. Os protoplastos coletados foram colocados em um recipiente contendo uma pequena quantidade de manitol a 10 % e a seguir diluídos a um volume de 10-12 ml com manitol 10 % e a concentração determinada em câmara de Neubauer. Para a transfecção, 1-2 x 10<sup>5</sup> protoplastos foram requeridos, os quais foram colocados em um tubo de cultura descartável e

centrifugados a 360 g por 5 min. Ao precipitado, foram adicionados os transcritos e misturados vagarosamente. Posteriormente, a mistura de transcritos-protoplastos foi transferida para um tubo de cultura descartável contendo 100 µl de tampão de inoculação (40 % PEG 1540, 3 mM CaCl<sub>2</sub>) e misturada cuidadosamente por 10 seg. Um ml de manitol a 10 % gelado foi adicionado e os protoplastos incubados por 15-20 min no gelo. Após a etapa de incubação, os protoplastos foram centrifugados a 360 g por 5 min e o precipitado ressuscitado em 1 ml de meio de incubação [1X Aoki sais (10X: 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KNO<sub>3</sub>, 10 mM MgNO<sub>3</sub>, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,6 mg/l KI, 0,25 mg/l CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), 10 % manitol, 1 µg/ml de sulfato de gentamicina, ajustando-se o pH com 0,1M KOH]. Os protoplastos foram incubados em câmara de crescimento a 26 °C por 20 horas (Jones *et al.*, 1990).

**1.2.2. Extração de RNA dos protoplastos:** À preparação dos protoplastos adicionaram-se 300 µl do tampão de extração de RNA (200 mM carbonato de amônio, pH 9,0, 2 % SDS, 2 mM EDTA, 200 µg/ml bentonita) e 300 µl de fenol/clorofórmio, sendo que a partir dessa etapa todos os passos subsequentes foram conduzidos a 4 °C. A mistura foi agitada vigorosamente (sem uso de vortex) e centrifugada por 10000g/5 min. Repetiu-se a extração com fenol por mais duas vezes e transferiu-se a fase aquosa para um tubo tipo eppendorf contendo 100 µl 10 M NH<sub>4</sub>Ac. O RNA extraído foi precipitado com 800 µl de etanol 95 % gelado, armazenado a -70 °C por 30 min e centrifugado por 10000g/10min. Após a centrifugação, o RNA foi lavado com etanol a 70%, seco em “Speed Vac” por 10 min e ressuscitado em 100 µl da solução de ressuspensão (97 µl de H<sub>2</sub>O, 1 µl de 1 M DTT, 2 µl de inibidor de RNase) e armazenado a -20°C (Jones *et al.*, 1990).





**Figura 2.5:** Representação esquemática da construção do plasmídeo p19T. Os plasmídeos pHS 138 intermediário na construção do p19T é mostrado. pHS 138 possui todas as ORFs funcionais, exceto P19. Nessa construção, P19 está truncada devido a uma mutação no nucleotídeo 4044 (CWT), que resultou na introdução de um códon de terminação prematuro para essa proteína (truncada). Nesse plasmídeo, o gene *gus* encontra-se clonado em substituição ao gene da proteína P41. A região do gene *gus*, em pHS 138, foi substituída pela mesma região de pTBSV-100 (nucleotídeos 2440 a 3885). As seqüências que antecedem o códons de iniciação de P22 e P19 em p19T são apresentadas.

**1.2.3. “Northern blotting”:** Após a extração do RNA, 10 µl da amostra foram aplicados em gel de agarose 1% e a eletroforese conduzida a 150 V por 45 min em TBE 1X (89 mM Tris base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA). Terminada a corrida, o gel foi transferido para uma membrana de nylon por capilaridade, utilizando-se tampão SSC 10X (3 M NaCl; 0,3 M C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O; pH 7,0) por uma noite. Após a transferência, o RNA foi fixado na membrana, utilizando-se luz ultravioleta, e pré-hibridada com 2X SSPE (0,36 M NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM EDTA-pH 7,4) e 1 % SDS por quatro horas a 65°C e posteriormente hibridada com uma sonda marcada com <sup>32</sup>P contra TBSV-100. Antes da adição da sonda à membrana, essa foi desnaturada a 95 °C/5 min e a membrana hibridada a 65 °C por uma noite. A seguir, a membrana foi lavada duas vezes com 2X SSPE (0.36 M NaCl; 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4; 20 mM EDTA pH 7.4) e 0.1% SDS, por 15 min cada lavagem, seca à temperatura ambiente e imediatamente exposta ao filme autoradiográfico (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **1.2.4. Análises em plantas**

**a) Plantas:** Inicialmente, *Nicotiana benthamiana*, *Vigna unguiculata* (caupi) e *Spinacea oleracea* (espinafre) foram as hospedeiras escolhidas para as análises da influência da expressão da proteína de movimento (P22) na acumulação da proteína do capsídeo (P41) *in vivo*. Porém, resultados preliminares indicaram que *N. benthamiana* se mostrou a melhor espécie para a continuidade dos ensaios.

**b) Imunodeteção (“Western blotting”):** Para essa análise, 0,2 g de folhas inoculadas e sadias de cada espécie, foram coletadas e trituradas na presença de 500 µl de tampão TE 1X (10 mM Tris-HCL, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0). Dessa extração, alíquotas de 200 µl foram misturadas com o tampão de corrida e desnaturadas a 95 °C por 5 min. Após a desnaturação, centrifugou-se as amostras a 10000g/5 min e 15-20 µl do sobrenadante foram aplicados no gel de SDS-PAGE (**anexo 1.5**). Após a corrida, os géis foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (procedimento descrito para “western blotting” em **anexo 1.7**). Para o “western blotting”

utilizaram-se anticorpos contra as proteínas P22 e P41 e a revelação das membranas foi feita com quimioluminescência, utilizando-se o “immun-star chemiluminescent kit” de acordo com as recomendações do fabricante (BIORAD).

## 2. Efeito do comprimento da seqüência líder na expressão de P22

Nesse experimento, a expressão de P22 e P19 foi analisada em dois mutantes (p41 $\Delta$ 51LAUG e p41T16LAUG) que apresentavam seqüências líderes maior e menor, respectivamente. Todos os resultados foram acompanhados por “western blotting” conforme protocolo descrito em **anexo 1.7**.

### 2.1. Construção dos plasmídeos recombinantes

**2.1.1. p41 $\Delta$ 51LAUG.** Para a criação desse plasmídeo utilizou-se dois plasmídeos intermediários: pHST-14 e o pBY-1 (**Figura 2.6**). O pHST-14 originou-se do pTBSV-100 e apresenta o gene *gfp* clonado entre os sítios de restrição das enzimas *Sna*B I e *Not* I, ambas presentes no MCR (região de clonagem múltipla do TBSV). Além da presença do gene *gfp*, pHST2-14 é destituído de P19. A diferença entre pHST-14 e pBY-1 é que no último, P19 foi recuperada e um sítio de restrição para *Pst* I foi incorporado. p41 $\Delta$ 51LAUG é o resultado da deleção da região compreendendo os sítios enzimáticos de *Pst* I e *Pf*M I em pBY-1, seguidos de tratamento com o fragmento Klenow da DNA polimerase I e religação (**anexo 1.12**). Nesse plasmídeo, como P41 encontrava-se deletada, esse mutante apresentava uma inabilidade de expressar a proteína do capsídeo. P22 foi colocada sob o controle da expressão do RNA subgenômico I, com o comprimento da seqüência líder aumentado em 50 nucleotídeos.

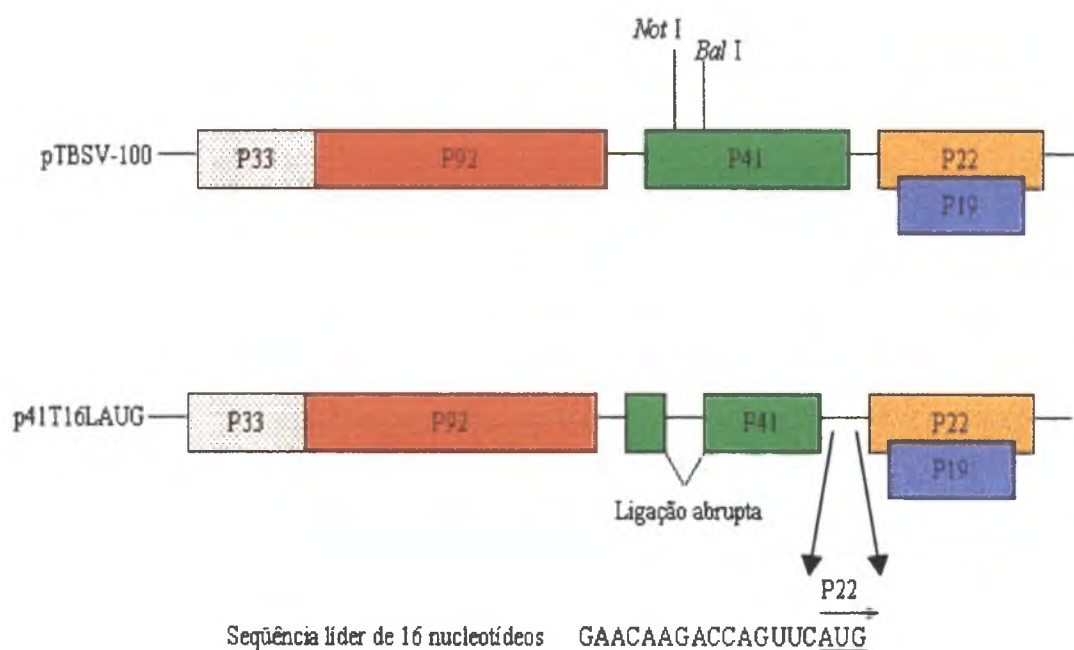
**2.1.2. p41T16LAUG.** Esse plasmídeo foi derivado do pTBSV-100 clivado com *Not* I (2724 nt) e tratado com o fragmento Klenow de DNA polimerase I e *Bal* I (2773 nt) e ambos terminais abruptos foram religados (**Figura 2.7**) (Scholthof *et al.*, 1993). Essa deleção proporcionou a esse mutante a inabilidade de expressar P41. Mas, a ORF que codifica a proteína P22 desse mutante continuou sob o controle do RNA subgenômico II, com uma seqüência líder de 16 nucleotídeos,

antecedendo o códon de iniciação de P22.

## **2.2. Estudos da expressão das proteínas P22 e P19 *in vivo***

Nos experimentos *in vivo*, plantas de *N. clevellandii* foram inoculadas com os transcritos dos vetores p41Δ51LAUG e p41T16LAUG. Amostras de 0,2 g de folhas foram colhidas com 3, 5, 6 e 7 dias após a inoculação e submetidas a “western blotting”. Nesta etapa, utilizaram-se anti-soros policlonais, contra P19 e P22 diluídos de 1:1000.





**Figura 2.7:** Representação esquemática da construção do plasmídeo p41T16LAUG. O plasmídeo original pTBSV-100, com suas respectivas ORFs, é mostrado. p41T16LAUG foi criado a partir da deleção da região nucleotídica compreendendo aos sítios de restrição das enzimas *Not I* e *Bal I*. Após o tratamento com o fragmento Klenow da DNA polimerase I, para *Not I*, os terminais foram religados abruptamente. Isso resultou na ligação de P41 fora de fase de leitura. A sequência líder (16 nucleotídeos) de P22 é indicada, a qual inclui o códon de iniciação AUG (sublinhado).

## RESULTADOS:

### 1. Efeito da super expressão de P22 na expressão da proteína do capsídeo:

Nessa etapa do trabalho procurou-se investigar a interferência que a expressão da proteína P22, em quantidades maiores que as normalmente encontradas em plantas infectadas pelo TBSV, poderia provocar na expressão da proteína do capsídeo (P41). Para isso, dois mutantes foram utilizados: o mutante p22AUGcm, que apesar de possuir P22 funcional, apresentava mutações na seqüência contexto em torno do códon de iniciação de P22. Essas mutações foram introduzidas (veja metodologia) a fim de criar um contexto mais próximo daquele considerado ótimo para a tradução de mRNAs em plantas. O mutante p19T era destituído da proteína P19, o qual foi incluído nos estudos para excluir qualquer interferência da respectiva proteína na expressão de P41.

Inicialmente, esses estudos foram conduzidos *in vitro* a fim de se investigar se diferenças no nível de transcrição resultaria em diferenças na expressão de proteínas pelas construções empregadas nesse estudo. Nenhuma ou pouca variação a nível transcricional foi observada *in vitro* (dados não mostrados) ou *in vivo*, quando o RNA total foi extraído de protoplastos inoculados com os mutantes p22AUGcm e p19T (**Figura 2.8**). Esses dados foram verificados por “northern blotting”, utilizando-se como sonda pTBSV-100, que correspondente ao genoma completo do TBSV (**Figura 2.9**). Diante desses resultados, para a execução dos experimentos *in vivo*, utilizou-se essas duas construções inoculadas em plantas de *N. benthamiana*, espinafre e caupi, sendo as análises de expressão conduzidas através de “western blotting”. Somente o sistema *N. benthamiana* mostrou-se eficiente para o estudo dessas observações. Os dados obtidos com *N. benthamiana* mostraram que a alta expressão de P22 no mutante p22AUGcm resultou na regulação da expressão de P41, que teve a sua expressão reduzida (**Figura 2.10**). Além das bandas de peso molecular, correspondentes às proteínas P22 e P41, ambas membranas mostraram

Figura 2.8

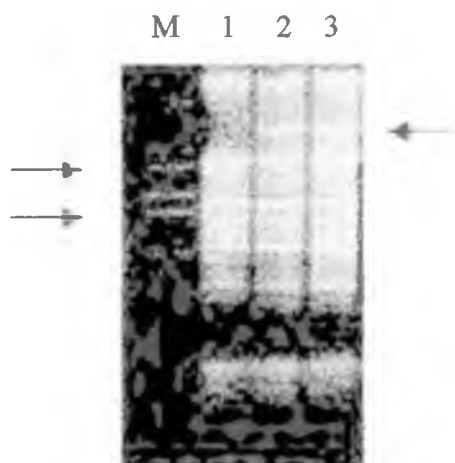
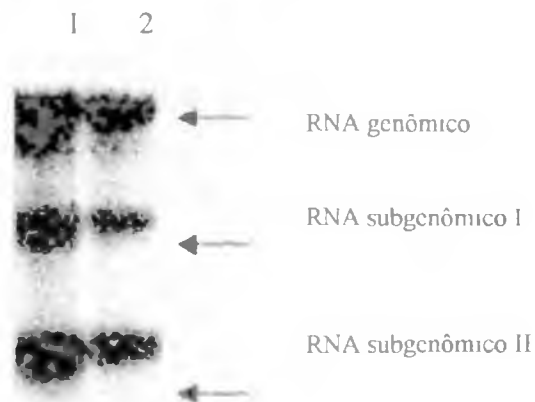


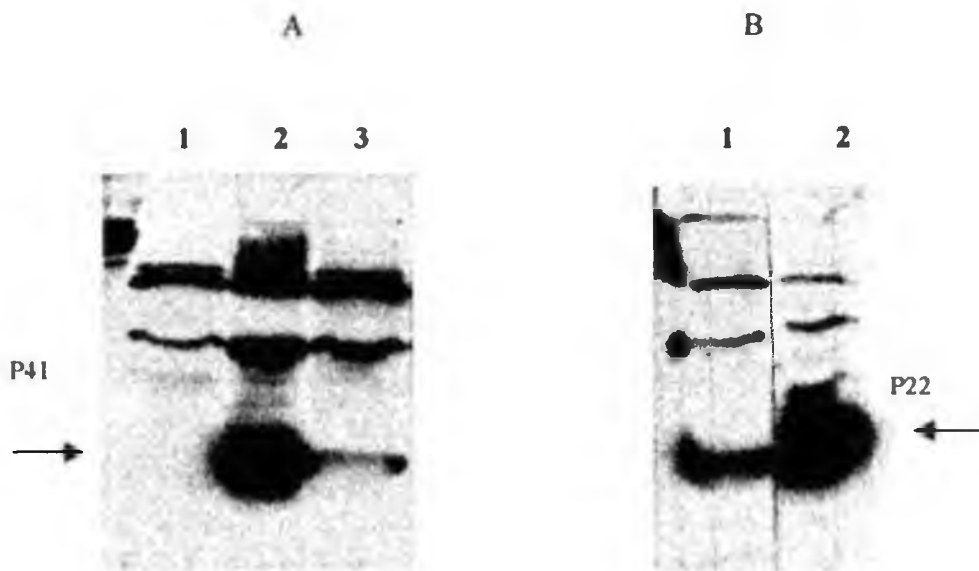
Figura 2.9



**Figura 2.8:** RNA total dos protoplastos de *N. benthamiana* visualizados em gel de agarose 1%. Amostra 1: protoplastos não inoculados; amostras 2 e 3: protoplastos inoculados com as construções p22AUGcm e p19T, respectivamente. M: marcador de peso molecular 1 kb ladder (GIBCO BRL). As setas à esquerda indicam as posições de fragmentos de 2 e 4 kb, respectivamente no marcador. A seta da direita representa o provável RNA genômico do TBSV.

**Figura 2.9:** Análise de “northern blotting” do RNA total dos protoplastos mostrados na figura 8 com a sonda radioativa contra pTBSV-100. Essa foi construída com dCTP marcado com  $^{32}\text{P}$ . Amostra 1: RNA total do p22AUGcm e amostra 2: RNA total do p19T. A membrana mostra os três tipos de RNA do TBSV. O RNA genômico com aproximadamente 4.8 kb e os RNAs subgenômicos I e II, com 2.1 e 0.9 Kb, respectivamente, são indicados na figura.





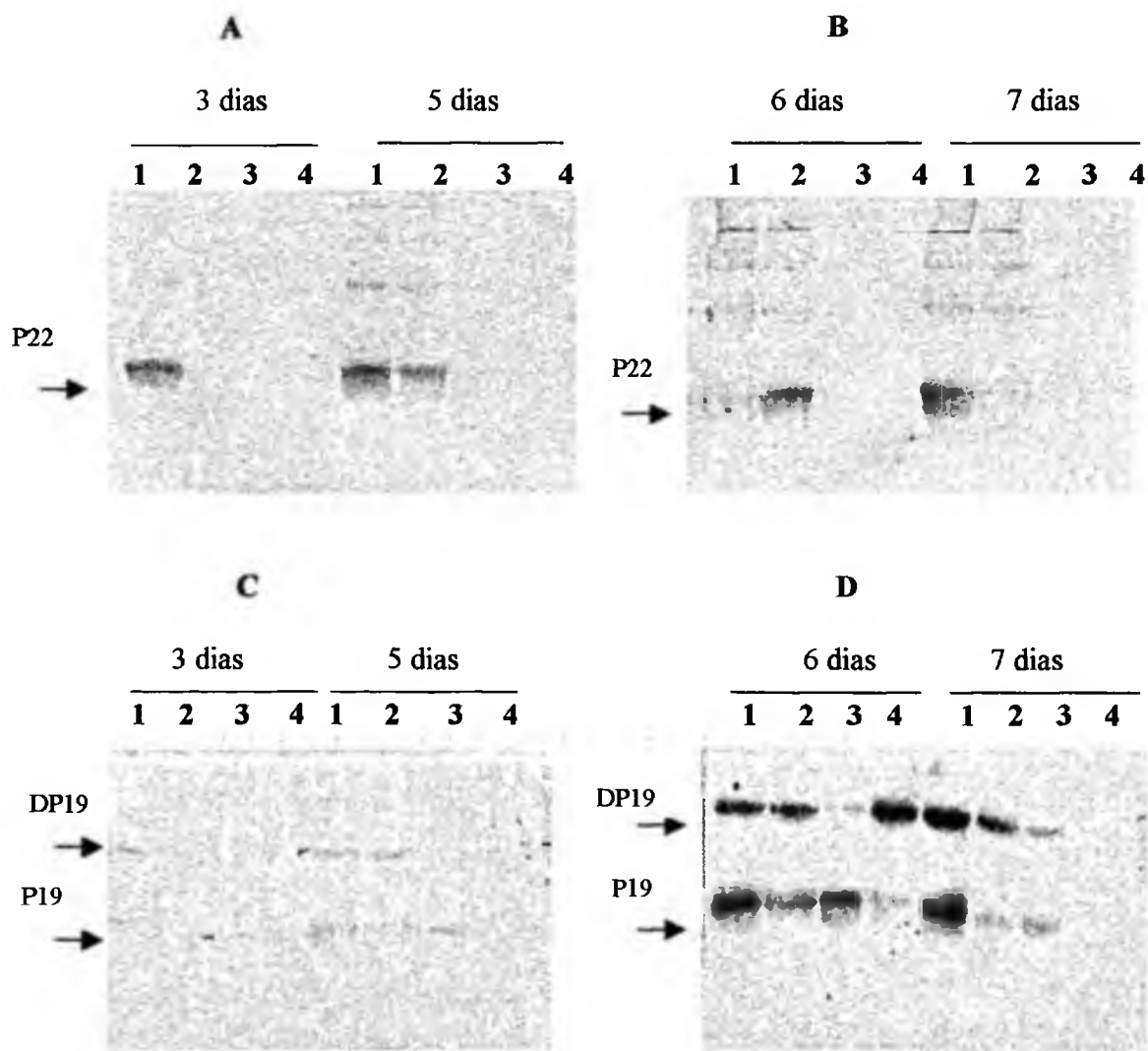
**Figura 2.10.** Análise de “western blotting” da proteína do capsídeo (P41) e de movimento (P22) do TBSV, revelado com quimioluminescência. **(A)** Amostra 1: extrato de *N. benthamiana* sadio. Amostra 2: extrato de *N. benthamiana* infectado com a construção p19T. Amostra 3: extrato de *N. benthamiana* infectado com a construção p22AUGcm. Anti-soro contra a proteína P41. **(B)** Amostra 1: extrato de *N. benthamiana* infectado com a construção p19T. Amostra 2: extrato de *N. benthamiana* infectado com a construção p22AUGcm. Anti-soro contra a proteína P22.

diversas bandas que foram consideradas, provavelmente, como produtos não específicos (possivelmente proteínas da planta), reconhecidos pelos anti-soros utilizados. Dessa maneira atribuiu-se às mutações em p22AUGcm a habilidade que o mRNA bifuncional do TBSV tem de garantir uma alta expressão da proteína P22. Como mudanças a nível transcripcional não foram observadas e nem a inativação da proteína P19 (p19T) teve efeitos na acumulação da proteína do capsídeo, a redução na expressão de P41 foi atribuída ao aumento da expressão da proteína P22.

## 2. Efeito do comprimento da seqüência líder na expressão de P22

Como o comprimento da seqüência líder tem sido apontado como uma das causas, que promovem o "leaky scanning" dos ribossomos (Kozak, 1989), procuramos investigar esse aspecto na tradução das proteínas P22 e P19 do TBSV. Nesse caso, P22 foi colocada sob o controle da expressão do RNA subgenômico I, através da deleção da seqüência da proteína do capsídeo (p41 $\Delta$ 51LAUG; **Figura 2.6**). Esses estudos foram conduzidos em comparação com o vetor p41T16LAUG (**Figura 2.7**), que não expressa a proteína do capsídeo devido a uma deleção de 50 nucleotídeos no respectivo gene. p41 $\Delta$ 51LAUG apesar de se assemelhar ao p41T16LAUG no que diz respeito à inabilidade de expressar a proteína do capsídeo, apresentava o comprimento da seqüência líder aumentado em 50 nucleotídeos, quando comparado com p41T16LAUG, que possui uma seqüência líder de apenas 16 nucleotídeos antecedendo o códon de iniciação da proteína P22. Outra diferença básica entre esses dois clones foi o fato de p41 $\Delta$ 51LAUG ter a proteína P22 sob o controle do promotor subgenômico I da proteína do capsídeo, ao passo que p41T16LAUG continuou com a P22 expressa sob o controle do promotor subgenômico II. Nesse experimento, novamente, analisou-se a possibilidade da existência de diferenças na expressão das proteínas estudadas (P22 e P19) em virtude de diferenças a nível transcripcional *in vitro*. Como nenhuma ou pouca variação foi observada na quantidade de RNA produzido nas reações de transcrição e nas extrações de RNA total, provenientes de protoplastos infectados com esses respectivos transcritos (dados não mostrados), plantas de *N. clevelandii* foram inoculadas com

transcritos desses mutantes e a expressão da proteína P22 e P19 foram monitoradas com 3, 5, 6, e 7 dias após a inoculação, através de “western blotting”. Os dados mostraram que o comprimento da seqüência líder exerce influência sob a expressão da proteína P22 do TBSV, independente do período após o início da infecção viral. A proteína é expressa em grandes quantidades em mutantes com seqüência líder mais longa (p41 $\Delta$ 51LAUG) que o controle (p41T16LAUG) e sua expressão parece ser independente do período pós-inoculação (**Figuras 2.11A e B**). Uma exceção foi observada na amostra 2 da **Figura 2.11A** (3 dias). Apesar dessa amostra ser uma repetição da construção p41 $\Delta$ 51LAUG, nenhuma expressão de P22 foi observada aos 3 dias após a inoculação. Pode ser que, como o experimento analisava uma repetição da inoculação do mesmo mutante em plantas diferentes, pode ter havido um retardamento no movimento do vírus nessa planta, que não foi observado na planta representada pela amostra 1, analisada com o mesmo período após a inoculação. Além disso, devido ao uso de inoculação mecânica para a infecção das plantas, diferentes concentrações de inóculo pode ter sido responsável pela variação observada. Ao contrário de P22, a proteína P19 não mostrou uma variação significativa na expressão das duas construções analisadas ao longo do experimento (**Figuras 2.11C e D**).



**Figura 2.11:** Análise por “western blotting” das proteínas de movimento do TBSV 3, 5, 6 e 7 dias após a inoculação, com as respectivas construções: p41 $\Delta$ 51LAUG e p41T16LAUG. Amostras 1 e 2: extratos de *N. clevelandii* infectados com a construção p41 $\Delta$ 51LAUG e amostras 3 e 4 extratos de *N. clevelandii* infectados com a construção p41T16LAUG. As amostras 1 e 2 são repetições das mesmas construções (p41 $\Delta$ 51LAUG), provenientes de plantas diferentes. As amostras 3 e 4 são repetições das mesmas construções (p41T16LAUG), provenientes de plantas diferentes. Anti-soros contra a proteína p22 (A e B) e p19 (C e D). DP19: representam prováveis dímeros de P19.

## DISCUSSÃO

A regulação da tradução em sistemas eucarióticos tem sido alvo de muitos estudos na última década. Hoje se sabe que o controle da tradução está ligado a fatores localizados nas extremidades 5' e 3' do mRNA. Em 1989, Kozak propôs um mecanismo que ilustra o processo de tradução em eucariotos. Segundo a autora, a subunidade ribossomal 40S, juntamente com a Met-tRNA<sup>met</sup> e vários fatores de iniciação, ligam-se inicialmente à extremidade 5' do mRNA e então migra, parando no primeiro códon de iniciação (AUG), que apresente um contexto favorável para o início da tradução (**Figura 2.2**). O modelo postula que ambos: posição e contexto favorável, bem como a presença de estruturas secundárias que antecedem o AUG, são determinantes na escolha do códon de iniciação.

A influência de alguns desses fatores na regulação da expressão das proteínas codificadas pelo TBSV foi alvo de estudo desse capítulo. Para esse estudo, utilizou-se um mutante p22AUGcm, o qual apresentava um contexto modificado em torno do AUG da proteína P22, que o tornou competente para a expressão de altos níveis da respectiva proteína, quando comparado com o isolado selvagem p19T (mutante destituído de P19, através da introdução de um códon de terminação imediatamente após o códon de iniciação da respectiva proteína). Essa competência foi relacionada à semelhança que a seqüência que antecede o códon de iniciação dessa proteína nesse mutante (p22AUGcm) tem com a seqüência considerada ótima para a tradução de mRNAs de eucariotos (Kozak, 1984; Joshi, 1987). Durante a comparação dos níveis de proteínas expressas por esses dois mutantes, observou-se que p22AUGcm, inesperadamente teve a expressão de P41 reduzida em relação ao mutante p19T, que falhou em mostrar esse efeito (**Figura 2.10**). Isso mostra a influência que uma proteína (P22) codificada pelo RNA subgenômico II do TBSV exerce sobre a expressão de outra codificada pelo RNA subgenômico I (CP), o que resulta diretamente em uma interferência no processo de formação de partículas virais estáveis. Diante dessas observações, sugere-se que fatores tais como a ligação da proteína P22 ao

RNA subgenômico I pode ter levado a esse decréscimo na expressão de P41; hipótese plenamente possível, já que P22 mostrou ter afinidades de ligação ao respectivo RNA subgenômico (H. Scholthof, *comunicação pessoal*). Além disso, a competição pelo suprimento de fatores de tradução pelo RNA subgenômico II do plasmídeo recombinante com contexto melhorado não pode ser descartada. Esse experimento indicou que os genes relacionados com o movimento do TBSV estão intimamente coordenados, para serem expressos de uma maneira altamente regulada que garanta a máxima eficiência da infecção. Aspecto semelhante ao observado para o TBSV foi relatado, recentemente, por Bleykasten-Grosshans *et al.* (1997). Os autores mostraram que pelo menos para o *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), a expressão coordenada das proteínas TGBp3 é importante para o movimento célula-a-célula do vírus, o que provavelmente sugere um mecanismo que coordena as taxas relativas de síntese protéica por todo ciclo de infecção viral. Apesar de tentar-se investigar os aspectos que regulam a tradução das proteínas codificadas pelo TBSV em diversas hospedeiras (*N. benthamiana*, caupi, espinafre), apenas *N. benthamiana* apresentou os resultados mais consistentes nos experimentos *in vivo*. Os estudos realizados por Scholthof *et al.* (1999) sugerem algumas evidências que podem, pelo menos em parte, explicar o insucesso observado nesse trabalho, quando outras hospedeiras foram incluídas nas comparações. Os autores mencionaram que mutações no contexto P22/P19 podem influenciar o movimento dos vírus em caupi (*V. unguiculata*), uma hospedeira de lesão local na qual a proteína P19 contribui para a disseminação localizada. Os efeitos que podem ocorrer no movimento célula-a-célula em outras hospedeiras, que não foram incluídas em seus estudos, também não foram descartados. Gal-On *et al.* (1996) também relataram que, para um isolado de *Cucumber mosaic virus* (CMV), efeitos dependentes do hospedeiro foram marcantes no aparecimento de infecções crônicas mais severas em virtude do aumento nos níveis de expressão da proteína de movimento célula-a-célula.

O outro aspecto da regulação da tradução que também foi investigado nesse trabalho está relacionado ao comprimento da seqüência líder que antecede o códon de iniciação AUG. Esse é um assunto que já vem sendo bastante estudado para outros mRNAs de eucariotos e as conseqüências de uma seqüência líder extremamente pequena ainda não são óbvias, já que não existe correlação entre o comprimento da seqüência líder e a eficiência da tradução (Kozak, 1991a,b,c). Um número considerável de mRNAs virais e celulares tem uma seqüência líder de apenas 7 a 13 nucleotídeos e a ausência de qualquer defeito traducional nesses mRNAs seria o primeiro sinal contraditório à hipótese de que seqüências líderes pequenas não são favoráveis à tradução. Para Kozak (1991b) outros fatores além do comprimento devem exercer sua influência sobre a expressão desses mRNAs, como por exemplo a presença de estruturas secundárias que suprimem o efeito do "leaky scanning" promovido pela presença de contexto subótimo em torno do primeiro AUG. Assim, as estruturas secundárias retardam o movimento da subunidade ribossomal 40S na terminação 5' do mRNA, proporcionando maior tempo para o reconhecimento do primeiro códon AUG. Por outro lado, uma série de mRNAs apresenta a expressão de suas proteínas reduzidas, quando o códon de iniciação dos mesmos está sob a influência de seqüências líderes pequenas. Esse efeito foi demonstrado por Kozak (1991a,b) que, estudando mRNAs sintéticos, mostrou que a tradução *in vitro* de proteínas codificadas imediatamente depois do primeiro códon de iniciação é aumentada à medida que a seqüência líder que antecede o seu AUG também é aumentada. Essa conclusão foi baseada na observação de que mudanças no comprimento da seqüência líder de 32 para 3 nucleotídeos resultou na diminuição progressiva da expressão da proteína codificada pelo primeiro AUG e conseqüentemente resultou no aumento da expressão da proteína codificada pela seqüência imediatamente após o primeiro AUG. Para Jonhston & Rochon (1996) o efeito de uma seqüência líder aumentada está na maior capacidade de carregamento e/ou diminuição do movimento de varredura das subunidades ribossomais 40S conduzindo a um aumento do reconhecimento do primeiro códon AUG. Nesse estudo, os autores

demonstraram que o aumento da seqüência líder do mRNA subgenômico do CNV de 15 para 48 nucleotídeos foi suficiente para dirigir o aumento relativo da expressão da síntese da proteína p21 em comparação à expressão da proteína p20. Ao contrário das informações geradas nos experimentos mencionados, os dados desse trabalho foram produzidos *in vivo*.

No que diz respeito ao aumento do comprimento da seqüência líder, o sistema TBSV investigado mostrou seguir o modelo proposto por Kozak (1991a), no que diz respeito ao aumento da expressão da proteína dirigida pelo primeiro códon de iniciação AUG (no caso P22). Assim, o aumento da seqüência líder em torno do AUG de P22 de 16 (p41T16LAUG) para 50 (p41Δ51LAUG) nucleotídeos foi capaz de aumentar a sua expressão (**Figuras 2.11A e B**). Porém, contrariamente ao modelo de Kozak (1986), não se observou nenhuma alteração nos níveis de expressão da proteína P19, a qual deveria ter a sua expressão inibida em decorrência da alta incidência de “leaky scanning” dos ribossomos em favor da proteína P22 (**Figura 2.11C e D**). Esse efeito, no entanto, precisa ser investigado, pois essa falta de correlação com o modelo pode estar relacionada a outras limitações na detecção das proteínas expressas. Para vencer os obstáculos observados nesse capítulo, que impossibilitaram comprovar o modelo de “leaky scanning” dos ribossomos proposto por Kozak (1986), uma estratégia potencialmente muito apropriada para o monitoramento da expressão gênica dos mutantes estudados nesse capítulo, poderia ser a utilização de proteínas marcadoras como GFP (GFP do inglês “green fluorescent protein”). Considerando que P19 e P22 funcionalmente são proteínas encarregadas do movimento célula-à-célula e à longa distância, respectivamente, a utilização de mutantes de TBSV expressando a proteína de movimento P22 fusionada com o gene *gfp* proporcionaria o estudo do movimento a curta distância em maior detalhe.

Partindo dessa premissa, paralelamente ao estudo da regulação na expressão de P19 e P22 descrita nesse capítulo, o gene *gfp* foi utilizado para o estudo do movimento do TBSV célula-à-célula. Primeiramente, várias construções foram produzidas visando a obtenção de um plasmídeo



recombinante contendo o genoma completo do TBSV, no qual a proteína de movimento P22 estivesse fusionada em fase de leitura com o gene *gfp*. Essa construção seria o ponto de partida para o estudo da regulação gênica dos mutantes discutidos anteriormente. Nesta primeira fase, uma construção foi obtida, contendo o gene *gfp* clonada na extremidade 3' da proteína P22 (P22-3'-GFP). O plasmídeo recombinante foi utilizado para o estudo de transcrição *in vitro* e nos bioensaios, inoculando-se simultaneamente, protoplastos ou plantas de *N. benthamiana*, *Vigna unguiculata* e *Chenopodium quinoa*. Para a visualização da expressão de GFP, monitorou-se o aparecimento de fluorescência durante 7 dias após a inoculação, utilizando-se microscópio óptico e luz ultravioleta. A cada observação, lâminas contendo preparações de protoplastos ou cortes de folhas foram observadas sob luz ultravioleta. Uma segunda estratégia utilizada foi o uso do PVX como vetor de expressão de P22-3'GFP. Nesses experimentos, tentou-se clonar o fragmento de p22-GFP em PVX.

Por motivos ainda não determinados não foi possível a detecção da expressão de GFP nas construções testadas. A razão pela qual não houve a expressão do gene exógeno parece não estar relacionada à natureza do gene marcador, pois a expressão do gene *gfp* em substituição ao da capa protéica em protoplastos já foi obtida (H.B. Scholthof, *comunicação pessoal*). Além disso, a ausência de expressão, não pareceu estar relacionada ao aumento do tamanho do vírus mutante e conseqüente impedimento da replicação e montagem de partículas virais. O TBSV suporta a replicação de genes ainda maiores como o gene *gus* (1800pb) e parece se movimentar à longa distância como RNA, já que o capsídeo é dispensável para o movimento sistêmico (Scholthof *et al.*, 1993). Assim, para explicar a ausência de replicação viral nas construções utilizadas uma das hipóteses aventadas foi a de que a regulação só pode ter ocorrido durante a replicação nas plantas inoculadas. É possível que, a presença do gene *gfp* clonado próximo à extremidade 3' do vírus tenha alterado este de tal maneira que o mesmo deixou de ser reconhecida pelo complexo de replicação viral. Já outros vírus (PVX e TMV) aceitam perfeitamente a expressão de genes

marcadores fusionados à suas proteínas (Heinlein *et al.*, 1995; Baulcombe *et al.*, 1995).

Os nossos resultados mostraram que é possível a clonagem do gene *gfp* em fase de leitura com P22. No entanto, não foi possível a visualização da fluorescência específica de GFP, nem em protoplastos nem em plantas. Os dados obtidos indicam que a regulação, provavelmente, ocorre ao nível de replicação, já que não foi possível se detectar a presença do RNA viral da construção mutante nas hospedeiras testadas.

Enfim, é possível que, na natureza, outros fatores estejam envolvidos na regulação da tradução de P22 do TBSV, já que essa proteína sempre é encontrada em baixos níveis de expressão em plantas inoculadas comparada com P19, que é favorecida pelo “leaky scanning” dos ribossomos e normalmente é expressa em grandes quantidades após a infecção. Assim, o TBSV, o qual apresenta uma capacidade codificadora limitada e uma organização genômica compacta, utiliza um mRNA bifuncional que apesar de apresentar o seu primeiro códon AUG colocado sob a influência de uma sequência contexto subótima e uma sequência líder pequena atinge níveis de expressão satisfatórios de ambas proteínas: P22 na extremidade 5' e P19 localizada internamente.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal obter o sequenciamento do genoma do *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) para auxiliar na determinação da posição taxonômica desse vírus. Além disso, o trabalho visou o desenvolvimento de metodologias para o estudo do movimento de vírus em plantas e regulação gênica, sendo escolhido para esse fim, o sistema representado pelo TBSV, que apresenta características semelhantes ao PLYV.

Na etapa de caracterização do genoma do PLYV (Capítulo I) foi sequenciado aproximadamente 70 % do genoma viral, representado por uma seqüência contínua de 3226 nucleotídeos. Duas possíveis ORFs principais puderam ser identificadas e foram denominadas ORF POL (provavelmente representando a polimerase viral) e ORF CP (provavelmente representando a proteína do capsídeo do PLYV). A disposição das ORFs e a presença de várias seqüências motivo conservadas, encontradas tanto na polimerase viral quanto na proteína do capsídeo do PLYV, foram as principais características observadas, que levaram a sugerir o PLYV como uma possível espécie pertencente a esse gênero. Entre essas regiões conservadas encontrou-se o motivo GDD (glicina-ácido-aspartico-ácido-aspartico), característico das RNAs polimerases dependentes de RNA, que encontrou-se localizado na extremidade carboxil-terminal da polimerase. Além disso, essa seqüência apresentou homologia com as proteínas VPg e serina-protease dos sobemovírus. Para a proteína VPg foi possível identificar também motivos conservados, como a seqüência consenso WAD (triptofano-alanina-ácido aspartico), seguida de uma região rica em D (ácido aspartico) e E (ácido glutâmico). Essa seqüência de aminoácidos antecede uma seqüência nucleotídica (UUUAAAC) indicadora da mudança de fase do ribossomo (ribossomal frameshift -1). A presença dessa seqüência conservada indica que, provavelmente, o PLYV também codifica a proteína VPg, presente em todos os sobemovírus. Na proteína do capsídeo do PLYV destacou-se a presença do motivo protéico MPYTVGTWLRGVASNWSK, conservado em todos os sobemovírus.

Além dessas características moleculares, várias características biológicas como: círculo de hospedeiros restrito, possível transmissão via superfície das sementes e aspectos citopatológicos corroboram o relacionamento mais próximo do PLYV com membros do gênero *Sobemovirus*. Dados de microscopia eletrônica de transmissão de secções ultrafinas dos tecidos de raiz e folhas de plantas de mamão infectadas pelo PLYV revelaram a presença de grandes quantidades de vírus esféricos no citoplasma e no vacúolo de células infectadas. As partículas virais foram também observadas nos vasos do xilema, mas não nos tubos crivados ou vasos laticíferos. No vacúolo, as partículas de vírus apresentaram-se arrançadas de maneira helicoidal, formando estruturas tubulares. A maioria das hélices mostrou-se composta de cinco partículas por volta. Inclusões do tipo viroplasma, intercaladas com vírions, foram encontradas no citoplasma de algumas células. Partículas do PLYV puderam ser vistas no ápice das células da epiderme das raízes, o que pode explicar a possível transmissão desse vírus pelo solo. A natureza viral dessas partículas foi confirmada por experimentos de imunomarcagem com ouro coloidal, usando-se o anti-soro específico anti-PLYV em meio LR-White. Assim, reuniu-se as características citopatológicas do PLYV com aquelas moleculares, para tentativamente sugeri-lo como uma possível espécie pertencente ao gênero *Sobemovirus*, contrariando as suposições anteriores, que sugeriram que o PLYV seria um tombusvírus. Mesmo assim, a elucidação completa do genoma deve ser concluída para que uma classificação definitiva seja apresentada para o PLYV.

No capítulo II, o *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) foi utilizado como um sistema para o estudo do mecanismo de tradução denominado “leaky scanning”. Nesse sistema, o início da tradução ocorre no segundo AUG, ao invés do primeiro códon de iniciação, como é conhecido para os mRNAs de eucariotos. Assim, para que um mRNA seja traduzido por “leaky scanning” o primeiro AUG deve estar sob a influência de um contexto subótimo, apresentar uma seqüência 5’ líder não traduzida pequena, ser destituído de estrutura secundária logo após o primeiro códon de iniciação AUG, além de que ambos devem estar relativamente próximos um do outro.

O TBSV é um excelente sistema genético para o estudo desses fatores *in vivo*. A condição na qual duas fases abertas de leitura localizam-se na extremidade 3' do genoma desse vírus (P19 e P22) e a posição dessas duas ORFs, é um forte indício de que o “leaky scanning” é o que rege a tradução dessas duas proteínas. Utilizando-se mutagênese via PCR e ensaios *in vivo*, analisou-se a importância da sequência contexto em torno do AUG de P22 na acumulação da proteína do capsídeo P41. Os resultados mostrados fortemente sugerem que a acumulação da proteína do capsídeo é afetada negativamente por mutações que redundam em uma sequência contexto subótima em torno do códon de iniciação da proteína P22 em relação ao vírus original, que conseqüentemente aumenta a expressão dessa proteína. Da mesma forma, a influência que o comprimento da sequência líder, que antecede o códon de iniciação da proteína P22, exerce sobre a expressão de P22 e P19 foi analisado. O aumento do comprimento de 16 para 51 nucleotídeos resultou em uma alta taxa de expressão de P22. Porém, não se observou redução nos níveis de expressão de P19. Mesmo assim, os dados apresentados não descartam a hipótese de ser o “leaky scanning” o mecanismo que regula a expressão de proteínas localizadas na extremidade 3' (P19 e P22) do TBSV.

## ABSTRACT

The principal objective of this present work was to obtain the sequence of the *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) genome to aid in the determination of the taxonomic position of this virus. Also, the work was guided to develop methods for studying virus movement in plants and genetic regulation using TBSV, that presents characteristics similar to PLYV.

In the first step of characterization of the PLYV genome (Chapter 1), approximately 70 % of the viral genome was sequenced, represented by a continuous sequence of 3226 nucleotides. Two possible ORFs could be identified and were called ORF POL (representing the putative viral polymerase) and ORF CP (representing the putative PLYV coat protein). The position of the ORFs and the presence of various conserved sequence motifs encountered, not only in the viral polymerase but also the coat protein of PLYV, were the principal characteristics observed that resulted to conclude that PLYV could be species that belongs to this genus. Among these conserved regions, a GDD motif (glycine-aspartate acid-aspartate acid) was found, characteristic of the RNA dependent RNA polymerases that was localized in the extreme carboxyl-terminal of the polymerase. This sequence presented homology with the VPg and serine-protease of sobemovirus. For the VPg protein, it was possible to identify other conserved motifs, such as the WAD (tryptophan-alanine-aspartate acid) consensus sequence, following a region rich in aspartate acid and glutamate acid. This aminoacid sequence was preceded by the ribosomal frameshift nucleotide sequence (UUUAAAC) (ribosomal frameshift -1). The presence of the conserved sequence indicates that PLYV also codifies the VPg protein, present in all sobemovirus. In the PLYV coat protein, emphasis should be noted for the protein motif MPYTVGTWLRGVASWSK that is conserved in all sobemovirus.

Besides the molecular characteristics, various biological aspects such as: narrow host range, possible transmission via seed surface and cytopathology, all point to PLYV being a

member of the *Sobemovirus* genus. Transmission electron microscope data from ultra-thin sections of the roots and leaves of infected papaya by PLYV revealed the presence of large quantities of spherical virus particles in the cytoplasm and in the vacuole of the infected cells. The virus particles were also observed in the xylem. In the vacuole, the virus particles were arranged in a helical manner, forming tubular structures. The majority of the helices were composed of five particles per turn. Inclusions of the viroplasm type, intercalated with virions, were found in the cytoplasm of some cells. Particles of PLYV could be seen at the apex of the epidermal cells of the roots, which could explain the possible transmission of this virus through the soil. The nature of these virus particles was confirmed by immunolabel experiments with gold, using antiserum, specific anti-PLYV in LR-White resin. Thus, uniting the cytopathological characteristics of PLYV with the molecular, it is suggested as a possible species belonging to the genus *Sobemovirus*, in contrast to the previous preliminary data that indicated PLYV as a tombusvirus. Even as such, complete elucidation of the genome should be concluded so that a definitive classification can be made for PLYV.

In the second chapter, *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) was used to study the leaky scanning translation mechanism. In this system, the beginning of the translation occurs at the second AUG instead of in the first initiation codon, such as in mRNAs of eukaryotes. So that, in order to be translated by leaky scanning, the first AUG of the mRNA should be under the influence of a suboptimal context, the mRNA needs to present a 5' small untranslated leader sequence and lack secondary structure right after the first AUG initiation codon, besides the fact the first AUG should be relatively close to the second AUG.

TBSV is an excellent genetic system to study these factors *in vivo*. The condition in which the two open reading frames are located at the 3' end of the genome of this virus (P19 and P22) and the position of the two ORFs provides strong evidence that leaky scanning is what controls the translation of these two proteins. Using PCR mutagenesis and *in vivo* assays, the

importance of the context sequence around the AUG of P22 in the accumulation of the coat protein P41 was analysed. The results strongly suggested that the accumulation of the coat protein is affected negatively by mutations that surround the suboptimal context sequence around the initiation codon of the P22, in relation to the original virus. This consequently increases the expression of the protein. In the same way, the leader sequence length that is in front of the initiation codon of the P22 protein, that works under the expression of P22 and P19, was analyzed. An increase in the length from 16 to 51 nucleotides resulted in a higher rate of expression of P22. But, there was no observation of a reduction of the levels of P19. Even with these results, the data presented does not discard the hypothesis of the leaky scanning mechanism as a regulatory expression model for the localized proteins in the 3' end (P19 and P22) of TBSV.



**BIBLIOGRAFIA CITADA**

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York, USA. pp. 1294.
- Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1990). *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing and Wiley-Interscience, New York.
- Baulcombe, D. C., Chapman, S. N. & Santa Cruz, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a receptor for virus infections. *Plant J.* 7, 1045-1053.
- Bezerra, I. C., Resende, R. O., Pozzer, L., Nagata, T., Kormelink, R. & De Ávila, A. C. (1999). Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Virology* 89(9), 823-830.
- Bleykasten-Groshans, C., Guilley, H., Richards, K. E., and Jonard, G. (1997). Independent expression of the first two triple gene block proteins of *Beet necrotic yellow vein virus* complements virus defective in the corresponding gene but expression of the third protein inhibits viral cell-to-cell movement. *Mol. Plant-Microbe Interact* 19:240-246.
- Bollag, D. M. & Edelman, S. J. (1991). *Protein Methods*. Wiley-liss, New York. pp. 230.
- Bonneau, C., Brugidou, C., Chen, L., Beachy, R. N. & Fauquet, C. (1998). Expression of the *Rice yellow mottle virus* P1 protein in vitro and in vivo and its involvement in virus spread. *Virology* 244, 79-86.
- Boyko, V. P. & Karazev, A. V. (1992). Tombusvirus genome may encode the sixth small protein near its 3' terminus. *Virus Gene* 6, 143-148.
- Brugidou, C., Holt, C., Yassi, M. N., Zhang, S., Beachy, R. & Fauquet, C. (1995). Synthesis of an infectious full-length cDNA clone of rice yellow mottle virus and mutagenesis of the coat protein. *Virology* 206, 108-115.
- Buck, K. W. (1996). Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants

- and animals. *Adv. Virus Res.* **47**, 159-251.
- Buttner, C. & Nienhaus, F. (1989). Virus contamination of waters in two forest districts of the Rhineland area (FRG). *European Journal of Forest Pathology* **19**, 206-211.
- Camarço R. F. E. A., Lima, J. A. A. & Pio-Ribeiro G. (1996). Ocorrência do *Papaya lethal yellowing virus* no município de Santa Rita, Estado da Paraíba. *Fitopatol. Bras.* **21**, 423.
- Camarço R. F. E. A., Lima, J. A. A. & Pio-Ribeiro G. (1998). Transmissão e presença em solo do “*Papaya lethal yellowing virus*”. *Fitopatol. Bras.* **23**, 453-58.
- Chamberlain, J. A., & Catherall, L. (1976). Electron microscopy of some grasses and cereals infected with cocksfoot mottle, Phleum mottle and cocksfoot mild mosaic viruses. *J. Gen Virol.* **30**: 41-50.
- D’Arcy, C. J., Domier, L. L. & Mayo, M. A. (2000). Familia *Luteoviridae*. In: *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. (eds). Academic Press, San Diego, USA. pp. 775-784.
- Dinesh-Kumar, S P. & Miller, W. A. (1993). Control of the start codon choice on a plant viral RNA encoding overlapping genes. *Plant Cell* **5**, 697-692.
- Dingwall, C. & Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences-a consensus? *Trends Biochem. Sci.* **16**: 478-481.
- Dolja, V. V. & Koonin, E. V. (1991). Nuclear targeting sequences –a consensus? *Trends Biochem. Sci.* **16**, 478-481.
- Doughert, W. G. & Semler, B. L. (1993). Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**: 781-822.
- Fouillot, N., Tlouzeau, S., Rossignol, J. M., & Jean-Jean, O. (1993). Translation of the *Hepatitis B virus* P gene by ribosomal scanning as an alternative to internal initiation. *J. Virol.* **67**, 4886-

4895.

Francki, R. I. B. Milne, R. G. & Hatta, T. (1985). Sobemovirus group. In: *Atlas of Plant Viruses*. Boca Raton, Florida: CRC Press. vol. 1.

Fuchs, E., Gruntzig, M., Auerbach, I., Einecke, I., Muller, C. & Kragenow, M. (1994). On the occurrence of plant pathogenic viruses in waters in the region of Halle/Saale (German Federal State of Saxony-Anhalt). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **29**, 133-141.

Gal-On, A., Kaplan, I. B. & Palukaitis, P. (1996). Characterization of *Cucumber mosaic virus*: II. Identification of movement protein sequences that influence its accumulation and systemic infection in tobacco. *Virology* **226**: 354-361.

Gallie, D. R. (1996). Translational control of cellular and viral mRNAs. *Plant Molecular Biology* **32**, 145-158.

Ghosh, A., Rutgers, T., Ke-Qiang, M. & Kaesberg, P. (1981). Characterization of the coat protein mRNA of southern bean mosaic virus and its relationship to the genomic RNA. *J. Virol.* **39**, 87-92.

Hampton, R., Ball, E. & De Boer, S. (1990). *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens- a laboratory manual*. APS Press, St. Paul. pp. 388.

Harrison, S. C., Olsen, A. J., Schutt, C. E., Winkler, F. K. & Bricogne, G. (1978). *Tomato bushy stunt virus* at 2.9 Å resolution. *Nature* **276**, 368.

Hartmann, J. X., Bath, J. E. & Hooper, G. R. (1973). Electron microscopy of virus like particles from shoestring-diseased high bush blueberry, *Vaccinium corymbosum* L. *Phytopathology* **63**, 432-436.

Hawke, D. & Yuan, P. (1987). S-Pyridylethylation of cystine residues. *ABI User Bulletin* No. **28**.

Héinlein, M., Edel, B. L., Padgett, H. S., & Beachy, R. N. (1995). Interactions of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* **270**, 1983-1985.

- Hermodson, M. A., Abad-Zapatero, C., Abdel-Meguid, S. S., Pundak, S., Rossmann, M. G. & Tremaine, J. H. (1982). Amino acid sequence of *Southern bean mosaic virus* coat protein and its relation to the three-dimensional structure of the virus. *Virology* **119**: 133-149.
- Hillman, B. I., Hearne, P., Rochon, D. & Morris, T. J. (1989). Organization of *Tomato bushy stunt virus* genome: Characterization of the coat protein gene and the 3' terminus. *Virology* **169**, 42-50.
- Hull, R. (1995). Sobemovirus. In: *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Murphy, F. A., Fauquet, C.M., Bishop, D. H. L., Ghabriel, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D. (eds). Springer-Verlag, Vienna, Austria. pp 376-378.
- Hull, R., Fauquet, C. M., Gergerich, R. C., Lommel, S. A. & Thotapilly, G. (2000). Genus *Sobemovirus*. In: *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. (eds). Academic Press, San Diego, USA. pp. 764-769.
- Johnston, J. C. & Rochon, D. M. (1996). Both codon context and leader length contribute to efficient expression of two overlapping reading frames of a *Cucumber necrosis virus* bifunctional subgenomic mRNA. *Virology* **221**: 232-239.
- Jones, R. W., Jackson, A. O. & Morris T. J. (1990). Defective-interfering RNAs and elevated temperatures inhibit replication of *Tomato bushy stunt virus* in inoculated protoplasts. *Virology* **176**, 539-545.
- Joshi, C. D. (1987). An inspection of the domain between TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Res.* **15**: 6643-6653.
- Kitajima, E. W. (1965). A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *J. Electron Microscopy* **14**, 119-121.

- Kitajima, E. W., Oliveira, F. C., Pinheiro, C. S. R., Soares, L. M., Pinheiro, K., Madeira, M. C. & Chagas, M. (1992a). Amarelo letal do mamoeiro no Estado do Rio Grande do Norte. *Fitopatol. Bras.* **17**, 282-285.
- Kitajima, E. W., Rezende, J. A. M., Vega, J. & Oliveira, C. R. B. (1992b). Confirmada a identidade do vírus isométrico encontrado em mamoeiros do Rio Grande do Norte como sendo o do amarelo letal. *Fitopatologia Brasileira* **17**: 336-338.
- Koonin, E. V. (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **72**, 2197-2206.
- Koonin, E. V. & Dolja, V. V. (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acids sequences. *Cri. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 375-430.
- Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**, 857-872.
- Kozak, M. (1986). Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell* **47**, 481-483.
- Kozak, M. J. (1989). The scanning model for translation: An update. *Journal of Cell Biology* **108**:229-241.
- Kozak, M. J. (1991a). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* **115**: 887-903.
- Kozak, M. (1991b). A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expression* **1**(2), 111-115.
- Kozak, M. (1991c). Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes *in vitro*. *Gene Expression* **1**(2), 117-125.
- Kozak, M. (1995). Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2662-2666.
- Kozak, M. (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation.

*Mammalian genome* 7(8), 563-574.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lee, L. & Anderson, E. J. (1998). Nucleotide sequence of a resistant breaking mutant of *Southern bean mosaic virus*. *Arch. Virol.* 143: 2189-2201.

Lehto, K. & Dawson, W. O. (1990). Changing the start codon context of the 30K gene of *Tobacco mosaic virus* from “weak” to “strong” does not increase expression. *Virology* 174, 169-176.

Li, Y., Lesemann, D. E., Koenig, R., Rudel, M. & Pfeilstetter, E. (1992). Isometric plant viruses in ditches and streams in agricultural areas: recovery of previously found viruses and identification of hitherto unrecorded carmo- and tombusviruses including grapevine Algerian latent virus. *Journal of Phytopathology* 134, 121-132.

Lima, J. A. A. & Santos, C. D. G. (1991). Isolamento de possível estirpe do vírus do amarelo letal do mamoeiro no Ceará. *Fitopatol. Bras.* 16, 27.

Lima, J. A. A., Marques, M. A. L., & Camarço, R. F. E. A. (1993). Purificação e caracterização sorológica de um isolado do vírus do amarelo letal do mamoeiro obtido no Ceará. *Fitopatologia Brasileira* 18, 289.

Lima, J. A. A., Lima, A. R. T. & Marques, M. A. L. (1994). Purificação e caracterização sorológica de um isolado do vírus do amarelo letal do mamoeiro ‘solo’ obtido no Ceará. *Fitopatol. Bras.* 19, 437-441.

Loreto, T. J. G., Vital, A. F. & Rezende, J. A. M. (1983). Ocorrência de um amarelo letal do mamoeiro solo no estado de Pernambuco. *O Biológico* 49, 275-279.

Mäkinen, K., Tamm, T., Naess, V., Truve, E., Puurand, U., Munthe, T. & Saarma, M. (1995a). Characterization of coxsackievirus B4 genomic RNA and sequence comparison with related viruses. *J. Gen. Virol.* 76, 2817-2825.

- Mäkinen, K., Naess, V., Tamm, T., Truve, E., Aaspollu, A. & Saarma, M. (1995b). The putative replicase of the cooksfoot mottle sobemovirus is translated as a part of the polyprotein by -1 ribosomal frameshift. *Virology* **207**, 566-571.
- Mang, K. Q., Gosh, A. & Kaesberg, P. (1982). A comparative study of the cowpea and bean strains of southern bean mosaic virus. *Virology* **116**, 264-274.
- Martelli, G. P. (1981). Tombusvirus. In: *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. Kurstak, E. (ed) Elsevier, Amsterdam. pp. 61-90.
- Martelli, G. P. & Russo, M. (1995). *Tombusviridae*. In: *Virus Taxonomy*. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Murphy, F. A. *et al.*, (eds). Springer-Verlag Wien, New York. pp. 392-397.
- Mathews, R. E. F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **17**: 1-199.
- McElroy, D., Blowers, A. D., Jenes, B. & Wu, R. (1991). Construction of vectors based on the rice actin 1 (Act) 5' region for use in monocotyledon transformation *Mol. Gen. Genet* **231**, 150-160.
- Morozov, S. & Solovyev, A. (1999). Genome organization in RNA viruses. In: *Molecular Biology of Plant Viruses*. Mandahar, C. L. (ed). Kluwer Academic Publisher, Boston/Dordrecht/London. pp. 281.
- Morozov, S. Yo., Ryabov, E. V., Leisner, R. M. & Zavriev, S. K. (1995). Use of highly conserved motifs in plant virus RNA polymerases as the tags for specific detection of carmovirus-related RNA-dependent RNA polymerase genes. *Virology* **207**, 312-315.
- Murphy, F. A., Fauquet, C.M., Bishop, D. H. L., Ghabriel, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D. (1995). *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer-Verlag, Vienna, Austria.

- Oliveira, C. R. B., Ribeiro, S. G. & Kitajima, E. W. (1989). Purificação e propriedades químicas do vírus do amarelecimento letal do mamoeiro isolado do Rio Grande do Norte. *Fitopatol. Bras.* **14**, 114.
- Opalka, N., Brugidou, C., Bonneau, C., Nicole, M., Beachy, R. N., Yeager, M. & Fauquet, C. (1998). Movement of rice *Yellow mottle virus* between xylem cells through pit membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3323-3328.
- Oster, S. K., Wu, B. & White, K. A. (1998). Uncoupled expression of P33 and P92 permits amplification of *Tomato bushy stunt virus* RNAs. *J. Virol.* **72**: 5842-5851.
- Othman, Y. & Hull, R. (1995). Nucleotide sequence of the bean strain of *Southern bean mosaic virus*. *Virology* **206**: 287-297.
- Padidam, M., Maxwell, D. P. & Fauquet, C. M. (1997). A proposal for naming geminiviruses. *Arch. Virol.* **142**, 2553-2562.
- Pringle, C. R. (1998). The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV Report in 1995. *Arch. Virol.* **143**, 203-210.
- Rayabov, E. V., Krutov, A. A., Novikov, V. K., Zheleznikova, O. V., Morozov, S. Y. & Zavriev, S. K. (1996). Nucleotide sequence of RNA from the sobemovirus found in infected cocksfoot shows a luteovirus like arrangement of the putative replicase and protease genes. *Phytopathology* **86**: 391-397.
- Riviere, C. J., Pot, J., Tremaine, J. H. & Rochon, D. M. (1989). Coat protein of melon necrotic spot carmovirus is more similar to those of tombusvirus than those of carmovirus. *J. Gen. Virol.* **70**, 3033-3042.
- Roth, J. (1983). Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glucoconjugates on thin sections. *Journal Histochemical Cytochemistry* **31**, 987-999.
- Russo, M., Burgyan, J. & Matelli, G. P. (1994). Molecular Biology of *Tombusviridae*. *Adv. Virus*