

**JOSÉ EVANDO AGUIAR BESERRA JÚNIOR**

**DETERMINANTES VIRAIS ASSOCIADOS ÀS DIFERENTES PROPRIEDADES  
BIOLÓGICAS DE DOIS ISOLADOS DE *Lettuce mosaic virus* (LMV): CINÉTICA DA  
INFECCÃO VIRAL E INFECCÃO DOS TECIDOS EMBRIONÁRIOS**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitopatologia, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B552d  
2008

Beserra Júnior, José Evando Aguiar, 1976-  
Determinantes virais associados às diferentes propriedades biológicas de dois isolados de *Lettuce mosaic virus* (LMV) : cinética da infecção viral e infecção dos tecidos embrionários / José Evando Aguiar Beserra Júnior.  
– Viçosa, MG, 2008.  
x, 78f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Lettuce mosaic virus*. 2. Potyvirus. 3. Alface - Doenças e pragas. 4. Alface - Doenças e pragas - Resistência. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.5298

JOSÉ EVANDO AGUIAR BESERRA JÚNIOR

**DETERMINANTES VIRAIS ASSOCIADOS ÀS DIFERENTES PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE DOIS ISOLADOS DE *Lettuce mosaic virus* (LMV): CINÉTICA DA INFEÇÃO VIRAL E INFEÇÃO DOS TECIDOS EMBRIONÁRIOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 27 de maio de 2008.

---

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho  
(Co-orientador)

---

Prof. Maite Vaslin de Freitas Silva

---

Pesq. Poliane Alfenas Zerbini

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

---

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Apesar das dúvidas, é a Deus que sempre procuro nos momentos de aflição e de agradecimento por tudo que tenho na vida. Aos meus pais Francisca e Evando e irmão Anderson, dos quais sinto muita falta. Aos meus sobrinhos Ian e Ícaro, que vejo uma vez ao ano e, que por isso dão um salto de crescimento cada vez que os vejo. À Beatriz, que sempre esteve ao meu lado. À tia Maria, uma pessoa maravilhosa. À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização desse curso. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo. Ao professor Murilo Zerbini, pelo exemplo de profissional dedicado, no qual tentarei me espelhar na minha vida profissional. Aos professores Murilo Geraldo de Carvalho e Renate Krause-Sakate, pela orientação, conversas e conselhos. À Anete, Poli e Juliana Ramos, pela ajuda nos experimentos de PCR em tempo real. À Cláudia Vanetti, pela paciente ajuda com os procedimentos de imunomarcção. Aos professores do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, por seus ensinamentos. Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal, Alison, Álvaro, Ana Verônica, Antônio Wilson, Bruno Diboia, Carlos, Carlos d'Ocesano, Carol, Dani, Eduardo, Fernanda, Fábio, Gloria, Joaquim, Jorge, Miguel, Poli, Renan, Riani, Sávio e Tathiana pela amizade e pela contribuição em tornar, ainda mais, o ambiente de trabalho um lugar agradável. A todos que me ajudaram e me apoiaram ao longo desses anos e que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

José Evando Aguiar Beserra Júnior, filho de José Evando Aguiar Beserra e Francisca de Melo Lima Beserra, nasceu na cidade do Rio de Janeiro-RJ, em 03 de dezembro de 1976, onde viveu até os seis anos de idade.

Em seguida mudou-se para Fortaleza-CE, onde viveu até 2001. Lá se formou Biólogo pela Universidade Federal do Ceará. Em 2002 iniciou o curso de mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, sob a orientação da Profa. Antonia dos Reis Figueira, onde estudou o controle genético de cultivares de melancia aos vírus PRSV e WMV.

Em março de 2004, iniciou o curso de pós-graduação em Fitopatologia em nível de doutorado na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG sob a orientação do prof Francisco Murilo Zerbini.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
Introdução Geral.....	1
Revisão de Literatura .....	8
1. A família <i>Potyviridae</i> .....	8
2. HC-Pro: supressora da resposta de defesa de plantas.....	10
3. Determinantes de virulência .....	12
4. Determinantes de patogenicidade.....	17
5. Transmissão pela semente .....	19
6. Recombinação: geração de variabilidade .....	22
Literatura Citada.....	26
Capítulo 1. Imunolocalização de dois isolados de <i>Lettuce mosaic virus</i> em óvulos de alface pré- e pós-fertilização .....	34
Resumo .....	35
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão.....	40
Literatura Citada.....	43
Capítulo 2. Adaptabilidade de dois isolados de <i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV) e seus recombinantes em alface e <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	47
Resumo .....	48
Introdução.....	49

Material e Métodos.....	52
Resultados.....	55
Discussão.....	59
Literatura Citada.....	65

## RESUMO

Beserra Jr., José Evando Aguiar, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2008.  
**Determinantes virais associados às diferentes propriedades biológicas de dois isolados de *Lettuce mosaic virus* (LMV): cinética da infecção viral e infecção dos tecidos embrionários.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-orientadores: Renate Krause-Sakate e Murilo Geraldo de Carvalho.

O mosaico da alface, causado pelo potyvírus *Lettuce mosaic virus* (LMV), é uma das principais doenças da cultura. A estirpe típica do vírus inclui isolados transmitidos pela semente, mas que não infectam cultivares de alface contendo os alelos de resistência recessivos *moI<sup>1</sup>* e *moI<sup>2</sup>*. A estirpe Most inclui isolados transmitidos pela semente e que infectam tais cultivares. O isolado brasileiro “AF199” pertence à estirpe Most. A taxa de transmissão pela semente desse isolado chega a 16,5%. Esse isolado induz sintomas mais severos em *Nicotiana benthamiana* e possui período latente mais curto em comparação ao isolado “E”, coletado na Espanha. Além disso, esse isolado é capaz de induzir necrose sistêmica em certas cultivares de alface. O isolado E infecta cultivares contendo os genes de resistência recessivos, mas não é transmitido pela semente nessas cultivares. O presente trabalho teve como objetivos: (i) analisar os tecidos de óvulos e embriões de alface infectados pelos isolados AF199 e E; (ii) estudar os mecanismos de adaptabilidade dos isolados AF199 e E, e de três recombinantes obtidos entre eles, na cultivar de alface Salinas 88 e em *N.*



*benthamiana*. O isolado AF199 foi detectado em todos os tecidos de óvulos coletados antes ou após a fertilização. Já o isolado E não foi detectado em nenhum dos tecidos do óvulo, antes ou após a fertilização. Esses resultados indicam que a não transmissão pela semente do isolado E se deve ao fato das partículas virais não serem capazes de atingir o tecido reprodutivo feminino, e sugerem que fatores relacionados ao movimento do vírus na planta podem estar envolvidos no processo de transmissão do LMV pela semente. A cinética de infecção viral foi analisada em plantas nas quais a folha inoculada foi destacada após diferentes períodos de tempo. O acúmulo de RNA viral foi analisado em folhas inoculadas e não-inoculadas. Os resultados indicam que o isolado AF199 atinge maior concentração nas folhas inoculada e não-inoculada mais cedo que o isolado E, em ambos os hospedeiros. O recombinante Rec1 induziu sintomas distintos dos parentais e acumulou mais em *N. benthamiana*. O recombinante Rec4 apresentou menor acúmulo dentre todos os isolados/recombinantes testados em *N. benthamiana*. Em alface, os recombinantes Rec3 e Rec4 apresentaram acúmulo cerca de 10 vezes superior ao isolado AF199. Conclui-se que o isolado AF199, e os recombinantes que possuem a região P1/HC-Pro desse isolado, são mais adaptados do que isolados que possuem essa região do isolado E. Essa melhor adaptação poderia estar relacionada à supressão do silenciamento gênico induzida por P1/HC-Pro.

## ABSTRACT

Beserra Jr., José Evando Aguiar, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2008. **Viral determinants associated with the distinct biological properties of two isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV): Kinetics of viral infection and infection of the embrionary tissues.** Adviser: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-advisers: Renate Krause-Sakate and Murilo Geraldo de Carvalho.

Lettuce mosaic, caused by the potyvirus *Lettuce mosaic virus* (LMV), is one of the main diseases of lettuce. The type strain of the virus includes isolates which are seed borne in lettuce, but which cannot infect lettuce cultivars harboring the recessive resistance aleles *moI*<sup>1</sup> e *moI*<sup>2</sup>. The Most strain includes isolates which are also seed borne and can infect cultivars with the recessive resistance genes. The Brazilian isolate “AF199” belongs to the Most strain. Its seed transmission rate can be as high as 16,5%. This isolate induces severe symptoms in *Nicotiana benthamiana* and has a shorter latent period in comparison to isolate “E”, collected in Spain. Furthermore, this isolate induces systemic necrosis in some lettuce cultivars. Isolate E can infect cultivars with the recessive resistance genes, but it is not seed borne in these cultivars. The objectives of this work were: (i) to analyze the tissues of ovules and embryos from lettuce plants infected by isolates AF199 and E; (ii) to study the fitness mechanisms of isolates AF199 and E, and of three recombinants obtained between these two isolates, in lettuce ‘Salinas 88’ and *N. benthamiana*. Isolate AF199 was detected in all tissues of ovules collected before and after fertilization. Conversely, isolate E was not detected in any ovule

tissues, before or after fertilization. These results suggest that the absence of seed transmission of isolate E is due to the inability of viral particles in reaching the reproductive tissues, and that viral factors related to movement within the plant could be involved in seed transmission. The kinetics of systemic infection was analyzed in plants in which the inoculated leaf was removed after different periods of time. Viral RNA accumulation was analyzed in inoculated and non-inoculated leaves. The results indicate that isolate AF199 reaches a higher concentration in both inoculated and non-inoculated leaves, earlier than isolate E, in both hosts. The recombinant Rec1 induced distinct symptoms and reached a higher titer in *N. benthamiana* compared to the parental isolates. Rec4 reached the lowest concentration among the isolates/recombinants tested in *N. benthamiana*. In lettuce, the relative concentrations of the recombinants Rec3 and Rec4 was up to 10-fold higher in comparison to the AF199 isolate. It is concluded that isolate AF199, and those recombinants having the P1/HC-Pro coding region derived from this isolate, are better adapted than isolates having the P1-HC/Pro region derived from isolate E. This better adaptability could be related to the suppression of RNA silencing induced by P1/HC-Pro.

## INTRODUÇÃO GERAL

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças de maior importância econômica no mundo (Dinant e Lot, 1992). Na América do Sul, o maior produtor de alface é o Brasil, sendo o estado de São Paulo o maior produtor nacional, com 21.587 toneladas em 2007 (Agriannual, 2007).

Diversas viroses já foram descritas infectando naturalmente plantas de alface. O mosaico da alface, causado pelo *Lettuce mosaic virus* (LMV, família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*), é a principal doença viral da cultura. O LMV foi relatado pela primeira vez na Flórida (Jagger, 1921). No Brasil, o primeiro relato foi feito na década de 1940 (Kramer *et al.*, 1945). O LMV é um vírus de partícula alongada e flexuosa, com genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com 10.080 nucleotídeos. Seu RNA possui uma proteína de origem viral (VPg) ligada covalentemente à extremidade 5' e é poliadenilado na extremidade 3' (Revers *et al.*, 1997b). O LMV apresenta uma ampla gama de hospedeiros, infectando 121 espécies vegetais pertencentes a 17 famílias botânicas e 60 gêneros (Dinant e Lot, 1992). De distribuição cosmopolita, o LMV é transmitido por afídeos de maneira não-circulativa e também pela semente (Dinant e Lot, 1992). Diversas espécies de

afídeos são capazes de transmitir o LMV, sendo a espécie *Myzus persicae* a mais eficiente (Edwardson e Christie, 1991).

Os sintomas mais comuns induzidos pelo LMV em alface incluem mosaico, redução de crescimento, clareamento de nervuras, distorção foliar, e necrose localizada ou sistêmica, podendo eventualmente levar à morte da planta (Le Gall, 2003). Observa-se uma alta variabilidade na indução de sintomas dependendo da cultivar e do isolado viral, especialmente em termos de virulência (Revers *et al.*, 1997a).

No Brasil e em muitos países europeus o LMV tem sido controlado por meio do uso de cultivares resistentes, as quais perfazem a grande maioria das cultivares plantadas. Até o final da década de 1960, dois genes de resistência haviam sido identificados: o gene recessivo *g*, encontrado na cultivar argentina ‘Gallega de Invierno’ (Bannerot *et al.*, 1969), e o gene recessivo *mo*, encontrado em um acesso selvagem de *Lactuca* proveniente do Egito (Ryder, 1970). Posteriormente, foi demonstrado que os genes *g* e *mo* constituem, na verdade, dois alelos do mesmo gene (Pink *et al.*, 1992a; Pink *et al.*, 1992b). O gene *g* passou a ser denominado *mo1<sup>1</sup>*, e o gene *mo* passou a ser denominado *mo1<sup>2</sup>* (Le Gall, 2003). A maioria das cultivares plantadas no Brasil possui o alelo *mo1<sup>1</sup>* (Stangarlin, 1995). Além dos dois alelos recessivos, algumas cultivares de alface possuem o gene dominante *Mo2*, originalmente presente em *Lactuca virosa* (Pink *et al.*, 1992a). Os dois alelos do gene recessivo *mo1* codificam isoformas do fator de tradução eucariótico eIF4E, que se liga ao “cap” de RNAs mensageiros eucariotos e recruta fatores de tradução adicionais, resultando na circularização do mRNA e início da tradução (Nicaise *et al.*, 2003). Genes de resistência recessivos a outros potyvírus também correspondem a isoformas do eIF4E (Lellis *et al.*, 2002; Ruffel *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2004; revisado por Robaglia e Caranta, 2006). É sabido que o eIF4E interage com a proteína VPg dos potyvírus, ligada covalentemente à extremidade 5’ do RNA viral (que não é capeado), facilitando sua tradução (Robaglia e Caranta, 2006). Beauchemin *et al.* (2007) sugerem que a associação entre a VPg e o fator de tradução deve ser necessária para executar

funções distintas, dependendo do precursor da VPg em questão. A interação de VPg-Pro com o eIF(iso)4E pode afetar alguma função relacionada ao ciclo celular, enquanto que a interação de 6k-VPg-Pro com o fator de tradução deve ser necessária para a tradução e/ou replicação do RNA viral. Entretanto, a primeira evidência direta da participação da VPg na iniciação da tradução foi o trabalho de Khan *et al.* (2008). Os autores mostraram que a interação eIF4F-VPg reforça a tradução independente de “cap”, aumentando a afinidade do eIF4F pelo RNA do *Tobacco etch virus* (TEV) em três vezes.

Estirpes do LMV capazes de infectar cultivares contendo os alelos *moI*<sup>1</sup> ou *moI*<sup>2</sup> já foram detectadas na Europa, Oriente Médio e Brasil (Dinant e Lot, 1992; Pink *et al.*, 1992a; Pink *et al.*, 1992b; Stangarlin *et al.*, 2000). A classificação de isolados de LMV em patótipos foi proposta com base na capacidade dos isolados em infectar cultivares contendo diferentes genes de resistência (Pink *et al.*, 1992a). Isolados pertencentes ao patótipo I infectam apenas cultivares que não possuem genes de resistência. Isolados pertencentes ao patótipo II (incluindo a estirpe típica) são capazes de infectar cultivares que possuem o gene *Mo2*, mas não aquelas com os alelos *moI*<sup>1</sup> e *moI*<sup>2</sup>. Isolados pertencentes ao patótipo III superam a resistência conferida pelo gene *Mo2* e pelo alelo *moI*<sup>1</sup>. Isolados pertencentes ao patótipo IV são capazes de suplantar a resistência proporcionada pelo gene *Mo2* e pelos alelos *moI*<sup>1</sup> e *moI*<sup>2</sup>.

Um estudo mais recente, com base na análise filogenética de 73 isolados de LMV com diferentes propriedades biológicas, indicou que o relacionamento entre isolados ocorre inicialmente em termos da capacidade de transmissão pela semente, independente da capacidade de infectar plantas contendo os alelos de resistência recessivos (Krause-Sakate *et al.*, 2002). Por sua vez, o grupo de isolados transmitidos pela semente é claramente dividido em dois subgrupos, constituindo duas estirpes denominadas “Common” e “Most”. Os isolados da estirpe Common não infectam plantas contendo os alelos de resistência recessivos. Os isolados pertencentes à estirpe LMV-Most (“*moI*-breaking, *seed-transmitted*”) infectam

genótipos contendo os alelos de resistência recessivos, e são transmitidos pelas sementes dessas plantas (Krause-Sakate *et al.*, 2002). A capacidade de quebra de resistência aliada à transmissão pela semente torna esses isolados uma séria ameaça para a cultura da alface, por facilitar a disseminação à longa distância do vírus por meio do comércio internacional de sementes. Até o presente não foram identificadas fontes naturais de resistência aos isolados da estirpe Most.

Isolados pertencentes às estirpes Common e Most podem ser detectados diferencialmente via RT-PCR com oligonucleotídeos específicos (Peypelut *et al.*, 2004). Utilizando essa estratégia, um levantamento de incidência de isolados de LMV pertencentes às duas estirpes foi realizado nas principais regiões produtoras de alface do estado de São Paulo entre 2003 e 2005. Um total de 1362 amostras de alface com sintomas típicos de mosaico foram analisadas. Destas, 159 (11%) foram positivas para a estirpe Most, e 341 (25%) foram positivas para a estirpe Common (Firmino *et al.*, 2005).

O isolado brasileiro LMV-AF199, coletado em plantas de alface no estado de São Paulo (Stangarlin *et al.*, 2000), pertence à estirpe Most (Krause-Sakate *et al.*, 2002). A taxa de transmissão pela semente desse isolado é bastante elevada, chegando a 16,5% em cultivares de alface onde genes de resistência estão ausentes, e a 1,9% em genótipos contendo os alelos recessivos  $mo1^1$  e  $mo1^2$  (Jadão *et al.*, 2002). Além disso, esse isolado também é capaz de induzir necrose sistêmica nas cultivares de alface Ithaca (que contém o gene dominante  $Mo2$ ) e Vanguard 75 ( $Mo2$  e  $mo1^2$ ), levando à morte da planta (Krause-Sakate *et al.*, 2005). Essas propriedades o tornam interessante para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na interação LMV-alface.

O isolado LMV-E, obtido de plantas de alface na Espanha (Dinant e Lot, 1992), é classificado como pertencente ao patótipo IV, uma vez que infecta plantas contendo os alelos de resistência recessivos (Pink *et al.*, 1992b). Entretanto, esse isolado não é transmitido pela semente nessas plantas e, portanto não pertence à estirpe Most. Filogeneticamente, esse

isolado se agrupa em um ramo distinto dos isolados de LMV transmitidos pela semente (Krause-Sakate *et al.*, 2002), juntamente com outros isolados atípicos do vírus. A ausência de transmissão pela semente desse isolado sugere a incapacidade de infectar o tecido embrionário imaturo, o que é um pré-requisito para a transmissão pela semente para a maioria dos vírus (Maule e Wang, 1996). Até o momento não existem estudos identificando os determinantes de transmissão pela semente no patossistema LMV-alface, e não se sabe quais os tecidos embrionários infectados por isolados transmitidos ou não pela semente. Nesse sentido, o patossistema mais estudado é *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV)-ervilha, onde já foram mapeados os determinantes de transmissão pela semente (Johansen *et al.*, 1996), e determinados os tecidos do embrião que devem ser infectados pelo vírus para que a transmissão pela semente ocorra (Wang e Maule, 1994).

Estudos sobre as interações moleculares dos potyvírus com seus hospedeiros tornaram-se possíveis graças ao sequenciamento dos genomas virais, à construção de clones infecciosos a partir de DNA complementar (cDNA), às técnicas de mutagênese e à construção de vírus recombinantes. A obtenção de clones infecciosos de potyvírus possibilitou a descoberta de funções de várias proteínas virais, e constitui um passo necessário no mapeamento dos determinantes genéticos de propriedades biológicas. Até o momento, cDNAs infecciosos de vários potyvírus já foram obtidos, incluindo *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (Lin *et al.*, 2002), *Plum pox virus* (PPV) (López-Moya e García, 2000), *Potato virus Y* (PVY) (Jakab *et al.*, 1997), PSbMV (Johansen *et al.*, 1996) e *Potato virus A* (PVA) (Puurand *et al.*, 1996), dentre outros. Um clone infeccioso do isolado LMV-E também foi obtido (Yang *et al.*, 1998). Embora o isolado AF199 tenha sido clonado e completamente sequenciado (Krause-Sakate, 2001), um clone infeccioso não está disponível para esse isolado.

Por meio da análise de vírus recombinantes entre LMV-AF199 e LMV-E, Krause-Sakate *et al.* (2005) identificaram duas regiões do genoma viral, localizadas nas regiões



codificadoras das proteínas P1 e CI, como potenciais responsáveis pelo sintoma de necrose sistêmica induzido por AF199 na cultivar Ithaca. Entretanto, a distinção entre qual dessas regiões (ou ambas) é responsável pela necrose sistêmica não foi possível, pois os recombinantes que poderiam fornecer essa informação não foram infecciosos. A inexistência de um clone infeccioso do isolado AF199 impossibilitou a obtenção de recombinantes recíprocos. Além disso, não foi possível identificar qualquer sequência relacionada ao fenótipo de necrose sistêmica na cultivar Vanguard 75. Provavelmente outras regiões do genoma do isolado AF199 estão envolvidas na severidade e cinética de desenvolvimento de sintomas em alface.

Utilizando os mesmos recombinantes do estudo anterior, Krause-Sakate *et al.* (2007) constataram que a presença de um fragmento de 1989 nucleotídeos correspondente à parte das regiões codificadoras das proteínas P1 e HC-Pro do isolado E leva a um atraso de uma semana no desenvolvimento dos sintomas após inoculação na cultivar Salinas 88 ( $mol^2$ ). Portanto, as proteínas P1 e HC-Pro do isolado AF199 devem ser importantes para a adaptabilidade desse isolado. É possível que essa adaptabilidade esteja relacionada à supressão do silenciamento gênico induzido pela proteína HC-Pro ou mesmo pela maior capacidade de movimento sistêmico, já que os recombinantes que possuíam as sequências P1/HC-Pro do isolado AF199 apresentaram cinéticas de desenvolvimento de sintomas intermediárias entre os parentais, enquanto os recombinantes que possuíam a sequência P1/HC-Pro do isolado E apresentaram cinéticas de desenvolvimento de sintomas semelhantes a esse isolado (Krause-Sakate *et al.*, 2007).

Embora esses recombinantes tenham sido obtidos *in vitro*, é frequente a ocorrência de recombinação na natureza, a qual é uma forte força geradora de variabilidade (Chare e Holmes, 2006). Dentre os recombinantes gerados, alguns podem apresentar maior adaptação que os parentais e, portanto, podem prevalecer no campo a longo prazo.

A análise molecular poderá identificar determinantes virais responsáveis pela virulência e adaptabilidade do isolado AF199, e quais os possíveis fatores do hospedeiro envolvidos nessas características. Assim, os objetivos desse trabalho foram: (i) analisar os tecidos de óvulos e embriões de alface infectados pelos isolados E e AF199; (ii) estudar os mecanismos de adaptabilidade dos isolados AF199 e E, e de três recombinantes entre esses dois isolados, na cultivar de alface Salinas 88 e em *Nicotiana benthamiana*.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. A família *Potyviridae*

*Potyviridae* é uma das maiores e economicamente mais importantes famílias de vírus que infectam plantas, contendo cerca de 15% das espécies descritas (Fauquet *et al.*, 2005). As espécies dessa família estão agrupadas em seis gêneros (*Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*), que diferem quanto ao tipo de vetor e organização do genoma (Berger *et al.*, 2005). Os potyviridae são cosmopolitas, sendo encontrados em todo o mundo infectando mais de 2.000 espécies de plantas pertencentes a 81 famílias e mais de 550 gêneros. Todos os potyviridae induzem a formação de inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, também denominadas “cata-ventos”, sendo esta uma característica determinante para a identificação de espécies pertencentes à família. As espécies dessa família, em ampla maioria, são facilmente transmitidas experimentalmente de plantas infetadas para plantas sadias pela inoculação via extrato vegetal tamponado ou via preparações virais concentradas (Berger *et al.*, 2005).

O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso da família, com 91 espécies, incluindo o *Lettuce mosaic virus* (LMV). Esses vírus são transmitidos de maneira não-circulativa por afídeos, por intermédio da proteína HC-Pro (“Helper Component-Proteinase”) codificada pelo

vírus (Shukla *et al.*, 1994). As partículas virais são alongadas e flexuosas, com 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro. O genoma é constituído por uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos. O RNA genômico é envolto por um capsídeo formado por cerca de 2.000 cópias da proteína capsidial (CP). A proteína capsidial dos potyvírus, com massa molecular de aproximadamente 34 kDa, apresenta uma região amino-terminal altamente variável em tamanho e sequência, uma região central conservada contendo de 215 a 227 aminoácidos, e uma região carboxi-terminal com 18-20 aminoácidos. As regiões amino- e carboxi-terminal estão voltadas para o exterior da partícula viral, e são responsáveis pelas propriedades antigênicas do vírus (Shukla *et al.*, 1994).

Os potyvírus se assemelham aos picornavírus quanto à organização do genoma e processamento da poliproteína (Bedard e Semler, 2004). O RNA em sua extremidade 5' é covalentemente ligado a uma proteína de origem viral (VPg), e possui uma cauda poliadenilada na extremidade 3' (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). A sequência de nucleotídeos da região 5'-não traduzida (NTR), é essencial para a tradução do RNA viral por conter um sítio de entrada interna de ribossomos (Basso *et al.*, 1994). A região 3'NTR coopera com a 5'NTR para uma tradução eficiente (Gallie *et al.*, 1995). O RNA genômico possui uma única fase aberta de leitura (“open reading frame”, ORF), capaz de codificar uma poliproteína com cerca de 350 kDa. A poliproteína é processada por três proteases virais (P1, HC-Pro e NIa), originando de 8 a 10 produtos finais (Shukla *et al.*, 1994). Uma característica das proteínas sintetizadas pelos potyvírus é o seu caráter multifuncional. Cada proteína é geralmente responsável por várias funções durante o ciclo de infecção (revisado por Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

O nível de identidade entre as sequências dos genomas de espécies do gênero *Potyvirus* é relativamente baixo. A análise de 187 genomas completos de espécies da família *Potyviridae* por meio de comparações entre as sequências da ORF completa demonstrou que a

maioria das espécies em um mesmo gênero possui entre 50 e 55% de identidade, embora existam alguns grupos de espécies mais relacionadas (Adams *et al.*, 2005). O nível de identidade para demarcação de espécies no gênero *Potyvirus* foi proposto em 76% para a sequência de nucleotídeos, e 82% para a sequência de aminoácidos. A análise da região codificadora de cada proteína em separado indicou níveis de demarcação de espécies (nucleotídeos) de 58% (P1) ou de 74-78% (demais genes). Comparações utilizando a região codificadora da proteína CI foram as que melhor representaram o genoma completo. A análise com base em 1.220 sequências da proteína capsidial indicou um valor de 76-77% de identidade de nucleotídeos para demarcação de espécies (Adams *et al.*, 2005).

## **2. HC-Pro: supressora de respostas de defesa de plantas**

Uma das proteínas liberadas após a clivagem da poliproteína dos potyvírus é a HC-Pro. É uma proteína multifuncional que atua em diferentes etapas do ciclo de infecção viral: transmissão por afídeos, atividade de auto-protease, fator auxiliar na replicação do genoma viral, movimento célula-a-célula e a longa distância, transmissão pela semente, determinante de patogenicidade, sinergismo viral, e inibição da resposta de defesa da planta (revisado por Urucuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Estudos de mutagênese e alinhamentos de sequências identificaram três regiões funcionais de HC-Pro: uma região amino-terminal essencial para a transmissão pelo vetor, uma região central relacionada com a capacidade de ligação a RNA, envolvida na amplificação do genoma viral e na supressão de silenciamento gênico, e uma região carboxi-terminal onde está presente o sítio proteolítico. A região amino-terminal da HC-Pro do LMV não é essencial para sua auto-interação, e a região carboxi-terminal é extremamente resistente a proteólise (Plisson *et al.*, 2003).

Anandalakshmi *et al.* (1998) demonstraram que HC-Pro age como uma supressora do silenciamento de RNA. O silenciamento de RNA é uma defesa natural da planta contra o

ataque de vírus (Xie e Guo, 2006). O processo de replicação do RNA viral leva à formação de um RNA de fita dupla (dsRNA), o qual é clivado por RNases tipo III (denominadas “Dicer-like”, DCL, em *Arabidopsis*) em fragmentos de 21-24 nucleotídeos denominados siRNAs (“small interfering RNAs”). Os siRNAs se associam a um complexo ribonucleoprotéico denominado RISC (“RNA-induced silencing complex”), direcionando a degradação sequência-específica do RNA viral (revisado por Vaucheret, 2006). A supressão do silenciamento de RNA é uma estratégia adotada por diferentes espécies de vírus para contornar essa resposta de defesa.

Como evidência da ação supressora da HC-Pro, um mutante natural do *Clover yellow vein virus* (CYVV) que possuía duas mutações pontuais nas posições 27 (T para I) e 193 (D para Y) foi analisado em termos de sua infectividade (Yambao *et al.*, 2007). Esse mutante (MM) induz sintomas menos severos do que o isolado original (n.30), o qual induz necrose generalizada em *Vicia faba*. A HC-Pro mutante foi avaliada por agroinfiltração em plantas de *Nicotina benthamiana* 16c, uma linhagem homocigota para GFP (“green fluorescent protein”). A atividade supressora da HC-Pro mutante foi prejudicada por ambas as mutações. Os resultados reforçam a função da HC-Pro como supressora do silenciamento gênico, e como fator de virulência.

Uma segunda classe de pequenos RNAs conhecidos como miRNAs (“microRNAs”) derivam de RNAs transcritos a partir de genes endógenos não-traduzíveis e processados pela DCL-1. Os miRNAs estão envolvidos na regulação de diversos genes relacionados ao desenvolvimento da planta (revisado por Matranga e Zamore, 2007). A supressão do silenciamento de RNA por HC-Pro também causa, provavelmente de forma inadvertida, a supressão da via dos miRNAs (Dunoyer *et al.*, 2004). A inibição do acúmulo de miRNAs durante a infecção pelo *Turnip mosaic virus* (TuMV) induz uma série de anormalidades no desenvolvimento de órgãos vegetativos e reprodutivos em *Arabidopsis*, indicando que os

sintomas induzidos por potyvírus podem ser devidos, pelo menos parcialmente, à interferência na via dos miRNAs (Kasschau *et al.*, 2003).

A região central da HC-Pro é responsável pela inibição do acúmulo dos miRNAs, embora o mecanismo ainda não tenha sido determinado (Mallory *et al.*, 2001). Uma possível forma de ação seria o estímulo de reguladores negativos endógenos do silenciamento. Em apoio a essa hipótese, foi demonstrado que HC-Pro interage com uma proteína da planta relacionada a calmodulina, denominada rgsCaM, e que rgsCaM é capaz de suprimir o silenciamento de RNA (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Outro mecanismo proposto para a ação da HC-Pro é que a mesma teria a capacidade de sequestrar dsRNAs virais, inativando o silenciamento gênico (Mérai *et al.*, 2006). Entretanto, os autores não demonstram que a interação existente entre a HC-Pro do TEV e os dsRNAs é de fato a base do mecanismo de ação supressora dessa proteína. Fato curioso é que o mesmo resultado não foi observado para a HC-Pro do PVY.

Além de sua função como supressora de silenciamento, HC-Pro atua também em outra via de defesa da planta contra patógenos. Ballut *et al.* (2005) constataram a ação supressora da HC-Pro do LMV sobre a atividade de RNase do proteossomo 20S, um componente protéico envolvido na regulação do metabolismo celular e possivelmente responsável pela degradação inespecífica de RNAs virais. A atividade de endonuclease do proteossomo 20S foi associada à degradação do RNA genômico do LMV e do *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Ballut *et al.*, 2003).

### **3. Determinantes de virulência**

Alguns vírus podem infectar uma planta sem indução de sintomas macroscópicos. Por outro lado, certos vírus podem levar a uma rápida indução de sintomas severos, eventualmente ocasionando a morte de seu hospedeiro. Uma combinação de fatores ambientais e genéticos é responsável pelas diferenças na severidade de sintomas causados por

diferentes isolados virais (Hull, 2002). Determinantes de sintomatologia já foram caracterizados em diversas interações potyvírus-hospedeiro, e, dependendo da interação, diferentes regiões do genoma viral estão envolvidas.

A classificação de isolados de *Potato virus Y* (PVY) é bastante complexa, levando-se em consideração o hospedeiro, o tipo de sintoma induzido, sorologia e dados moleculares. São conhecidos três grupos de estirpes infectando batata: PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>C</sup>. Os isolados PVY<sup>N</sup> induzem necrose de nervuras em *Nicotina tabacum* 'Xanthi', enquanto os isolados PVY<sup>O</sup> induzem apenas mosaico. Por meio da construção de vírus recombinantes entre isolados do tipo PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>O</sup> foram identificados dois resíduos (K<sub>400</sub> e D<sub>419</sub>) na região C-terminal da HC-Pro do PVY<sup>N</sup> envolvidos no sintoma de necrose (Tribodet *et al.*, 2005).

Os isolados de *Potato virus A* (PVA) B11 e U infectam plantas de *Nicotiana benthamiana* sistemicamente, causando mosaico severo e distorção foliar. O isolado B11 difere de U por não ser capaz de infectar plantas de batata, provavelmente devido a sucessivas passagens experimentais por *N. benthamiana*. Vírus recombinantes foram obtidos a partir dos clones infecciosos de ambos os isolados. Curiosamente, um dos recombinantes induziu um fenótipo atípico de clorose das nervuras sem causar distorção foliar em *N. benthamiana*. Apesar da diferença fenotípica, a comparação dos genomas dos dois isolados revelou identidade elevada. A região 3'-NTR é idêntica nos dois isolados, enquanto a região 5'-NTR e a ORF apresentam 97,5% de identidade de nucleotídeos. A maior variabilidade foi encontrada nas regiões codificadoras da proteína 6K<sub>1</sub> e da proteína capsidial, com 95,5 e 96,8% de identidade, respectivamente. Aparentemente a recombinação de isolados semelhantes originou um novo isolado viral capaz de induzir um fenótipo distinto, sugerindo que diferentes partes do genoma agem coordenadamente favorecendo a adaptabilidade de novos isolados (Paalme *et al.*, 2004).

Isolados de *Tobacco etch virus* (TEV), quando inoculados em plantas de pimenta (*Capsicum frutescens* 'Tabasco'), causam tipicamente necrose do sistema radicular, seguida



de murcha e morte da planta. Utilizando vírus recombinantes entre a estirpe típica TEV-HAT, que induz murcha, e o isolado TEV-NW (“non wilt”), que não causa murcha, identificaram-se duas regiões do genoma viral responsáveis por esse fenótipo: a primeira região corresponde à porção amino-terminal da proteína P3 e à porção carboxi-terminal de CI, e a segunda região corresponde à sequência completa de 6K<sub>2</sub> e à porção amino-terminal da VPg (Chu *et al.*, 1997). Todas essas regiões são necessárias para que o fenótipo de murcha ocorra.

Uma sequência de 173 aminoácidos da porção carboxi-terminal da proteína P3+6K<sub>1</sub> do isolado PS do *Plum pox virus* (PPV) foi identificada como envolvida na diferença de sintomas observados em plantas de *Nicotiana clevelandii* inoculadas com os isolados PS e R (Saénz *et al.*, 2000). Esse determinante de virulência também participa na indução de sintomas em *Pisum sativum*, mas provavelmente uma sequência de apenas 74 aminoácidos está relacionada com o fenótipo nesse hospedeiro. Subpopulações virais de PPV-PS foram segregadas a partir de um único isolado (Saénz *et al.*, 2001). Alguns sub-isolados induziram sintomas distintos daqueles induzidos pelo isolado original. A comparação das sequências nucleotídicas entre os sub-isolados revelou uma identidade de 99,9%. A alteração de um único aminoácido na HC-Pro foi suficiente para modificar os sintomas induzidos em *Nicotiana* spp. e alterar a capacidade de infecção em plântulas de pêra.

Por meio da construção de vírus recombinantes e de mutagênese sítio-dirigida, o aminoácido básico arginina na posição 180 foi substituído por um aminoácido hidrofóbico (isoleucina) na sequência conservada FRNK da HC-Pro do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (Gal-On, 2000). Essa substituição reduziu a severidade dos sintomas em abóbora e levou à infecção latente (sem sintomas) em melão, melancia e pepino. Entretanto, apesar da alteração na virulência, não houve redução no acúmulo de RNA viral quando comparado ao isolado original. A sequência FRNK é totalmente conservada na proteína HC-Pro dos potyvírus, estando presente em todas as espécies do gênero. Curiosamente, as plantas

infectadas com o ZYMV mutante tornaram-se “protegidas” contra uma posterior infecção com isolados severos.

Uma mutação pontual na proteína P3 de isolados de ZYMV foi suficiente para induzir “quebra” de tolerância, tornando o vírus mutante mais apto que o tipo selvagem durante infecções mistas em cultivares tolerantes de *Cucurbita pepo* (Desbiez *et al.*, 2003).

Procurando identificar determinantes de virulência, um fragmento de 953 nt correspondente à região codificadora da HC-Pro do isolado LMV-E foi identificado como responsável pela severidade de sintomas na cultivar de alface Trocadero, induzindo mosaico severo e necrose (Redondo *et al.*, 2001). Vírus recombinantes derivados do isolado LMV-0 (que induz sintomas suaves) contendo a sequência de 953 nt do isolado LMV-E adquiriram a capacidade de induzir os mesmos sintomas severos. As sequências deduzidas de aminoácidos dos dois isolados apresentam apenas sete diferenças nessa região, porém a sequência conservada FRNK está presente em ambos os isolados.

Trabalho semelhante foi desenvolvido com os isolados AF199 e E do LMV (Krause-Sakate *et al.*, 2005). O isolado AF199 induz sintomas severos de murcha e necrose sistêmica nas cultivares Ithaca e Vanguard 75. A análise de recombinantes entre AF199 e E identificou duas regiões no genoma como responsáveis pelo fenótipo de necrose sistêmica. A região compreendendo os nucleotídeos 112-386 (correspondente à região codificadora da proteína P1) e, ou a região compreendendo os nucleotídeos 5496-5855 (correspondente à região codificadora da proteína CI) são suficientes para indução de murcha e necrose sistêmica na cultivar Ithaca, mas não em ‘Vanguard 75’, indicando que no genoma do isolado AF199 há determinantes de virulência distintos para essas duas cultivares. Interessantemente, não existem diferenças nas sequências deduzidas de aminoácidos entre os dois isolados nessas regiões, sugerindo que o fenótipo observado pode estar relacionado com a estrutura primária e/ou secundária do RNA viral.

Da mesma forma que regiões codificadoras, as regiões não codificadoras dos genomas virais também estão relacionadas com a sintomatologia dos potyvírus. Trabalho com o *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) demonstrou o envolvimento de um segmento de 58 nucleotídeos rico em adenina e uracila da região 3'-NTR na atenuação dos sintomas do TVMV sem, no entanto, causar uma redução no acúmulo de RNA viral (Rodriguez-Cerezo *et al.*, 1991). O mecanismo de atenuação dos sintomas não foi identificado, mas possivelmente está relacionado com alterações na estrutura secundária da região 3'-NTR. Da mesma forma, demonstrou-se que vírus contendo deleções nos nucleotídeos 127 a 145 da região 5'-NTR do PPV induzem sintomas atenuados quando comparados ao isolado selvagem (Simón-Buela *et al.*, 1997).

Objetivando caracterizar fatores virais e do hospedeiro em interações moleculares potyvírus-planta, 35 acessos e mutantes de *Arabopsis thaliana* foram inoculados com três isolados de LMV (E, 0 e AF199), resultando numa ampla gama de fenótipos (Revers *et al.*, 2003). A análise de recombinantes entre os isolados 0 e E mapeou um determinante de virulência responsável pela suscetibilidade do acesso Nd-1 ao isolado E entre os nucleotídeos 5855-6163, correspondentes à região codificadora da proteína VPg. A análise de populações segregantes revelou três genes dominantes conferindo resistência a isolados de LMV. O gene *LLMI* foi responsável pela resistência local do acesso Columbia ao isolado 0, enquanto dois genes dominantes inibiram o movimento sistêmico do isolado AF199. Esses resultados demonstram a existência de diversos determinantes virais e do hospedeiro que interagem de forma positiva ou negativa durante o processo de infecção, podendo levar a respostas compatíveis (suscetibilidade) ou incompatíveis (resistência). Além disso, deixam claro que estudos realizados com o objetivo de identificar e caracterizar determinantes de virulência devem sempre considerar o isolado viral e a cultivar/genótipo do hospedeiro em questão, pois diferentes combinações de isolado viral e cultivar do hospedeiro podem permitir a identificação de certos determinantes, e impedir a identificação de outros.

#### 4. Determinantes de patogenicidade

A resistência a vírus devido a genes recessivos é bastante comum, compreendendo cerca de 40% de todos os casos conhecidos em relação a potyvírus (Provvidenti & Hampton, 1992, citado por Revers *et al.*, 2003). O mecanismo de ação desses genes difere daquele dos genes de resistência dominantes. Ao invés de acionar respostas de defesa da planta, como a resistência sistêmica adquirida (SAR), a resposta de hipersensibilidade (HR) ou o silenciamento de RNA, a maioria dos genes recessivos codifica fatores do metabolismo celular, os quais frequentemente são necessários em algum estágio do ciclo de infecção e/ou desenvolvimento da doença. A ausência de tais fatores, ou a presença de versões mutantes, impede que a interação com fatores virais ocorra, e conseqüentemente confere à planta um caráter de resistência. Geralmente os genes responsáveis por esse tipo de resistência ocorrem em agrupamentos, com especificidade para diferentes espécies de potyvírus, ou para estirpes de uma espécie de vírus (Provvidenti & Hampton, 1992, citado por Revers *et al.*, 2003).

Algumas regiões do genoma dos potyvírus, particularmente a sequência codificadora da VPg, estão diretamente relacionadas com a capacidade do vírus em suplantiar genes de resistência ou com a habilidade de infectar espécies hospedeiras específicas (Revers *et al.*, 1999). Variações de seis aminoácidos na VPg do isolado TVMV-S estão envolvidas na capacidade de infectar plantas contendo o gene de resistência *va*, como a cultivar TN 86 de fumo (Nicolas *et al.*, 1997). A VPg provavelmente interage com um fator do hospedeiro envolvido no movimento célula-a-célula do vírus, pois o isolado selvagem TVMV-WT, incapaz de infectar sistemicamente essa cultivar, replica normalmente em protoplastos.

A VPg é uma proteína de origem viral que está covalentemente ligada à extremidade 5' do RNA viral (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Por meio do sistema duplo-híbrido de levedura, foi demonstrada a interação da proteína precursora VPg-Pro do TEV com os fatores de iniciação de tradução eucariotos eIF4E e eIFiso4E (Schaad *et al.*, 2000). Posteriormente confirmou-se que o gene *pvr2* (“potyvirus resistance” 2), presente em plantas de pimentão e

que confere resistência contra algumas estirpes de PVY, codifica o fator eIF4E, por meio da análise de segregação dos alelos de *pvr2* e uma isoforma do eIF4E, levando a um estado de incompatibilidade entre VPg e eIF4E em genótipos resistentes (Ruffel *et al.*, 2002). O gene *pvr2* foi isolado e caracterizado, mostrando uma identidade elevada com os eIF4E de *A. thaliana* e arroz (Ruffel *et al.*, 2004). Em trabalho semelhante, identificou-se o gene *lsp1* (“loss-of-susceptibility to potyviruses” 1) em mutantes de *A. thaliana* como o eIFiso4E, conferindo resistência a isolados de TuMV e TEV (Lellis *et al.*, 2002). A análise genética de 19 cultivares de alface em relação à infecção por diferentes isolados do LMV revelou uma correlação perfeita entre três isoformas do eIF4E e os alelos recessivos *mol*<sup>1</sup> e *mol*<sup>2</sup>. Ambos, eIF4E e *mol*<sup>1</sup>, co-segregaram na progênie obtida a partir de cruzamentos entre genótipos suscetíveis com genótipos contendo o alelo *mol*<sup>1</sup>, resultado confirmado pela expressão ectópica do eIF4E (Nicaise *et al.*, 2003). O modelo atualmente proposto para a interação entre a VPg e o eIF4E sugere que a VPg teria função análoga ao “cap” encontrado em mRNAs eucariotos, sendo reconhecida pelo eIF4E de forma a tornar possível a tradução do genoma viral (Ruffel *et al.*, 2005). Entretanto, essa hipótese ainda não foi comprovada experimentalmente.

Outras regiões do genoma de potyvírus também estão envolvidas na interação com genes de resistência. Duas mutações pontuais fora do motivo associado diretamente com a ação de helicase da proteína CI do TuMV foram suficientes para suplantarem a resistência em plantas de nabo (*Brassica napus*) contendo o gene dominante *TuRB01* (Jenner *et al.*, 2000). Trabalho posterior demonstrou que a alteração de um único aminoácido na proteína P3 do TuMV determina a capacidade de infectar plantas contendo o gene *TuRB03*. Além disso, a região C-terminal da proteína P3 foi identificada como responsável pelas diferenças de sintomas em *Brassica juncea* (Jenner *et al.*, 2003). O peptídeo 6K<sub>2</sub>, que possui função de ancoragem do complexo de replicação viral à membrana do retículo endoplasmático, foi identificado como determinante de infecção sistêmica e indução de sintomas em *N.*

*benthamiana* e determinante de infecção sistêmica em *N. tabacum* durante a interação com o PVA (Spetz e Valkonen, 2004).

Alguns genes de resistência recessivos para potyvírus interferem no movimento célula-a-célula ou à longa distância, limitando o vírus à célula inicialmente infectada. O alelo recessivo *ra*, que pode estar ligado ou mesmo ser um alelo do gene dominante *Ry<sup>adg</sup>*, bloqueia o transporte vascular do PVA (Hamalainen *et al.*, 2000).

## **5. Transmissão pela semente**

O impacto epidemiológico de uma doença é altamente influenciado pelo inóculo primário, ou seja, o número de plantas infectadas no primeiro ciclo da doença. Portanto, torna-se evidente a importância da transmissão vertical de vírus por meio de sementes (Hull, 2002). Cerca de 20% dos vírus de plantas são transmitidos por sementes. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos.

A transmissão pela semente pode ocorrer de forma direta ou indireta. A transmissão direta se dá pela invasão do embrião após a fertilização, enquanto a indireta é mediada pela infecção de gametas antes da fertilização. Em alguns casos, ambos os processos podem ocorrer simultaneamente, embora a contribuição de cada processo dependa de diversos fatores (Maule e Wang, 1996). Para que a invasão direta do embrião imaturo ocorra, as partículas virais precisam atravessar o limite entre os tecidos maternos da progênie (embrião). Somente após os primeiros estudos de transmissão pela semente no patossistema *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV)-ervilha foi possível propor um modelo que explicasse esse processo.

Em estudos de transmissão de PSbMV em ervilha, o vírus foi detectado em tecidos florais (sépalas, pétalas, anteras e carpelos) em duas cultivares de ervilha, antes da fertilização (Wang e Maule, 1992). Todavia, não foram encontradas partículas virais nos grãos de pólen, nem nos óvulos. Apenas nos primeiros estágios do desenvolvimento da semente, após a fertilização, foram encontradas partículas virais no embrião. Foi proposto que um tecido

conectivo transiente, denominado suspensor, possibilitaria o acesso do vírus ao embrião (Wang e Maule, 1994). O suspensor, que surge entre os tecidos da planta-mãe e do óvulo após a fertilização, e que provavelmente está relacionado com o desenvolvimento e nutrição do embrião, atuaria como uma ponte para que as partículas virais atingissem o embrião, e sua degeneração “fecharia a janela” para a transmissão do vírus pela semente. Entretanto, é sabido que embora haja continuidade simplástica (presença de plasmodemas) entre o suspensor e o embrião em dicotiledôneas, não há conexão simplástica entre as células do suspensor e as células da testa de semente, impossibilitando o estabelecimento do vírus nos tecidos do embrião.

Roberts *et al.* (2003) propuseram uma nova rota para a invasão do embrião. As partículas virais alcançariam o embrião via suspensor, por meio de sua ligação com a região micropolar, e desta com a testa de semente. Entretanto, não se tem conhecimento da existência de plasmodesmas entre esses tecidos. Os autores, por meio de análises ultraestruturais, sugerem que há conexão simplástica entre as células da testa e da região micropolar, pois observaram a presença tanto de partículas virais como da proteína CI na parede das células entre os tecidos. Não foram observadas quaisquer estruturas semelhantes a plasmodemas em tecidos de plantas infectadas ou sadias. A constatação indireta da presença de plasmodesmas entre os limites desses tecidos poderia explicar o processo de infecção direto do embrião.

Embora o modelo proposto por Wang e Maule (1994) sugira que a infecção do embrião de ervilha pelo PSbMV não ocorre antes da fertilização, outros autores, trabalhando com patossistemas distintos, encontraram resultados diferentes. Alta taxa de infecção (80%) de óvulos de *Phaseolus vulgaris* L. pelo *Bean common mosaic virus* (BCMV) foi detectada antes da fertilização (Schippers, 1963). Porém, a taxa de transmissão desse vírus pela semente é de apenas 15%. Estudos com o *Soybean mosaic virus* (SMV) demonstraram que embriões infectados de cultivares nas quais não ocorre transmissão pela semente apresentam

progressiva redução no acúmulo de partículas virais ao longo do processo de desenvolvimento do embrião, levando à ausência de sementes infectadas (Bowers e Goodman, 1979). Já em plantas de ervilha infectadas pelo PSbMV a taxa de infecção de embriões permanece inalterada ao longo do desenvolvimento da semente (Wang e Maule, 1994). Em conjunto, esses resultados indicam que a simples presença do vírus no embrião imaturo não é suficiente para assegurar a transmissão pela semente, pois em alguns casos o vírus pode ser inativado durante o desenvolvimento, ou embriões infectados podem se tornar inviáveis, de forma que apenas sementes livres de vírus sejam produzidas.

O mecanismo de transmissão do nepovírus *Tobacco ringspot virus* (TRSV) pela semente de soja foi estudado em óvulos coletados um dia antes do florescimento. Foram encontradas partículas virais no embrião, demonstrando um processo direto de transmissão via óvulo antes da polinização. Os autores realizaram experimentos de polinização cruzada, os quais sugeriram que a infecção dos megagametófitos é o principal fator de transmissão pela semente (Yang e Hamilton, 1974).

Poucos trabalhos foram realizados visando elucidar o mecanismo de transmissão de LMV pela semente de alface. Por meio de cruzamentos entre plantas sadias e infectadas utilizando plantas com esterilidade masculina, foi evidenciada a capacidade de transmissão via óvulo, alcançando taxas de transmissão superiores a 5%, enquanto a taxa de transmissão via pólen foi inferior a 0,5% (Ryder, 1964). A localização do LMV em embriões imaturos de alface em secções ultrafinas foi investigada por meio de imunomarcção (Hunter e Bowyer, 1994). Os autores encontraram partículas virais em todos os tecidos do óvulo, exceto no saco embrionário. Contudo, não é sabido se partículas de LMV presentes em tecidos não-embrionários necessariamente tornam a semente infectada. Os autores sugerem que a combinação isolado/cultivar utilizada pode não ter sido adequada para a infecção do tecido embrionário.



## 6. Recombinação: geração de variabilidade

Para um vírus infectar seu hospedeiro sistemicamente, ele deve ser capaz de se disseminar a partir do foco inicial de infecção para o resto da planta. Evidentemente, isso implica que os processos virais básicos, tais como replicação, movimento célula-a-célula e a longa distância, devem ser eficientes. Esses processos são mediados por proteínas codificadas pelo vírus, as quais requerem interações específicas com fatores do hospedeiro. Alterações nessas proteínas que resultem em interações incompatíveis ou sub-ótimas podem impedir ou dificultar o estabelecimento de uma infecção sistêmica. Conseqüentemente, a composição genética de um vírus é moldada por seu hospedeiro. Contudo, uma espécie de vírus não é constituída por uma única sequência genômica, mas por um conjunto de variantes e mutantes denominados *quasispecies* (Hull, 2002). A existência de variantes dentro de uma população de vírus aumenta a probabilidade de sobrevivência e a habilidade do vírus em se adaptar a diferentes hospedeiros. O processo de adaptação é totalmente dependente de fenômenos como mutação, pseudo-recombinação e recombinação (Culver e Padmanabhan, 2007).

Eventos naturais de recombinação, envolvendo a troca de material genético entre duas moléculas de ácido nucléico com sequências semelhantes (recombinação homóloga) ou distintas (recombinação não-homóloga), gerando moléculas híbridas, têm sido relatados para vários vírus de plantas, inclusive para potyvírus, incluindo o PPV (Cervera *et al.*, 1993), *Yam mosaic virus* (YMV) (Bousalem *et al.*, 2000) e LMV (Krause-Sakate *et al.*, 2004). No caso do TuMV, foi sugerido que eventos de recombinação que ocorreram em um determinado hospedeiro podem ter capacitado alguns recombinantes a infectar novos hospedeiros (Ohshima *et al.*, 2002). A análise de sequências de populações de vários vírus de DNA e RNA indica que a recombinação pode ser a principal causa de variação evolutiva (Garcia-Arenal *et al.*, 2001), com diferentes estimativas obtidas quando diferentes genes são analisados (Roossinck, 1997). Em escala populacional, eventos de recombinação podem resultar em fortes mudanças nas propriedades dos vírus, com importantes conseqüências

epidemiológicas, incluindo o surgimento de variantes capazes de infectar plantas contendo genes de resistência. Um exemplo drástico foi o surgimento de uma nova estirpe do vírus da gripe por meio de recombinação envolvendo o gene da hemaglutinina, o qual é um forte determinante de virulência. Esse novo variante tornou-se muito mais agressivo que os parentais, ocasionando a morte de milhões de pessoas durante a epidemia que ficou conhecida como “Gripe Espanhola” (Gibbs *et al.*, 2001).

Muitos estudos têm se concentrado na variabilidade genética entre isolados da mesma espécie. Esses estudos indicam que certas regiões do genoma de potyvírus são flexíveis, permitindo uma elevada diversidade molecular. Exemplos incluem partes da 5’NTR, a proteína P1 e a região amino-terminal da CP (Tordo *et al.*, 1995; Wisler *et al.*, 1995; Aleman-Verdaguer *et al.*, 1997; Kekarainen *et al.*, 1999).

Adaptabilidade em vírus é frequentemente definida como habilidade replicativa, ou seja, maior acúmulo de partículas virais nas células e tecidos infectados. Porém, em um sentido mais amplo, adaptabilidade pode também ser definida como a capacidade de causar infecção sistêmica, a habilidade de ser transmitido a novos hospedeiros, e provavelmente a habilidade de causar menos danos ao hospedeiro (Roossinck, 2005).

A competição direta entre isolados de uma mesma espécie de vírus dentro de uma planta hospedeira pode afetar o sucesso de determinado isolado. Geralmente a competição entre isolados ocorre em termos de nicho de replicação. Entretanto, o isolado que é um competidor mais eficiente na planta hospedeira não é necessariamente aquele que será mais prevalente no campo. Alguns autores têm relatado interferência na competição entre os vírus *Barley yellow dwarf virus* (BYDV)-MAV e BYDV-PAV, duas espécies distintas, porém altamente relacionadas, do gênero *Luteovirus* (Wen *et al.*, 1991). A época de inoculação foi importante para determinar a interferência mútua entre eles. Se o hospedeiro adquire os dois vírus ao mesmo tempo, o BYDV-PAV interfere com a replicação do BYDV-MAV, levando a menores concentrações de BYDV-MAV. Isso sugere que em termos de competição no

hospedeiro, o BYDV-PAV é um forte competidor. Entretanto, se a planta adquire um vírus 15 dias antes do outro, não há interferência do segundo vírus sobre a replicação do primeiro.

Embora existam diversos trabalhos com vírus animais estudando a competição entre isolados virais da mesma espécie, bem como a diferença de adaptabilidade entre eles, poucos trabalhos tem medido a adaptabilidade com vírus de plantas. Análises de recombinação com o cucumovírus *Cucumber mosaic virus* (CMV) revelaram que a adição de sequências na extremidade 3' dos RNAs 2 e 3 do genoma provavelmente resultou de eventos de recombinação intra- e intermolecular, aumentando a adaptabilidade de isolados de CMV em *Alstroemeria* (Chen *et al.*, 2002). Entretanto, em experimentos de competição, os mesmos recombinantes apresentaram menor adaptabilidade em tabaco, mesmo quando inoculados em concentrações até 10 vezes superiores.

Em experimentos de competição, plantas de *Chenopodium quinoa* foram inoculadas com dois isolados do bromovírus *Brome mosaic virus* (BMV), verificando-se a ocorrência de recombinação a partir de lesões locais cloróticas induzidas pelos isolados (Bruyere *et al.*, 2000). Foi observada uma ocorrência frequente de recombinação homóloga entre as moléculas de RNA3 dos isolados. Cerca de 18% das lesões continham moléculas recombinantes, valor elevado quando se considera que foi realizado apenas um procedimento de inoculação.

Um recombinante de PPV com um fragmento correspondente à região codificadora da CP e parte da 3' NTR de um isolado não transmitido por afídeo (PPV-NAT), e o restante do genoma do isolado PPV-SoC, causou sintomas severos em *N. benthamiana*, semelhante ao parental PPV-NAT (Dietrich *et al.*, 2007). Porém, em experimentos de competição, o recombinante foi menos competitivo que seus parentais quando avaliado por RT-PCR. Para que os vírus recombinantes prevaleçam, estes devem competir com os parentais logo após os eventos de recombinação a partir dos quais foram gerados, caso contrário serão provavelmente extintos.

Devido a sua elevada especificidade, sensibilidade e rapidez, a PCR em tempo real passou a ser utilizada em experimentos de competição entre isolados de uma mesma espécie. Essa técnica foi usada para quantificar a adaptabilidade de isolados de TEV em tabaco (Carrasco *et al.*, 2007). Os autores avaliaram a reprodutibilidade da técnica por meio de vários experimentos de competição com o mesmo par de isolados competidores. A sensibilidade do método foi avaliada pela diferenciação de isolados que diferiam em mutações pontuais. Os resultados sugerem que essa técnica pode ser usada para potyvírus, e também para vírus pertencentes a outros gêneros.

## LITERATURA CITADA

- Adams, M.J., Antoniw, J.F. e Fauquet, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology*, v.150, p.459-479. 2005.
- Agriannual. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos. 2007. 491 p.
- Aleman-Verdaguer, M.E., Goudou Urbino, C., Dubern, J., Beachy, R.N. e Fauquet, C. Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, N1b and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyviruses. *Journal of General Virology*, v.78, p.1253-1264. 1997.
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr Jr., J.M., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L. e Vance, V.B. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, v.290, p.142-144. 2000.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. e Vance, V.B. A viral supressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.95, p.13079-13084. 1998.
- Ballut, L., Drucker, M., Pugnieri, M., Cambon, F., Blanc, S., Roquet, F., Candresse, T., Schmid, H.P., Nicolas, P., Le Gall, O. e Badaoui, S. HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. *Journal of General Virology*, v.86, p.2595-2603. 2005.
- Ballut, L., Petit, F., Mouzeyar, S., Le Gall, O., Candresse, T., Schmid, P., Nicolas, P. e Badaoui, S. Biochemical identification of proteasome-associated endonuclease activity in sunflower. *Biochemistry and Biophysics Acta*, v.1645, p.30-39. 2003.
- Bannerot, H., Bouldard, L., Marrou, J. e Duteil, M. Studies on the inheritance of tolerance to lettuce mosaic virus in the lettuce variety Gallega de Invierno (in French). *Annales de Phytopathologie*, v.1, p.219-226. 1969.
- Basso, J., Dallaire, P., Charest, P.J., Devantier, Y. e Laliberte, J.F. Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. *Journal of General Virology*, v.75, p.3157-3165. 1994.

- Beauchemin, C., Boutet, N. e Laliberte, J.F. Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of *Turnip mosaic virus*, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in *planta*. *Journal of Virology*, v. 81, p. 775-782. 2007.
- Bedard, K.M. e Semler, B.L. Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect*, v.6, p.702-713. 2004.
- Berger, P.H., Adams, M.J., Barnett, O.W., Brunt, A.A., Hammond, J., Hill, J.H., Jordan, R.L., Kashiwazaki, S., Rybicki, E.P., Spence, N., Stenger, D.C., Ohki, S.T., Uyeda, I., Van Zaayen, A., Valkonen, J.P. e Vetten, H.J. Family *Potyviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. e Ball, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.819-841.
- Bousalem, M., Douzery, E.J. e Fargette, D. High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus*: A contribution to understanding potyvirus evolution. *Journal of General Virology*, v.81, p.243-255. 2000.
- Bowers, G.R. e Goodman, R.M. Soybean mosaic virus: Infection of soybean seeds parts and seed transmission. *Phytopathology*, v.69, p.569-572. 1979.
- Bruyere, A., Wantroba, M., Flasiński, S., Dzianott, A. e Bujarski, J.J. Frequent homologous recombination events between molecules of one RNA component in a multipartite RNA virus. *Journal of Virology*, v.74, p.4214-4219. 2000.
- Carrasco, P., Daros, J.A., Agudelo-Romero, P. e Elena, S.F. A real-time RT-PCR assay for quantifying the fitness of *Tobacco etch virus* in competition experiments. *Journal of Virological Methods*, v.139, p.181-188. 2007.
- Cervera, M.T., Riechmann, J.L., Martin, M.T. e Garcia, J.A. 3'-terminal sequence of the plum pox virus PS and o6 isolates: Evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *Journal of General Virology*, v.74, p.329-334. 1993.
- Chare, E.R. e Holmes, E.C. A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Archives of Virology*, v.151, p.933-946. 2006.
- Chen, Y.K., Goldbach, R. e Prins, M. Inter- and intramolecular recombinations in the Cucumber mosaic virus genome related to adaptation to alstroemeria. *Journal of Virology*, v.76, p.4119-4124. 2002.
- Chu, M., Lopez Moya, J.J., Llave Correas, C. e Pirone, T.P. Two separate regions in the genome of the tobacco etch virus contain determinants of the wilting response of Tabasco pepper. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.10, p.472-480. 1997.
- Culver, J.N. e Padmanabhan, M.S. Virus-induced disease: Altering host physiology one interaction at a time. *Annual Review of Phytopathology*, v.45, p.221-243. 2007.
- Desbiez, C., Gal-on, A., Girard, M., Wipf-Scheibel, C. e Lecoq, H. Increase in *Zucchini yellow mosaic virus* symptom severity in tolerant zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. *Phytopathology*, v.93, p.1478-1484. 2003.
- Dietrich, C., Al Abdallah, Q., Lintl, L., Pietruszka, A. e Maiss, E. A chimeric *Plum pox virus* shows reduced spread and cannot compete with its parental wild-type viruses in a mixed infection. *Journal of General Virology*, v.88, p.2846-2851. 2007.
- Dinant, S. e Lot, H. Lettuce mosaic virus: A review. *Plant Pathology*, v.41, p.528-542. 1992.

- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C. e Voinnet, O. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, v. 16, p. 1235-1250. 2004.
- Edwardson, J.R. e Christie, R.G. The Potyvirus Group. Florida Agricultural Experiment Station, v.1-4. 1991.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. e Ball, L.A., Eds. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 1259p. 2005.
- Firmino, A.C., Krause-Sakate, R., Jidão, A.S. e Pavan, M.A. Três anos de análise de incidência do *Lettuce mosaic virus* (LMV) e *Lettuce mottle virus* (LeMoV) nos campos de produção de alface do Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, p.192. 2005.
- Gallie, D.R., Tanguay, R.L. e Leathers, V. The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene*, v.165, p.233-238. 1995.
- Gal-on, A. A point mutation in the FRNK motif of the potyvirus helper component-protease gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. *Phytopathology*, v.90, p.467-473. 2000.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A. e Malpica, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, v.39, p.157-186. 2001.
- Gibbs, M.J., Armstrong, J.S. e Gibbs, A.J. The haemagglutinin gene, but not the neuraminidase gene, of 'Spanish flu' was a recombinant. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.356, p.1845-1855. 2001.
- Hamalainen, J.H., Kekarainen, T., Gebhardt, C., Watanabe, K.N. e Valkonen, J.P.T. Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of *Potato virus A* in diploid potatoes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.13, p.402-412. 2000.
- Hull, R. *Matthew's Plant Virology*. Londres, Inglaterra: Academic Press. 2002. 1001 p.
- Hunter, D.G. e Bowyer, J.W. Cytopathology of mature ovaries from lettuce plants infected by lettuce mosaic potyvirus. *Phytopathologische Zeitschrift*, v.140, p.11-18. 1994.
- Jidão, A.S., Pavan, M.A., Silva, N. e Zerbini, F.M. Transmissão via semente do *Lettuce mosaic virus* (LMV) patótipos II e IV em diferentes genótipos de alface. *Summa Phytopathologica*, v.28, p.58-61. 2002.
- Jagger, I.C. A transmissible mosaic disease of lettuce. *Journal of Agricultural Research*, v.20, p.737-741. 1921.
- Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D. e Malnoe, P. Infectious *in vivo* and *in vitro* transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. *Journal of General Virology*, v.78, p.3141-3145. 1997.
- Jenner, C.E., Sánchez, F., Nettleship, S.B., Foster, G.D., Ponz, F. e Walsh, J.A. The cylindrical inclusion gene of *Turnip mosaic virus* encodes a pathogenic determinant to the brassica resistance gene TuRB01. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.13, p.1102-1108. 2000.
- Jenner, C.E., Wang, X., Tomimura, K., Ohshima, K., Ponz, F. e Walsh, J.A. The dual role of the potyvirus P3 protein of *Turnip mosaic virus* as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.16, p.777-784. 2003.
- Johansen, I.E., Dougherty, W.G., Keller, K.E., Wang, D. e Hampton, R.O. Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in *Pisum sativum*. *Journal of General Virology*, v.77, p.3149-3154. 1996.

- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. e Carrington, J.C. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell*, v.4, p.205-217. 2003.
- Kekarainen, T., Merits, A., Oruetxebarria, I., Rajamaki, M. e Valkonen, J.P. Comparison of the complete sequences of five different isolates of *Potato virus A* (PVA), genus Potyvirus. *Archives of Virology*, v.144, p.2355-2366. 1999.
- Khan, M.A., Miyoshi, H., Gallie, D.R. e Goss, D.J. Potyvirus genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ *in vitro* translation: Interactions with translation initiation factors eIF4F and eIFiso4F. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, p. 1340-1349. 2008.
- Kramer, M., Orlando, A. e Silberschmidt, K. Estudos sobre uma grave doença de vírus, responsável pelo depreciação de nossas culturas de alface. *Biológico*, v.11, p.121-134. 1945.
- Krause-Sakate, R. Análise molecular da interação *Lettuce mosaic virus* (LMV)-alface, utilizando como modelo o isolado LMV-AF199. (Tese DS). Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001. 178 p.
- Krause-Sakate, R., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Pavan, M.A., Zerbini, F.M., Marrakchi, M., Candresse, T. e Le Gall, O. A naturally occurring recombinant isolate of *Lettuce mosaic virus*. *Archives of Virology*, v.149, p.191-197. 2004.
- Krause-Sakate, R., Le Gall, O., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrakchi, M., Varveri, C., Pavan, M.A., Souche, S., Lot, H., Zerbini, F.M. e Candresse, T. Molecular and biological characterization of *Lettuce mosaic virus* isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology*, v.92, p.563-572. 2002.
- Krause-Sakate, R., Redondo, E., Richard-Forget, F., Jadao, A.S., Houvenaghel, M.C., German-Retana, S., Pavan, M.A., Candresse, T., Zerbini, F.M. e Le Gall, O. Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Research*, v.109, p.175-180. 2005.
- Krause-Sakate, R., Richard-Forget, F., Redondo, E., Pavan, M.A., Zerbini, F.M., Candresse, T. e Le Gall, O. Quantitative control of *Lettuce mosaic virus* fitness and host defence inhibition by P1-HCPro. *Summa Phytopathologica*, v.33, p.119-123. 2007.
- Le Gall, O. *Lettuce mosaic virus*. In: Jones, A.T., Robinson, D.J., Boonham, N. e Mumford, R. (Ed.). *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists, v.339, 2003.
- Lellis, A.D., Kasschau, K.D., Whitham, S.A. e Carrington, J.C. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Current Biology*, v.12, p.1046-1051. 2002.
- Leonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M.G. e Laliberte, J.F. Interaction of VPg-Pro of *Turnip mosaic virus* with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein *in planta*. *Journal of General Virology*, v.85, p.1055-1063. 2004.
- Lin, S.S., Hou, R.F. e Yeh, S.D. Construction of *in vitro* and *in vivo* infectious transcripts of a Taiwan strain of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, v.43, p.261-269. 2002.
- López-Moya, J.J. e García, J.A. Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Research*, v.68, p.99-107. 2000.



- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. e Vance, V.B. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, v.13, p.571-583. 2001.
- Matranga, C. e Zamore, P.D. Small silencing RNAs. *Current Biology*, v.17, p.789-793. 2007.
- Maule, A.J. e Wang, D. Seed transmission of plant viruses: A lesson in biological complexity. *Trends in Microbiology*, v.4, p.153-158. 1996.
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L. e Silhavy, D. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology*, v. 80, p. 5747-5756. 2006.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M.P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. e Legall, O. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiology*, v.132, p.1272-1282. 2003.
- Nicolas, O., Dunnington, S.W., Gotow, L.F., Pirone, T.P. e Hellmann, G.M. Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome *va* gene resistance in tobacco. *Virology*, v.237, p.452-459. 1997.
- Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., Tan, Z., Sano, T., Azuhata, F., Walsh, J.A., Fletcher, J., Chen, J., Gera, A. e Gibbs, A. Molecular evolution of Turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology*, v.83, p.1511-1521. 2002.
- Paalme, V., Gammelgard, E., Jarvekulg, L. e Valkonen, J.P.T. *In vitro* recombinants of two nearly identical potyviral isolates express novel virulence and symptom phenotypes in plants. *Journal of General Virology*, v.85, p.739-747. 2004.
- Peypelut, M., Krause-Sakate, R., Guiraud, T., Pavan, M.A., Candresse, T., Zerbini, F.M. e Le Gall, O. Specific detection of *Lettuce mosaic virus* isolates belonging to the "Most" type. *Journal of Virological Methods*, v.121, p.119-124. 2004.
- Pink, D.A.C., Kostova, D. e Walkey, D.G.A. Differentiation of pathotypes of lettuce mosaic virus. *Plant Pathology*, v.41, p.5-12. 1992a.
- Pink, D.A.C., Lot, H. e Johnson, R. Novel pathotypes of lettuce mosaic virus - breakdown of a durable resistance ? *Euphytica*, v.63, p.169-174. 1992b.
- Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Retana, S., Le Gall, O., Thomas, D. e Bron, P. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *Journal of Biological Chemistry*, v.278, p.23753-23761. 2003.
- Puurand, U., Valkonen, J.P.T., Makinen, K., Rabenstein, F. e Saarma, M. Infectious *in vitro* transcripts from cloned cDNA of the potato A potyvirus. *Virus Research*, v.40, p.135-140. 1996.
- Redondo, E., Krause-Sakate, R., Shu-Jun, Y., Lot, H., Le Gall, O. e Candresse, T. *Lettuce mosaic virus* pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.14, p.804-810. 2001.
- Revers, F., Guiraud, T., Houvenaghel, M.C., Mauduit, T., Le Gall, O. e Candresse, T. Multiple resistance phenotypes to *Lettuce mosaic virus* among *Arabidopsis thaliana* accessions. *Molecular Plant Microbe Interactions*, v.16, p.608-616. 2003.

- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T. e Maule, A.J. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.12, p.367-376. 1999.
- Revers, F., Lot, H., Souche, S., Le Gall, O., Candresse, T. e Dunez, J. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. *Phytopathology*, v.87, p.397-403. 1997a.
- Revers, F., Yang, S.J., Walter, J., Souche, S., Lot, H., Candresse, T., Dunez, J. e Le Gall, O. Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. *Virus Research*, v.47, p.167-177. 1997b.
- Robaglia, C. e Caranta, C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, v.11, p.40-45. 2006.
- Roberts, I.M., Wang, D., Thomas, C.L. e Maule, A.J. *Pea seed-borne mosaic virus* seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance. *Protoplasma*, v.222, p.31-43. 2003.
- Rodriguez-Cerezo, E., Klein, P.G. e Shaw, J.G. A determinant of diseases symptom severity is located in the 3'-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.88, p.9863-9867. 1991.
- Roossinck, M.J. Mechanisms of plant virus evolution. *Phytopathology*, v.35, p.191-209. 1997.
- Roossinck, M.J. Symbiosis versus competition in plant virus evolution. *Nature Reviews Microbiology*, v.3, p.917-924. 2005.
- Ruffel, S., Caranta, C., Palloix, A., Lefebvre, V., Caboche, M. e Bendahmane, A. Structural analysis of the eukaryotic initiation factor 4E gene controlling potyvirus resistance in pepper: Exploitation of a BAC library. *Gene*, v.338, p.209-216. 2004.
- Ruffel, S., Dussault, M.H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. e Caranta, C. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant Journal*, v.32, p.1067-1075. 2002.
- Ruffel, S., Gallois, J.L., Lesage, M.L. e Caranta, C. The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Molecular Genetics and Genomics*, v.274, p.346-353. 2005.
- Ryder, E.I. Transmission of common lettuce mosaic virus through the gametes of the lettuce plant. *Plant Disease Reporter*, v.48, p.531-540. 1964.
- Ryder, E.J. Inheritance of resistance to common lettuce mosaic. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.95, p.378-379. 1970.
- Saénz, P., Cervera, M.T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J.-B., Riechmann, J.L. e García, J.A. Identification of a pathogenicity determinant of *Plum pox virus* in the sequence encoding the C-terminal region of protein p3+6k<sub>1</sub>. *Journal of General Virology*, v.81, p.557-566. 2000.
- Sáenz, P., Quiot, L., Quiot, J.-B., Candresse, T. e García, J.A. Pathogenicity determinants in the complex virus population of a *Plum pox virus* isolate. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.14, p.278-287. 2001.
- Schaad, M.C., Anderberg, R.J. e Carrington, J.C. Strain-specific interaction of the tobacco etch virus Nla protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology*, v.273, p.300-306. 2000.
- Schippers, B. Transmission of bean common mosaic virus by seed of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Beka. *Acta botanica neerlandica*, v.12, p.433-497. 1963.

- Shukla, D.D., Ward, C.W. e Brunt, A.A. The Potyviridae. Wallingford, UK: CAB International. 1994. 516 p.
- Simón-Buela, L., Guo, H.S. e García, J.A. Long sequence in the 5' noncoding region of plum pox virus is not necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. *Virology*, v.233, p.157-162. 1997.
- Spetz, C. e Valkonen, J.P.T. Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.17, p.502-510. 2004.
- Stangarlin, O.S. Identificação dos vírus causadores de mosaico em cultivares de alface (*Lactuca sativa*) resistentes ao vírus do mosaico da alface nas regiões produtoras do Estado de São Paulo. (Tese M.S.). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995. 72p.
- Stangarlin, O.S., Pavan, M.A. e Silva, N. Occurrence of a new pathotype of *Lettuce mosaic virus* on lettuce in Brazil. *Plant Disease*, v.8, p.490. 2000.
- Tordo, V.M.J., Chachulska, A.M., Fakhfakh, H., Robaglia, C., Astier Manificier, S. e Le Romancer, M. Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. *Journal of General Virology*, v.76, p.939-949. 1995.
- Tribodet, M., Glais, L., Kerlan, C. e Jacquot, E. Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY<sup>N</sup> isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Journal of General Virology*, v.86, p.2101-2105. 2005.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L. e Bernardi, F. Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Research*, v.74, p.157-175. 2001.
- Vaucheret, H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development*, v.20, p.759-771. 2006.
- Wang, D. e Maule, A.J. Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of pea seedborne mosaic virus. *Journal of General Virology*, v.73, p.1615-1620. 1992.
- Wang, D. e Maule, A.J. A model for seed transmission of a plant virus: Genetic and structural analyses of pea embryo invasion by Pea seed-borne mosaic virus. *Plant Cell*, v.6, p.777-787. 1994.
- Wen, F., Lister, R.M. e Fattouh, F.A. Cross-protection among strains of *Barley yellow dwarf virus*. *Journal of General Virology*, v.72, p.791-799. 1991.
- Wisler, G.C., Purcifull, D.E. e Hiebert, E. Characterization of the P1 protein and coding region of the zucchini yellow mosaic virus. *Journal of General Virology*, v.76, p.37-45. 1995.
- Xie, Q. e Guo, H.S. Systemic antiviral silencing in plants. *Virus Research*, v.118, p.1-6. 2006.
- Yambao, M.L., Yagihashi, H., Sekiguchi, H., Sekiguchi, T., Sasaki, T., Sato, M., Atsumi, G., Tacahashi, Y., Nakahara, K.S. e Uyeda, I. Point mutations in helper component protease of *Clover yellow vein virus* are associated with the attenuation of RNA-silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. *Archives of Virology*, v.153, p.105-115. 2007.
- Yang, A.F. e Hamilton, R.I. The mechanism of seed transmission of tobacco ringspot virus in soybean. *Virology*, v.62, p.26-37. 1974.
- Yang, S.J., Revers, F., Souche, S., Lot, H., Legall, O., Candresse, T. e Dunez, J. Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-

insertion on their viability in *Escherichia coli* and on their infectivity to plants. Archives of Virology, v.143, p.2443-2451. 1998.

## CAPÍTULO 1

### IMUNOLocalização DE DOIS ISOLADOS DE *Lettuce mosaic virus* EM ÓVULOS DE ALFACE PRÉ- E PÓS-FERTILIZAÇÃO

Beserra Jr, J.E.A., Vanetti, C.A., Krause-Sakate, R., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M.  
Imunolocalização de dois isolados de *Lettuce mosaic virus* em óvulos de alface pré- e pós-fertilização.

## RESUMO

O relacionamento filogenético entre isolados de *Lettuce mosaic virus* (LMV) ocorre inicialmente em termos da capacidade de transmissão pela semente. O grupo de isolados transmitidos pela semente é dividido em dois subgrupos, constituindo duas estirpes denominadas “Common” e “Most”. Os isolados pertencentes à estirpe LMV-Most (“*moI*-breaking, *seed-transmitted*”) infectam genótipos de alface contendo alelos de resistência recessivos, e são transmitidos pelas sementes dessas cultivares. Com o objetivo de investigar o mecanismo de transmissão pela semente, foram realizados ensaios de imunolocalização de dois isolados de LMV em óvulos de alface. O isolado LMV-AF199, pertencente à estirpe Most, foi detectado em todos os tecidos do óvulo coletado antes e após a fertilização. Já o isolado LMV-E (não-transmitido pela semente) não foi detectado em nenhum dos tecidos do óvulo, antes ou após a fertilização. Esses resultados indicam que a não transmissão pela semente do isolado LMV-E se deve ao fato das partículas virais não serem capazes de atingir o tecido embrionário, e sugerem que fatores virais envolvidos no movimento do vírus na planta estão envolvidos no processo de transmissão do LMV pela semente de alface.

## INTRODUÇÃO

O mosaico da alface, causado pelo *Lettuce mosaic virus* (LMV, família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*), é a principal doença viral da cultura. O LMV é um vírus de partícula alongada e flexuosa, com genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com 10.080 nucleotídeos. Seu RNA possui uma proteína de origem viral (VPg) ligada covalentemente à extremidade 5' e é poliadenilado na extremidade 3' (Revers *et al.*, 1997). De distribuição cosmopolita, o LMV é transmitido por afídeos de maneira não-circulativa e também pela semente (Dinant e Lot, 1992).

O relacionamento filogenético entre isolados de LMV ocorre inicialmente em termos de capacidade de transmissão pela semente (Krause-Sakate *et al.*, 2002). O grupo de isolados não transmitido pela semente é diverso, sem relacionamento aparente entre os diferentes isolados. Os isolados transmitidos pela semente podem ser agrupados em duas estirpes, “Commom” e “Most”. Os isolados pertencentes a estirpe Most (“*mol*-breaking, *seed-transmitted*”) infectam genótipos contendo os alelos de resistência recessivos *mol*<sup>1</sup> e *mol*<sup>2</sup> (Krause-Sakate *et al.*, 2002).

O impacto epidemiológico do mosaico da alface é altamente influenciado pela quantidade de inóculo primário, ou seja, a quantidade de inóculo existente para que se inicie o primeiro ciclo da doença. Portanto, torna-se evidente a importância da transmissão vertical do vírus por meio das sementes (Hull, 2002).

A transmissão pela semente pode ocorrer de forma direta ou indireta. A transmissão direta se dá pela invasão do embrião após a fertilização, enquanto a indireta é mediada pela infecção de gametas antes da fertilização. Em alguns casos, ambos os processos podem ocorrer simultaneamente (Maule e Wang, 1996). Para que a invasão direta do embrião imaturo ocorra, as partículas virais precisam atravessar o limite entre os tecidos maternos e os da progênie (embrião).

Os mecanismos de transmissão pela semente de vírus do gênero *Potyvirus* vêm sendo estudados principalmente no patossistema *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV)-ervilha, onde já foram mapeados os determinantes de transmissão pela semente (Johansen *et al.*, 1996), e determinados os tecidos do embrião que devem ser infectados pelo vírus para que a transmissão pela semente ocorra (Wang e Maule, 1994). Entretanto, são escassos os estudos sobre os mecanismos de transmissão de LMV pela semente de alface.

O isolado brasileiro LMV-AF199, obtido de plantas de alface no estado de São Paulo (Stangarlin *et al.*, 2000), pertence à estirpe Most (Krause-Sakate *et al.*, 2002). A taxa de transmissão pela semente desse isolado é bastante elevada, chegando a 16,5% em cultivares de alface onde genes de resistência estão ausentes, e a 1,9% em genótipos contendo os alelos recessivos  $moI^1$  e  $moI^2$  (Jadão *et al.*, 2002).

O isolado LMV-E, obtido de plantas de alface na Espanha (Dinant e Lot, 1992), é capaz de infectar plantas contendo os alelos de resistência recessivos  $moI^1$  e  $moI^2$ . Entretanto, esse isolado não é transmitido pela semente nessas plantas e, portanto não pertence à estirpe Most. Filogeneticamente, esse isolado se agrupa em um ramo distinto dos demais isolados de LMV transmitidos pela semente (Krause-Sakate *et al.*, 2002).

Ambos os isolados infectam os tecidos vegetativos da cultivar de alface Salinas 88, que possui o alelo recessivo  $moI^2$ . Entretanto, não se sabe com precisão quais os tecidos reprodutivos infectados por esses isolados. Este trabalho teve como objetivo analisar os tecidos de óvulos de plantas de alface da cultivar Salinas 88 infectadas pelos isolados E e AF199, antes e logo após a fertilização. A análise de secções semi-finas indicou que o isolado AF199 é capaz de invadir todos os tecidos do óvulo mesmo antes da fertilização do embrião, enquanto que o isolado E não foi encontrado em nenhum dos tecidos, tanto em óvulos não fertilizados como após a polinização.



## MATERIAL E MÉTODOS

**Isolados virais e material vegetal.** Os isolados virais utilizados nesse estudo foram obtidos a partir de plantas de alface infectadas em São Paulo, Brasil (isolado AF199) e Espanha (isolado E), ambos já caracterizados (Dinant e Lot, 1992; Stangarlin *et al.*, 2000). Os isolados foram mantidos em plantas de *Nicotiana benthamiana* em casa de vegetação.

**Inoculações.** Folhas de *N. benthamiana* infectadas foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,01M pH 7,2, contendo 0,1% (p/v) de sulfito de sódio usando carborundum 400 mesh como abrasivo. Plantas de alface, cultivar Salinas 88, foram inoculadas quando apresentavam o quarto par de folhas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até a fase de florescimento. A infecção viral foi comprovada por ELISA indireto, utilizando anti-soro policlonal produzido a partir do isolado AF199 (Krause-Sakate *et al.*, 2001).

**Coleta dos óvulos.** As flores foram coletadas quando as plantas tinham aproximadamente 4 meses de idade. As flores foram coletadas em dois estádios: 1 a 2 dias antes da antese, e 3 a 5 dias após a polinização. Foram coletadas 10 flores/planta para cada isolado, totalizando 50 flores em cada estádio. Também foram coletadas flores de plantas sadias. Os óvulos foram cuidadosamente removidos usando-se agulha de 0,33 mm e armazenados em microtubos de 2 ml.

**Preparo das secções semi-finas.** Os óvulos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de potássio 0,05M pH 7,0 por 12 horas a 4°C. Em seguida foram lavados (3 x 10 min) em etanol 10%, desidratados em série alcoólica (10-100%), e infiltrados em resina Spurr por 24 horas, com polimerização a 70°C por 24 horas. Também foram emblocados, da mesma forma, tecidos foliares de plantas sadias e infectadas de *Chenopodium quinoa*. Os blocos foram cortados com lâminas de vidro em ultramicrotomo em secções de 0,3 µm.

**Imunolocalização.** Os cortes foram inicialmente incubados em solução de albumina sérica bovina (BSA) 0,5% em tampão Tris-salina pH 7,2 (TBSB) por 10 min. Em seguida foram pré-incubados com soro pré-imune de coelho por 20 min e pré-imune de cabra por 20 min, ambos na diluição 1:30. Os cortes foram então incubados por 12 horas a 4°C com anti-soro policlonal anti-LMV na diluição 1:100 e lavados com tampão TBSB (5 x 10 min). Em seguida foram incubados com anti-soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (diluição 1:50) por 1 hora a temperatura ambiente no escuro. Por fim, os cortes foram novamente lavados em TBSB (5 x 10 min). A fluorescência foi visualizada por microscopia confocal (LSM 510, Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Alemanha) com laser no comprimento de onda 488 nm. As imagens foram capturadas e armazenadas utilizando-se o programa LSM Image (Carl Zeiss).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A localização do vírus em óvulos de alface pré- e pós-fertilização foi analisada por imunofluorescência indireta. Em óvulos de plantas saudias, ou em óvulos de plantas infectadas porém incubados com soro pré-imune como anticorpo primário, foi observada fraca fluorescência de “background”. Portanto, qualquer fluorescência mais intensa que o “background” nos tecidos avaliados indica a presença do vírus.

Todas as plantas foram testadas por ELISA para confirmação da infecção viral. Folhas de plantas de *C. quinoa* saudias ou infectadas com o isolado AF199 foram usadas como controles da imunomarcção. A presença das partículas virais pode ser observada na forma de fluorescência intensa nas margens da célula, enquanto a presença de cloroplastos foi percebida como pontuações auto-fluorescentes nas células de tecidos saudias e infectados (Fig. 1, A e B).

Foram examinados 120 óvulos de 10 plantas infectadas com os isolados AF199 e E, e 20 óvulos de plantas saudias. Foram analisados 30 óvulos para cada isolado em cada estágio (pré- e pós-fertilização). Isso se fez necessário uma vez que não é sabido se a infecção do embrião em sementes de alface ocorre antes ou após a fertilização. A análise das secções revelou a presença do isolado AF199 em 20% dos óvulos coletados antes da fertilização (Tabela 1). Valor inferior (13%) foi obtido para os óvulos coletados após a fertilização. Esses valores refletem a fertilização indireta do embrião via óvulo, visto a baixa probabilidade de infecção via pólen, que é inferior a 0,5% (Ryder, 1964).

O isolado AF199 foi encontrado infectando todos os tecidos: parede do óvulo, tegumento, nucelo e saco embrionário (Fig. 1, E, I e K). Não se sabe se partículas virais presentes em tecidos não-embrionários necessariamente tornam a semente infectada. Entretanto, a presença de vírus no saco embrionário é uma indicação segura de que a transmissão pela semente ocorrerá. Resultado diferente foi obtido por Hunter e Bowyer

(1994). Estes autores estudaram a localização de um isolado de LMV transmitido pela semente em ovários maduros de alface, encontrando partículas virais em todos os tecidos do óvulo, exceto no saco embrionário. É possível que a combinação isolado/cultivar utilizada pode não ter sido adequada para a infecção do saco embrionário.

Nenhum dos óvulos de plantas infectadas com o isolado LMV-E apresentou marcação, embora todas as plantas estivessem infectadas. Da mesma forma, não foram detectadas partículas virais do isolado LMV-E em tecidos do óvulo após a fertilização. Portanto, a não-transmissão desse isolado pela semente aparentemente se deve ao fato das partículas virais não conseguirem atingir o embrião imaturo. No modelo PSbMV-ervilha, não se detectaram partículas virais nos óvulos de ervilha antes da fertilização, embora tenham sido encontradas em outros tecidos florais (sépalas, pétalas, anteras e carpelos) (Wang e Maule, 1992). Apenas nos primeiros estágios do desenvolvimento da semente, após a fertilização, foram encontradas partículas virais no embrião. No caso do LMV-E a não transmissão pela semente se deve provavelmente a fatores virais, enquanto no caso do PSbMV a ausência de transmissão está relacionada a fatores do hospedeiro, pois foram utilizadas duas cultivares, uma na qual a transmissão pela semente ocorre, e outra na qual não ocorre. Embora existam diferenças no mecanismo de resistência entre os patossistemas citados, ambos os resultados indicam um controle da transmissão pela semente em nível de óvulo.

Wang e Maule (1994) propuseram que um tecido conectivo transiente, denominado suspensor, possibilitaria o acesso do vírus ao embrião. O suspensor, que surge entre os tecidos da planta-mãe e do embrião após a fertilização, e que está relacionado com o desenvolvimento e nutrição do embrião, atuaria como uma ponte para que as partículas virais atingissem o embrião, e sua degeneração “fecharia a janela” para a transmissão do vírus. De acordo com esse modelo, não ocorre infecção viral dos tecidos que formarão o embrião antes da fertilização. Entretanto, outros autores, trabalhando com patossistemas distintos, encontraram resultados diferentes. Schippers (1963) detectou alta taxa de infecção (80%) de óvulos de

*Phaseolus vulgaris* L. cv. Beka, pelo *Bean common mosaic virus* (BCMV) antes da fertilização. Porém, a taxa de transmissão desse vírus pela semente foi de apenas 15%. O mecanismo de transmissão do nepovírus *Tobacco ringspot virus* (TRSV) pela semente de soja foi estudado em óvulos coletados um dia antes do florescimento. Foram encontradas partículas virais no embrião, demonstrando um processo indireto de transmissão via óvulo antes da polinização. Os autores realizaram experimentos de polinização cruzada, os quais sugeriram que a infecção dos megagametófitos é o principal fator de transmissão pela semente (Yang e Hamilton, 1974).

No patossistema LMV-alface, comparados os isolados AF199 e E, a capacidade de transmissão pela semente parece estar relacionada com a capacidade de o vírus infectar os tecidos do óvulo antes da fertilização. Essa capacidade pode estar relacionada a fatores virais envolvidos no movimento célula-a-célula ou sistêmico do vírus na planta. A comparação das sequências de aminoácidos das poliproteínas codificadas pelos dois isolados não é capaz de indicar diferenças a ponto de sugerir qual proteína viral pode ser a responsável. A análise da transmissão pela semente dos recombinantes produzidos por Krause-Sakate *et al.* (2005), bem como de recombinantes adicionais contendo sequências do isolado AF199 correspondentes à extremidade 3' do genoma, é o caminho lógico a ser seguido a fim de identificar os determinantes virais envolvidos na transmissão do LMV pela semente de alface.

## LITERATURA CITADA

- Dinant, S. e Lot, H. Lettuce mosaic virus: A review. *Plant Pathology*, v.41, p.528-542. 1992.
- Hull, R. *Matthew's Plant Virology*, 4<sup>a</sup> ed. Londres, Inglaterra: Academic Press. 1001 p. 2002.
- Hunter, D.G. e Bowyer, J.W. Cytopathology of mature ovaries from lettuce plants infected by lettuce mosaic potyvirus. *Phytopathologische Zeitschrift*, v.140, p.11-18. 1994.
- Jadão, A.S., Pavan, M.A., Silva, N. e Zerbini, F.M. Transmissão via semente do *Lettuce mosaic virus* (LMV) patótipos II e IV em diferentes genótipos de alface. *Summa Phytopathologica*, v.28, p.58-61. 2002.
- Johansen, I.E., Dougherty, W.G., Keller, K.E., Wang, D. e Hampton, R.O. Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in *Pisum sativum*. *Journal of General Virology*, v.77, p.3149-3154. 1996.
- Krause-Sakate, R., Le Gall, O., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrakchi, M., Varveri, C., Pavan, M.A., Souche, S., Lot, H., Zerbini, F.M. e Candresse, T. Molecular and biological characterization of *Lettuce mosaic virus* isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology*, v.92, p.563-572. 2002.
- Krause-Sakate, R., Mello, R.N., Zambolim, E.M., Pavan, M.A., Carvalho, M.G., Le Gall, O. e Zerbini, F.M. Molecular characterization of two Brazilian isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV) with distinct biological properties. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, p.153-157. 2001.
- Krause-Sakate, R., Redondo, E., Richard-Forget, F., Jadao, A.S., Houvenaghel, M.C., German-Retana, S., Pavan, M.A., Candresse, T., Zerbini, F.M. e Le Gall, O. Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a Lettuce mosaic virus (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Research*, v.109, p.175-180. 2005.
- Maule, A.J. e Wang, D. Seed transmission of plant viruses: A lesson in biological complexity. *Trends in Microbiology*, v.4, p.153-158. 1996.
- Revers, F., Yang, S.J., Walter, J., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T., Dunez, J. e Le Gall, O. Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. *Virus Research*, v.47, p.167-177. 1997.
- Ryder, E.I. Transmission of common lettuce mosaic virus through the gametes of the lettuce plant. *Plant Disease Reporter* v. 48, p. 531-540. 1964.
- Schippers, B. Transmission of bean common mosaic virus by seed of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Beka. *Acta botanica neerlandica*, v.12, p.433-497. 1963.
- Stangarlin, O.S., Pavan, M.A. e Silva, N. Occurrence of a new pathotype of *Lettuce mosaic virus* on lettuce in Brazil. *Plant Disease*, v.8, p.490. 2000.
- Wang, D. e Maule, A.J. Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of pea seedborne mosaic virus. *Journal of General Virology*, v.73, p.1615-1620. 1992.
- Wang, D. e Maule, A.J. A model for seed transmission of a plant virus: Genetic and structural analyses of pea embryo invasion by Pea seed-borne mosaic virus. *Plant Cell*, v.6, p.777-787. 1994.
- Yang, A.F. e Hamilton, R.I. The mechanism of seed transmission of tobacco ringspot virus in soybean. *Virology*, v.62, p.26-37. 1974.

**Tabela 1.** Número de óvulos infectados pelos isolados de LMV-[AF199] e -[E], com base na análise por imunolocalização de secções semi-finas obtidas de plantas de alface infectadas.

	Pré-fertilização	Pós- fertilização
LMV-[AF199]	6/30*	4/30
LMV-[E]	0/30	0/30
Sadia	0/10	0/10

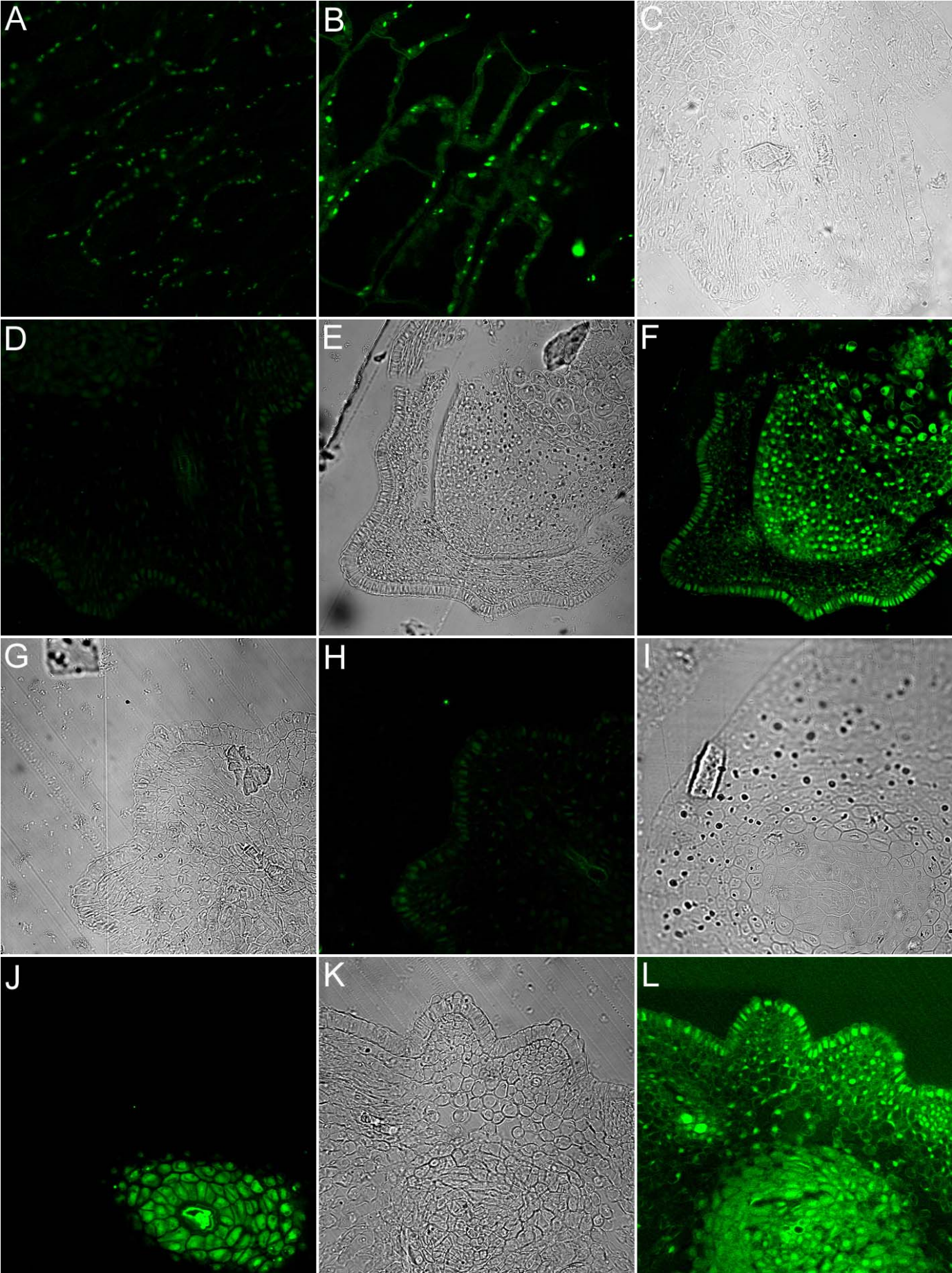
\*número de óvulos infectados/número de óvulos analisados.

## Legenda da figura

**Figura 1.** Imunomarcação de partículas de *Lettuce mosaic virus* (LMV) em secções semi-finas de óvulos de alface coletados de plantas infectadas antes e após a fertilização. **A e B.** Imagens de fluorescência de tecido foliar de *Chenopodium quinoa* sadia (**A**) ou infectada (**B**) com o isolado AF199. Pontos auto-fluorescentes nas células correspondem a cloroplastos. Barra = 100 µm. **C, D, E, F, G, H, I e J.** Microscopia confocal com luz ultra-violeta e em luz visível de óvulos de alface pré-fertilização em secções transversais. Óvulo de planta sadia (**C** e **D**), óvulo infectado com o isolado AF199 (**E** e **F**), óvulo de planta infectada com o isolado E (**G** e **H**), saco embrionário de óvulo infectado com o isolado AF199 (**I** e **J**). Barra = 50 µm. **K e L,** óvulo pós-fertilização infectado com o isolado AF199 em secção transversal. Xy = xilema; OW = parede do óvulo; IN = integumento; NU = nucelo, ES = saco embrionário. Barra = 100 µm.



Figura 1



## CAPÍTULO 2

### **ADAPTABILIDADE DE DOIS ISOLADOS DE *Lettuce mosaic virus* (LMV) E SEUS RECOMBINANTES EM ALFACE E *Nicotiana benthamiana***

Beserra Jr, J.E.A., Zerbini, P.A., Krause-Sakate, R., Le Gall, O. & Zerbini, F.M.  
Adaptabilidade de dois isolados de *Lettuce mosaic virus* (LMV) e seus recombinantes em alface e *Nicotiana benthamiana*.

## RESUMO

O *Lettuce mosaic virus* (LMV) é o principal vírus da cultura da alface (*Lactuca sativa*). É um vírus transmitido pela semente e por afídeos, distribuído ao redor do mundo provavelmente devido ao comércio de sementes infectadas. Dois isolados de LMV capazes de suplantar a resistência conferida pelo alelo *moI*<sup>2</sup> em alface, AF199 e E, diferem quanto à indução de sintomas e período latente. O isolado AF199 induz sintomas mais severos em *N. benthamiana* e possui período latente mais curto em *N. benthamiana* e alface cv. Salinas 88 (*moI*<sup>2</sup>). Foram realizados experimentos para analisar a adaptabilidade diferencial desses isolados e de três recombinantes obtidos entre eles. A cinética de estabelecimento da infecção sistêmica foi analisada em plantas das quais a folha inoculada foi destacada a diferentes períodos de tempo após a inoculação. O acúmulo de RNA viral dos isolados/recombinantes foi analisado por PCR em tempo real em folhas inoculadas a 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hpi), e em folhas sistêmicas a 0, 5, 10, 15 e 20 dias após a inoculação (dpi). Os resultados indicam que o isolado AF199, tanto em *N. benthamiana* como em alface, é mais rápido em estabelecer uma infecção sistêmica, alcançando maior concentração na folha inoculada e na folha sistêmica mais cedo em comparação ao isolado E. O recombinante Rec1 induziu sintomas distintos dos parentais e acumulou mais em *N. benthamiana*. O recombinante Rec4 apresentou menor acúmulo dentre todos os isolados/recombinantes testados em *N. benthamiana*. Em alface, os recombinantes Rec3 e Rec4 apresentaram acúmulo cerca de 10 vezes superior ao isolado AF199. Os resultados indicam que o isolado AF199 e os recombinantes que possuem a região P1/HC-Pro desse isolado são melhor adaptados em relação ao isolado E e àqueles recombinantes com a P1/HC-Pro derivada do isolado E.

## INTRODUÇÃO

O mosaico da alface, causado pelo *Lettuce mosaic virus* (LMV, família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*), é a principal doença viral da cultura. O LMV é transmitido por afídeos de maneira não-circulativa e também pela semente (Dinant e Lot, 1992). A doença é de distribuição cosmopolita, provavelmente devido ao intercâmbio de lotes de sementes contaminadas.

O LMV é um vírus de partícula alongada e flexuosa, com genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com 10.080 nucleotídeos. Seu RNA possui uma proteína de origem viral (VPg) ligada covalentemente à extremidade 5' e é poliadenilado na extremidade 3'. O RNA viral possui uma única fase aberta de leitura (“open reading frame”, ORF) capaz de codificar uma poliproteína com massa molecular de aproximadamente 350 kDa. Essa poliproteína sofre auto-clivagem, gerando de 8-10 proteínas virais (Revers *et al.*, 1997).

Dois genes de resistência ao LMV foram identificados em germoplasma de *Lactuca*: dois alelos ( $moI^1$  e  $moI^2$ ) do gene recessivo *moI*, que codifica o fator de tradução eucariótico eIF4E (Nicaise *et al.*, 2003), e o gene dominante *Mo2*. Os alelos  $moI^1$  e  $moI^2$  foram incorporados a diversas cultivares de alface em todos os principais países produtores (incluindo o Brasil), e o plantio dessas cultivares representa a principal estratégia de controle do mosaico da alface na maioria dos países (com exceção dos EUA, onde a doença é controlada com o uso de sementes livres de vírus) (Dinant e Lot, 1992; Pink *et al.*, 1992b; Zerbini *et al.*, 1995). Estirpes do LMV capazes de infectar cultivares contendo os alelos  $moI^1$  ou  $moI^2$  já foram detectadas na Europa, Oriente Médio e Brasil (Dinant e Lot, 1992; Pink *et al.*, 1992a; Pink *et al.*, 1992b; Stangarlin *et al.*, 2000).

A análise filogenética de 73 isolados de LMV com diferentes propriedades biológicas indicou que o relacionamento entre isolados ocorre inicialmente em termos da capacidade de transmissão pela semente, independente da capacidade de infectar plantas

contendo os alelos de resistência recessivos (Krause-Sakate *et al.*, 2002). O grupo de isolados transmitidos pela semente é dividido em dois subgrupos, constituindo duas estirpes denominadas “Common” e “Most”. Isolados pertencentes a estirpe Common não são capazes de infectar cultivares contendo os alelos de resistência recessivos. Já os isolados pertencentes à estirpe Most infectam essas cultivares, o que, aliado à transmissão pela semente, torna-os uma séria ameaça à cultura.

O isolado brasileiro LMV-AF199, obtido de plantas de alface no estado de São Paulo (Stangarlin *et al.*, 2000), pertence à estirpe Most (Krause-Sakate *et al.*, 2002). Esse isolado induz mosaico severo na cultivar de alface Salinas 88 ( $mo1^2$ ). Além disso, esse isolado também é capaz de induzir murcha seguida de necrose sistêmica, levando à morte da planta, nas cultivares de alface Ithaca ( $Mo2$ ) e Vanguard 75 ( $Mo2$  e  $mo1^2$ ) (Krause-Sakate *et al.*, 2005). O isolado LMV-E, obtido de plantas de alface na Espanha (Dinant e Lot, 1992), tem a capacidade de infectar Salinas 88 e Vanguard 75, causando sintomas mais suaves e sem a indução de necrose sistêmica. Esse isolado não é transmitido pela semente em cultivares contendo alelos de resistência recessivos, e, portanto não pertence à estirpe Most (o que é confirmado pela análise filogenética) (Krause-Sakate *et al.*, 2002).

O período latente e a severidade dos sintomas induzidos pelos isolados AF199 e E são distintos. A análise de vírus recombinantes entre esses isolados indicou que a presença de um fragmento de 1989 nucleotídeos correspondente à parte das regiões codificadoras das proteínas P1/HC-Pro do isolado E no “background” do isolado AF199 é suficiente para causar um atraso de uma semana no desenvolvimento dos sintomas após inoculação da cultivar Salinas 88, quando comparado ao isolado AF199 selvagem (Krause-Sakate *et al.*, 2007). É possível que as diferenças na cinética de indução de sintomas entre os isolados AF199 e E estejam relacionadas a diferenças na capacidade das proteínas P1 e, ou HC-Pro desses isolados de suprimir o silenciamento de RNA (Anandalakshmi *et al.*, 1998), uma vez que os recombinantes que possuíam as sequências P1/HC-Pro do isolado AF199 apresentaram

cinética de desenvolvimento de sintomas intermediária em relação aos isolados parentais (Krause-Sakate *et al.*, 2007).

Visando investigar os mecanismos de adaptabilidade de isolados de LMV, o presente trabalho comparou a severidade dos sintomas, o período latente e a cinética de estabelecimento de infecção sistêmica e de acúmulo do RNA dos isolados AF199 e E e de três recombinantes entre esses dois isolados obtidos *in vitro*, em dois hospedeiros, alface e *Nicotiana benthamiana*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Isolados virais e clones recombinantes.** Os isolados virais utilizados foram obtidos a partir de plantas de alface infectadas em São Paulo, Brasil (isolado AF199) e Espanha (isolado E), ambos já caracterizados (Dinant e Lot, 1992; Stangarlin *et al.*, 2000; Krause-Sakate *et al.*, 2002). Um clone infeccioso correspondente ao isolado E está disponível (Yang *et al.*, 1998). Embora um clone infeccioso para o isolado AF199 não esteja disponível, o genoma completo desse isolado foi clonado como cDNA na forma de três fragmentos separados (Krause-Sakate *et al.*, 2002). Os recombinantes Rec1, Rec3 e Rec4 foram construídos a partir das sequências dos isolados AF199 e E (Krause-Sakate *et al.*, 2005) (Figura 1). O isolado AF199 foi mantido em plantas de *Nicotiana benthamiana* por meio de inoculações sucessivas via extrato vegetal tamponado em fosfato de potássio 0,01M pH 7,2 contendo sulfito de sódio a 0,01%. Os clones infecciosos (LMV-E e recombinantes) foram inicialmente inoculados em plantas de *N. benthamiana* via biobalística (Aragão *et al.*, 1996) utilizando-se 2 µg de DNA. A partir dessas plantas, foram mantidas por meio de inoculações sucessivas via extrato vegetal tamponado conforme descrito para o isolado AF199.

**Severidade de sintomas e período latente.** Plantas de *N. benthamiana* e alface cv. Salinas 88 foram avaliadas visualmente quanto a severidade dos sintomas e período latente. Foram inoculadas 12 plantas de cada hospedeira para cada um dos isolados (AF199 e E) e recombinantes (Rec1, Rec3 e Re4), a partir das quais foram obtidas médias aritméticas do número de dias entre a inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas macroscópicos.

**Cinética de estabelecimento da infecção sistêmica e de acúmulo de RNA viral.** Para inocular quantidades aproximadamente iguais dos isolados virais e dos três recombinantes, folhas de *N. benthamiana* infectadas foram avaliadas por ELISA utilizando-se anti-soro

policlonal para o isolado AF199 (Krause-Sakate *et al.*, 2001). A partir dos valores de absorvância obtidos foram pesadas quantidades proporcionais de tecido vegetal infectados para inoculação. Foram realizados três experimentos independentes. No primeiro e segundo experimentos foram inoculadas apenas uma folha por planta, e as folhas inoculadas foram coletadas a 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação. No terceiro experimento foi coletada a folha mais nova completamente expandida de cada planta inoculada com 0, 5, 10, 15 e 20 dias após a inoculação (ou seja, foram coletadas folhas não-inoculadas). No primeiro e terceiro experimentos foram inoculadas três plantas para cada tratamento (vírus x tempo); no segundo experimento foram inoculadas seis plantas por tratamento. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperaturas diárias médias de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , observadas para o surgimento de sintomas até os 15 dias após a inoculação e avaliadas por ELISA. As folhas coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA e quantificação da concentração viral via PCR em tempo real.

**Extração de RNA.** O RNA total do material foliar de cada tratamento foi extraído utilizando-se o reagente Brazol (LCC Biotecnologia), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria, e a integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%). Os RNAs extraídos foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).** Dois microgramas de RNA total de cada tratamento foram tratados com DNase (Promega) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min, para garantir que os produtos de qRT-PCR fossem amplificados somente a partir de RNA. A enzima foi inativada com a adição de EDTA 25 mM e aquecimento a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 min. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com a enzima SuperScript III (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante, utilizando oligo-dT a  $50\ \mu\text{M}$ . As análises quantitativas foram realizadas em um



termociclador ABI 7000 (Applied Biosystems), utilizando-se SYBR Green para monitorar a síntese de DNA fita dupla. As reações foram preparadas em um volume final de 12,5 µl utilizando-se “SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências dos oligonucleotídeos específicos para análise dos genomas virais foram determinadas a partir das sequências dos isolados LMV-[AF199] (AJ278854) e LMV-[E] (X97705), utilizando-se o software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) (Tabela 1).

**Quantificação relativa.** Para determinar o melhor normalizador para os tratamentos foram testados cinco genes com expressão constitutiva que, teoricamente, não devem ser afetados pela infecção viral: actina 2 (ACT), adenosil-fosforibosil transferase 1 (APT1), fator de alongação 1 $\alpha$  (EF1), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) e  $\beta$ -6-tubulina (TUB6). Os oligonucleotídeos testados foram os mesmos utilizados na análise de tomateiros infectados pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Alfenas, 2006). O normalizador foi utilizado como controle interno para ajustar o acúmulo de RNA dos isolados virais e recombinantes entre os tratamentos. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas. A especificidade da amplificação foi determinada por meio da análise das curvas de dissociação. Os valores de Ct dos tratamentos (vírus x tempo) foram comparados diretamente com o Ct do normalizador e os resultados foram expressos como incremento da amplificação específica do gene alvo em relação ao normalizador. O incremento no nível de expressão foi calculado baseado no método ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Livak *et al.*, 2001).

## RESULTADOS

### **Severidade de sintomas e período latente dos isolados AF199 e E e seus recombinantes em *N. benthamiana* e alface ‘Salinas 88’**

O período latente (medido em dias) do surgimento dos sintomas foi avaliado para os isolados AF199, E e os recombinantes após a inoculação em *N. benthamiana* e alface ‘Salinas 88’. Em *N. benthamiana* os sintomas surgiram em média aos 4 dias após a inoculação (dpi) com o isolado AF199. Foram observados sintomas de mosaico severo, deformação foliar e redução do crescimento da planta (Figura 2A). Sintomas mais suaves foram observados após inoculação com o isolado E, e apenas aos 7 dpi (Figura 2B). Os vírus recombinantes apresentaram períodos latentes intermediários entre os dois isolados parentais, com os sintomas surgindo em média aos 5, 6 e 7 dpi para Rec1, Rec4 e Rec3, respectivamente. Os sintomas observados para Rec1 foram tão severos quanto os observados para o isolado AF199, com os acréscimos de clareamento das nervuras e epinastia foliar (sintomas observados apenas para esse recombinante) (Figura 2C). Para os demais recombinantes os sintomas se caracterizavam por mosaico, deformação foliar e redução do crescimento da planta (Figura 2D, E).

Em alface cv. Salinas 88 os sintomas de mosaico, clorose das nervuras, deformação foliar e redução do crescimento da planta foram observados para todos os isolados/recombinantes, porém foram mais atenuados para o isolado E e o recombinante Rec3 (Figura 2G, I). Os períodos latentes em Salinas 88 foram mais longos em relação àqueles observados em *N. benthamiana*: 7, 8, 9, 12 e 14 dpi para AF199, Rec1, Rec4, Rec3 e E, respectivamente. Os recombinantes Rec1 e Rec4 apresentaram períodos latentes mais próximos do isolado AF199. Ambos contêm a região do genoma que codifica as proteínas P1 e HC-Pro derivada do isolado AF199.

## **Cinética de estabelecimento da infecção sistêmica pelos isolados AF199 e E e seus recombinantes em *N. benthamiana* e alface ‘Salinas 88’**

As diferenças observadas entre AF199 e E e entre os recombinantes em relação ao período latente, tanto em *N. benthamiana* e alface, sugerem que o isolado AF199 pode atingir o sistema vascular mais rapidamente em relação ao isolado E, iniciando uma infecção sistêmica mais precocemente. Essa hipótese foi confirmada nos experimentos em que cada isolado/recombinante foi inoculado em uma única folha, e esta foi destacada da planta após diferentes períodos de tempo (6, 12, 24 e 48 hpi) (Tabela 2). Em *N. benthamiana*, apenas duas plantas inoculadas com o isolado AF199 e com o recombinante Rec1 foram infectadas sistemicamente quando a folha inoculada foi destacada a 24 hpi. Após 48 hpi, todos os isolados e recombinantes alcançaram o sistema vascular. Porém, AF199, Rec1 e Rec4 foram os mais eficientes, infectando 5, 6 e 4 plantas, respectivamente. Em alface, todos os isolados/recombinantes foram menos eficientes no estabelecimento da infecção sistêmica, embora a maioria das plantas tenha sido infectada no tratamento em que a folha inoculada foi destacada a 48 hpi (Tabela 2). Os resultados sugerem que as proteínas P1/HC-Pro do isolado AF199 (cuja região codificadora, ou parte dela, está presente nos recombinantes Rec1 e Rec4) conferem ao vírus maior eficiência no estabelecimento da infecção sistêmica, em comparação à P1/HC-Pro do isolado E (cuja região codificadora está presente no recombinante Rec3).

### **Especificidade da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)**

Dentre os genes candidatos a normalizadores, o gene EF1 foi o que apresentou a menor variação de expressão entre os tratamentos (dados não mostrados) e, portanto, foi utilizado como normalizador em todos os experimentos subsequentes. Os oligonucleotídeos selecionados foram avaliados preliminarmente por RT-PCR, observando-se a presença de amplicons do tamanho esperado em todos os casos (dados não mostrados). Nos ensaios de qRT-PCR, as curvas de amplificação apresentaram boa reprodutibilidade e cada

oligonucleotídeo conduziu a um único pico de amplificação nos ensaios de dissociação (dados não mostrados).

### **Cinética de acúmulo de RNA dos isolados AF199 e E e seus recombinantes em *N. benthamiana* e alface ‘Salinas 88’**

Por meio da PCR em tempo real pôde-se estabelecer uma comparação de acúmulo entre os isolados virais e seus recombinantes. Plantas de *N. benthamiana* e alface ‘Salinas 88’ inoculadas com o isolado AF199 exibiram sintomas aproximadamente aos 4 e 7 dpi respectivamente, mais precocemente em relação às plantas inoculadas com o isolado E. Entretanto, essa observação, isoladamente, não permite concluir a respeito da cinética do acúmulo de RNA viral. Dessa forma, plantas inoculadas com AF199 ou E foram analisadas em diferentes períodos de tempo para o acúmulo de RNA viral em folhas inoculadas e não-inoculadas.

O isolado AF199 apresentou maior acúmulo em relação ao isolado E em folhas inoculadas coletadas a 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hpi) (Figura 3), confirmando os resultados de severidade de sintomas e período latente. Curiosamente, o recombinante Rec1 apresentou acúmulo superior ao dos dois isolados parentais e demais recombinantes em *N. benthamiana*. O recombinante Rec4, apesar de ter apresentado um período latente mais curto em relação ao Rec3, apresentou menor acúmulo dentre todos os isolados/recombinantes testados em *N. benthamiana* (Figura 3).

Quando o acúmulo de RNA viral foi avaliado em folhas não-inoculadas aos 5, 10, 15 e 20 dpi houve um tendência semelhante de acúmulo de RNA viral ao longos dos dias para AF199, E, Rec1 e Rec3 em *N. benthamiana*. Em todos esses tratamentos observou-se uma redução no acúmulo aos 10 dpi, posterior elevação aos 15 dpi e nova queda aos 20 dpi (Figura 4), possivelmente refletindo uma resposta de defesa da planta e a subsequente resposta do patógeno. Houve maior acúmulo do isolado AF199 em comparação ao isolado E aos 5 dpi,

porém o isolado E apresentou acúmulo semelhante a AF199 aos 15 dpi. Os recombinantes Rec1 e Rec3 apresentaram um comportamento similar (Figura 4). O Rec1 manteve a tendência de acúmulo superior aos demais, reforçando sua maior adaptabilidade em *N. benthamiana*. Esse maior acúmulo coincide com a indução de sintomas de clareamento das nervuras e epinastia, induzidos exclusivamente por esse recombinante. O Rec4 novamente acumulou menos que os demais em *N. benthamiana*, e ao contrário dos outros, a concentração de RNA viral aumentou gradativamente até os 15 dpi, reduzindo-se logo em seguida (Figura 4).

Em alface ‘Salinas 88’ houve maior acúmulo dos isolados virais e recombinantes do que em *N. benthamiana*. O isolado AF199 apresentou maior acúmulo em relação ao isolado E em folhas inoculadas coletadas a 6, 12, 24 e 48 hpi (Figura 5), confirmando os resultados de severidade de sintomas e período latente. Ao contrário do que foi observado em *N. benthamiana*, o Rec4 apresentou maior acúmulo que os demais recombinantes (Figura 5).

O padrão de acúmulo de RNA viral em alface ‘Salinas 88’ foi distinto daquele observado em *N. benthamiana* (Figura 6). Para os isolados AF199 e E observou-se maior acúmulo aos 10 dpi, enquanto para os recombinantes o maior acúmulo ocorreu aos 5 dpi. Em todos os casos houve forte redução do acúmulo de RNA viral logo em seguida ao pico de acúmulo (Figura 6). Mais uma vez o isolado AF199 apresentou acúmulo superior em relação ao isolado E. Entretanto, em Salinas 88 houve maior acúmulo dos recombinantes quando comparados aos isolados parentais. Os recombinantes Rec3 e Rec4 apresentaram acúmulo cerca de 10 vezes superior ao isolado AF199.

## DISCUSSÃO

A adaptabilidade de populações virais é frequentemente definida em termos de habilidade replicativa, ou seja, maior acúmulo de partículas virais em uma célula, um determinado tipo de tecido ou em um órgão específico do hospedeiro (planta ou animal). Porém, em um sentido mais amplo, adaptabilidade pode ser definida como a capacidade de estabelecer uma infecção sistêmica mais rapidamente, e ao mesmo tempo prolongar a vida do hospedeiro de forma a maximizar as chances de transmissão do vírus para novos indivíduos (Roossinck, 2005).

Os sintomas do isolado AF199 surgiram a 3 e 7 dpi em *N. benthamiana* e alface, respectivamente, e são mais severos do que aqueles induzidos pelo isolado E, que surgiram aos 7 e 14 dpi, respectivamente. Portanto, o isolado AF199 pode ser considerado como melhor adaptado a ambos os hospedeiros em comparação ao isolado E. Aparentemente, a região do genoma compreendendo as regiões codificadoras das proteínas P1 e HC-Pro está envolvida nas diferenças de cinética de desenvolvimento de sintomas observadas entre os dois isolados, uma vez que aqueles recombinantes portadores da P1/HCPro do isolado AF199 (Rec1 e Rec4) apresentam menor período latente e maior severidade dos sintomas em comparação ao Rec3, portador da P1/HC-Pro do isolado E. Essa região deve ser importante para a adaptabilidade do isolado AF199, podendo torná-lo mais apto a replicar e/ou mover sistemicamente do que o isolado E. Além disso, há resultados indicando que AF199 é mais eficiente do que o E em suprimir o silenciamento de GFP na linhagem 16c de *N. benthamiana*, homozigota para GFP (Krause-Sakate *et al.*, 2007). A supressão do silenciamento do Rec4 foi intermediária em relação aos parentais. Esses dados sugerem que a proteína HC-Pro do isolado AF199 é mais eficiente em suprimir o silenciamento gênico do que a HC-Pro do isolado E. Ensaios de supressão de silenciamento por meio de agroinfiltração com clones das HC-Pros dos isolados AF199 e E demonstrariam de forma

inequívoca que a maior adaptabilidade do isolado AF199 se deve, pelo menos em parte, à atividade supressora da proteína HC-Pro.

A importância da HC-Pro na indução de sintomas por *Potyviridae* já foi demonstrada para diversas espécies dessa família. Pequenas substituições de nucleotídeos na região central da HC-Pro do *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) podem levar à atenuação dos sintomas ou até mesmo à incapacidade de infecção sistêmica (Stenger *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos para o *Plum pox virus* (PPV) (Sáenz *et al.*, 2001), embora nesse caso a taxa de replicação do vírus não tenha sido afetada. Demonstrou-se também que pequenas mutações no motivo conservado FRNK da HC-Pro do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) levam à atenuação dos sintomas, porém sem reduzir o acúmulo do vírus ou os níveis de siRNAs (Shiboleth *et al.*, 2007). Estes autores demonstraram que as mutações reduziram a capacidade da HC-Pro de sequestrar miRNAs, levando à uma redução indireta dos sintomas.

De acordo com Krause-Sakate *et al.* (2007), o alelo *moI*<sup>2</sup>, apesar de não impedir a replicação do isolado E, causa um atraso no surgimento de sintomas, que são menos severos em relação aos induzidos pelo isolado AF199. Isso não ocorre na cultivar Floribibb, que possui o alelo *moI*<sup>1</sup>. Entretanto, no presente trabalho, apesar de *N. benthamiana* não possuir o alelo *moI*<sup>2</sup>, o isolado E se comportou de forma semelhante, sugerindo que as diferenças de período latente e severidade de sintomas dependem também de fatores virais.

O acúmulo de RNA do isolado AF199 ocorreu mais rapidamente do que o verificado com o isolado E, tanto na folha inoculada (infecção local) quanto na folha não-inoculada (infecção sistêmica), em *N. benthamiana* e em alface, o que está de acordo com as observações de período latente e severidade de sintomas. O isolado AF199 pode replicar, mover célula-à-célula/sistemicamente, e, ou suprimir as respostas de defesa da planta mais eficientemente do que o isolado E.

A eficiência de um isolado viral em estabelecer infecção sistêmica, determinada com base em um menor período latente, sintomas mais severos, e capacidade de se mover mais

rapidamente a partir da folha inoculada, pode refletir melhor interação entre as proteínas virais e os fatores do hospedeiro, aumentando a adaptabilidade do isolado viral. Entretanto, um determinado isolado viral pode ser mais eficiente em termos de replicação, e menos eficiente em termos de movimento. Por exemplo, apesar do isolado Sny do cucumovírus *Cucumber mosaic virus* (CMV) possuir maior taxa de replicação em protoplastos, o isolado Fny move-se mais rapidamente, tanto célula-à-célula quanto sistemicamente, induzindo sintomas 3 dias mais cedo do que o isolado Sny (Gal-On *et al.*, 1994). Por meio de experimentos com folhas destacadas, os autores demonstraram que Fny infecta sistemicamente plantas de abobrinha a partir de 24 hpi, enquanto que Sny precisa de 48 horas para estabelecer a infecção sistêmica.

Fato interessante foi observado no presente trabalho em *N. benthamiana* com o recombinante Rec1. Constatou-se maior acúmulo de seu RNA em comparação aos demais. Coincidentemente, nessa hospedeira Rec1 induz clareamento de nervuras e epinastia foliar, sintomas não observados para nenhum dos isolados parentais ou recombinantes. É possível que o maior acúmulo desse recombinante seja responsável pelos sintomas adicionais induzidos nessa hospedeira.

Não é a primeira vez que um recombinante obtido *in vitro* entre parentais semelhantes (199 e E possuem 94% de identidade de nucleotídeos) induz um fenótipo distinto dos parentais. A partir dos isolados B11 e U do *Potato virus A* (PVA), que apresentam 97,5% de identidade para a 5'-NTR e ORF, e 3'-NTR idêntica, e que induzem os mesmos sintomas (mosaico severo e distorção foliar) em *N. benthamiana*, foram obtidos seis recombinantes que variam quanto aos sintomas induzidos (Paalme *et al.*, 2004). Quatro dos recombinantes induziram sintomas distintos daqueles induzidos pelos parentais. Dentre todos, o recombinante pBUI+II induziu os sintomas mais distintos (clareamento de nervuras e nenhuma distorção foliar). A estrutura do genoma desses três recombinantes é bastante distinta. O recombinante pBUI+II apresenta dois terços do genoma do parental U, a partir da



extremidade 5'. Os recombinantes pBUII e pBUIII possuem a região central e extremidade 3' do parental U, respectivamente. Ambos induziram distorção foliar e mosaico severos. Já o recombinante pBUI possui a extremidade 5' do parental U, e induziu mosaico suave e nenhuma distorção foliar. Esses resultados indicam que diferentes partes do genoma dos potyvírus podem contribuir para a infectividade e indução de sintomas, de forma a tornar um isolado viral melhor adaptado ao hospedeiro.

Apesar de Rec3 e Rec4 induzirem maiores períodos latentes e sintomas mais fracos, ambos apresentaram os maiores valores de acúmulo de RNA em alface, indicando que nem sempre há correlação positiva entre concentração viral e severidade de sintomas. Os recombinantes de PVA mencionados anteriormente (Paalme *et al.*, 2004), apesar de induzirem sintomas mais severos em *N. benthamiana* quando comparados aos parentais, apresentavam menor acúmulo. Resultados semelhantes foram obtidos com o PPV (Sáenz *et al.*, 2001). Os autores obtiveram “sub-isolados” de PPV a partir de um isolado original propagado por passagens sucessivas em um hospedeiro de lesões locais. Foram obtidos vários sub-isolados que, apesar de causarem sintomas severos, atingiam baixa concentração na planta, e vice-versa, demonstrando mais uma vez que nem sempre existe correlação entre severidade de sintomas e acúmulo viral.

A hipótese de que a região codificadora das proteínas P1 e HC-Pro do isolado AF199 seria a responsável pela maior adaptabilidade desse isolado não é apoiada pelos resultados de acúmulo dos recombinantes Rec3 e Rec4 em *N. benthamiana*. Apesar de possuir a P1/HC-Pro do AF199, o Rec4 acumulou menos nas folhas inoculadas e não-inoculadas do que o Rec3, que possui a P1/HC-Pro do isolado E. Entretanto, em alface, acumulou mais do que o Rec3, indicando que interações diferentes podem ocorrer em hospedeiro diferentes. Não deve ser descartada a possibilidade de a região codificadora de P1/HC-Pro do isolado AF199 ser mais eficiente na indução de movimento sistêmico. Isso explicaria porque Rec4 está associado a menor período latente e ser mais eficiente no estabelecimento da infecção sistêmica do que o

Rec3, como foi evidenciado no ensaio de folha destacada, apesar de acumular menos em *N. benthamiana*.

A comparação da sequência de nucleotídeos da HC-Pro dos isolados E e AF199 indica que existem 64 diferenças de nucleotídeos (Figura 7A). Entretanto, apenas 8 correspondem a substituições não-sinônimas (Figura 7B), indicando uma elevada conservação da sequência de aminoácidos da HC-Pro desses isolados. A maioria das modificações (5/8) está localizada na região central da proteína, região esta que está envolvida com diversas funções, incluindo ligação a RNA, amplificação do genoma, supressão de silenciamento de RNA e movimento sistêmico. Essas alterações poderiam explicar as diferenças de cinética da infecção sistêmica observadas entre recombinantes que possuem a HC-Pro do isolado AF199 (Rec1 e Rec4), e o que possui a HC-Pro do isolado E (Rec3). A análise de mutagênese sítio-dirigida das HC-Pros de clones infecciosos dos isolados revelaria o envolvimento dessa região na capacidade de movimento sistêmico.

Outra possível causa de variação entre o acúmulo de Rec3 e Rec4 pode estar relacionada com a presença de ORFs adicionais no genoma viral. Recentemente foi demonstrada a existência de uma segunda ORF no genoma do potyvírus *Turnip mosaic virus* (TuMV), denominada PIPO (“pretty interesting *Potyviridae* ORF”) (Chung *et al.*, 2008). Essa ORF está sobreposta à região codificadora da proteína P3, e codifica uma proteína de 66 aminoácidos. Os autores encontraram a ORF em 48 espécies de potyvírus, incluindo o isolado LMV-[0], e no caso do TuMV comprovaram que a ORF é essencial para a infectividade do vírus, pois mutações em sua sequência interferiram com a replicação e/ou movimento célula-à-célula. A análise do genoma dos isolados AF199 e E confirma a presença dessa ORF, e indica a existência de 9 diferenças de nucleotídeos (num total de 200) entre as sequências dos dois isolados. Três dessas diferenças levam a substituições não-sinônimas. Portanto, é possível que a ORF PIPO do isolado AF199 confira uma vantagem no processo infeccioso maior do que a do isolado E. Isso explicaria o maior acúmulo do recombinante Rec3 em *N.*

*benthamiana*, pois esse recombinante possui a região codificadora da proteína P3 (e consequentemente da ORF PIPO) do isolado AF199.

Em resumo, os resultados dos experimentos de acúmulo de RNA viral em folha inoculada e não-inoculada, da cinética de estabelecimento da infecção sistêmica e de período latente indicam que o isolado AF199 é melhor adaptado em relação ao isolado E, tanto em *N. benthamiana* quanto em alface 'Salinas 88'. Sugere-se que a região codificadora das proteínas P1/HC-Pro do isolado AF199 está envolvida nas diferenças de cinética de desenvolvimento de sintomas. Ensaios de supressão do silenciamento gênico utilizando as HC-Pros dos isolados AF199 e E poderiam relacionar a maior adaptabilidade do isolado AF199 com a capacidade de supressão de silenciamento de RNA de sua HC-Pro, em relação à HC-Pro do isolado E.

## LITERATURA CITADA

- Alfenas, P.F. Identificação de genes potencialmente envolvidos na interação tomateiro - Potyvirus. (Tese D.S.). Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006. 86 p.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. e Vance, V.B. A viral supressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.95, p.13079-13084. 1998.
- Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C. e Rech, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, v.93, p.142-150. 1996.
- Chung, B.Y., Miller, W.A., Atkins, J.F. e Firth, A.E. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.105, p.5897-5902. 2008.
- Dinant, S. e Lot, H. Lettuce mosaic virus: A review. *Plant Pathology*, v.41, p.528-542. 1992.
- Gal-on, A., Kaplan, I., Roosinck, M.J. e Palukaitis, P. The kinetics of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicate a function for RNA 1 in virus movement. *Virology*, v.205, p.280-289. 1994.
- Krause-Sakate, R., Le Gall, O., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrakchi, M., Varveri, C., Pavan, M.A., Souche, S., Lot, H., Zerbini, F.M. e Candresse, T. Molecular and biological characterization of *Lettuce mosaic virus* isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology*, v.92, p.563-572. 2002.
- Krause-Sakate, R., Mello, R.N., Zambolim, E.M., Pavan, M.A., Carvalho, M.G., Le Gall, O. e Zerbini, F.M. Molecular characterization of two Brazilian isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV) with distinct biological properties. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, p.153-157. 2001.
- Krause-Sakate, R., Redondo, E., Richard-Forget, F., Jadao, A.S., Houvenaghel, M.C., German-Retana, S., Pavan, M.A., Candresse, T., Zerbini, F.M. e Le Gall, O. Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a Lettuce mosaic virus (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Research*, v.109, p.175-180. 2005.
- Krause-Sakate, R., Richard-Forget, F., Redondo, E., Pavan, M.A., Zerbini, F.M., Candresse, T. e Le Gall, O. Quantitative control of *Lettuce mosaic virus* fitness and host defence inhibition by P1-HCPro. *Summa Phytopathologica*, v.33, p.119-123. 2007.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$  method. *Methods*, v. 25, p. 402-408. 2001.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M.P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. e Legall, O. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiology*, v.132, p.1272-1282. 2003.
- Paalme, V., Gammelgard, E., Jarvekulg, L. e Valkonen, J.P.T. *In vitro* recombinants of two nearly identical potyviral isolates express novel virulence and symptom phenotypes in plants. *Journal of General Virology*, v.85, p.739-747. 2004.
- Pink, D.A.C., Kostova, D. e Walkey, D.G.A. Differentiation of pathotypes of lettuce mosaic virus. *Plant Pathology*, v.41, p.5-12. 1992a.

- Pink, D.A.C., Lot, H. e Johnson, R. Novel pathotypes of lettuce mosaic virus - breakdown of a durable resistance ? *Euphytica*, v.63, p.169-174. 1992b.
- Revers, F., Yang, S.J., Walter, J., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T., Dunez, J. e Le Gall, O. Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. *Virus Research*, v.47, p.167-177. 1997.
- Roossinck, M.J. Symbiosis versus competition in plant virus evolution. *Nature Reviews Microbiology*, v.3, p.917-924. 2005.
- Sáenz, P., Quiot, L., Quiot, J.-B., Candresse, T. e García, J.A. Pathogenicity determinants in the complex virus population of a *Plum pox virus* isolate. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.14, p.278-287. 2001.
- Shiboleth, Y.M., Haronsky, E., Leibman, D., Arazi, T., Wassenegger, M., Whitham, S.A., Gaba, V. e Gal-on, A. The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *Journal of Virology*, v.81, p.13135-13148. 2007.
- Stangarlin, O.S., Pavan, M.A. e Silva, N. Occurrence of a new pathotype of *Lettuce mosaic virus* on lettuce in Brazil. *Plant Disease*, v.8, p.490. 2000.
- Stenger, D.C., Hein, G.L. e French, R. Nested deletion analysis of Wheat streak inosaic virus HC-Pro: Mapping of domains affecting polyprotein processing and eriophyid mite transmission. *Virology*, v.350, p.465-474. 2006.
- Yang, S.J., Revers, F., Souche, S., Lot, H., Legall, O., Candresse, T. e Dunez, J. Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in *Escherichia coli* and on their infectivity to plants. *Archives of Virology*, v.143, p.2443-2451. 1998.
- Zerbini, F.M., Koike, S.T. e Gilbertson, R.L. Biological and molecular characterization of lettuce mosaic potyvirus isolates from the Salinas Valley of California. *Phytopathology*, v.85, p.746-752. 1995.

**Tabela 1.** Características (sequência, local de anelamento e tamanho do amplicon) dos oligonucleotídeos utilizados nas análises de PCR quantitativo em tempo real.

Nome	Oligonucleotídeos (5'-3')*	Tamanho do amplicon (pb)	Específico para
qCI/AF199	F: CATTGCACAAGAAAGGAGGTGTAC R: CCTGACTAGATCCAAACTTGCAAGA	145	LMV-[AF199]
qNIa/LMVE	F: ACATCTTATTGATCCAGTTTCGAAAT R: TGACTIONGCGAACCACTCATCC	192	LMV-[E], Rec1, Rec3 e Rec4

\* F e R indicam os oligonucleotídeos “forward” e “reverse”, respectivamente.

**Tabela 2.** Cinética do estabelecimento de infecção sistêmica em plantas de *Nicotiana benthamiana* e alface ‘Salinas 88’ infectadas com os isolados AF199 e E e com os recombinantes Rec1, Rec3 e Rec4, quando a folha inoculada foi destacada da planta a 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação.

	<b>AF199</b>	<b>E</b>	<b>Rec1</b>	<b>Rec3</b>	<b>Rec4</b>
<i>N. benthamiana</i>					
6 <sup>a</sup>	0/6 <sup>b</sup>	0/6	0/6	0/6	0/6
12	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
24	2/6	0/6	2/6	0/6	0/6
48	5/6	3/6	6/6	2/6	4/6
C <sup>c</sup>	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Salinas 88					
6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
12	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
24	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
48	6/6	5/6	6/6	4/6	6/6
C	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

<sup>a</sup> Horas após a inoculação em que a folha inoculada foi destacada da planta.

<sup>b</sup> Número de plantas analisadas/número de plantas infectadas.

<sup>c</sup> Plantas controle, nas quais a folha inoculada não foi destacada.

## Legenda das figuras

**Figura 1.** Representação esquemática do genoma do *Lettuce mosaic virus* (LMV) e estrutura dos recombinantes construídos entre os isolados AF199 e E. Os sítios de enzimas de restrição utilizados para a construção dos recombinantes e suas posições em relação ao genoma viral estão indicados. O genoma do isolado AF199 está representado em preto, e o genoma do isolado E em branco.

**Figura 2.** Sintomas induzidos pelos isolados AF199 (A, B) e E (C, D) e pelos recombinantes Rec1 (E, F), Rec3 (G, H) e Rec4 (I, J) em plantas de *Nicotiana benthamiana* e em alface cv. Salinas 88, aos 15 e 20 dias após a inoculação, respectivamente.

**Figura 3.** Cinética de acúmulo de RNA viral dos isolados AF199 e E e dos recombinantes Rec1, Rec3 e Rec4 em folhas inoculadas de *Nicotiana benthamiana*. O RNA foi extraído a partir de folhas coletadas a 0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-inoculação (hpi) e a concentração relativa de RNA de cada isolado/recombinante foi determinada por meio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

**Figura 4.** Cinética de acúmulo de RNA viral dos isolados AF199 e E e dos recombinantes Rec1, Rec3 e Rec4 em folhas não-inoculadas de *Nicotiana benthamiana*. O RNA foi extraído a partir de folhas coletadas a 0, 5, 10, 15 e 20 dias pós-inoculação (dpi) e a concentração relativa de RNA de cada isolado/recombinante foi determinada por meio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

**Figura 5.** Cinética de acúmulo de RNA viral dos isolados AF199 e E e dos recombinantes Rec1, Rec3 e Rec4 em folhas inoculadas de alface ‘Salinas 88’. O RNA foi extraído a partir de folhas coletadas a 0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-inoculação (hpi) e a concentração relativa de RNA de cada isolado/recombinante foi determinada por meio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).



**Figura 6.** Cinética de acúmulo de RNA viral dos isolados AF199 e E e dos recombinantes Rec1, Rec3 e Rec4 em folhas não-inoculadas de alface ‘Salinas 88’. O RNA foi extraído a partir de folhas coletadas a 0, 5, 10, 15 e 20 dias pós-inoculação (dpi) e a concentração relativa de RNA de cada isolado/recombinante foi determinada por meio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

**Figura 7.** Alinhamento de (A) nucleotídeos e (B) aminoácidos da região codificadora da proteína HC-Pro dos isolados AF199 E.

Figura 1

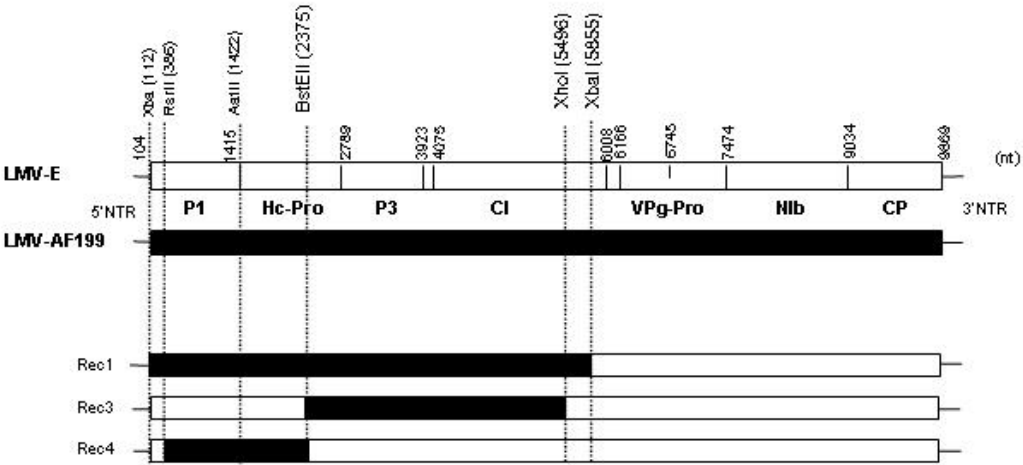
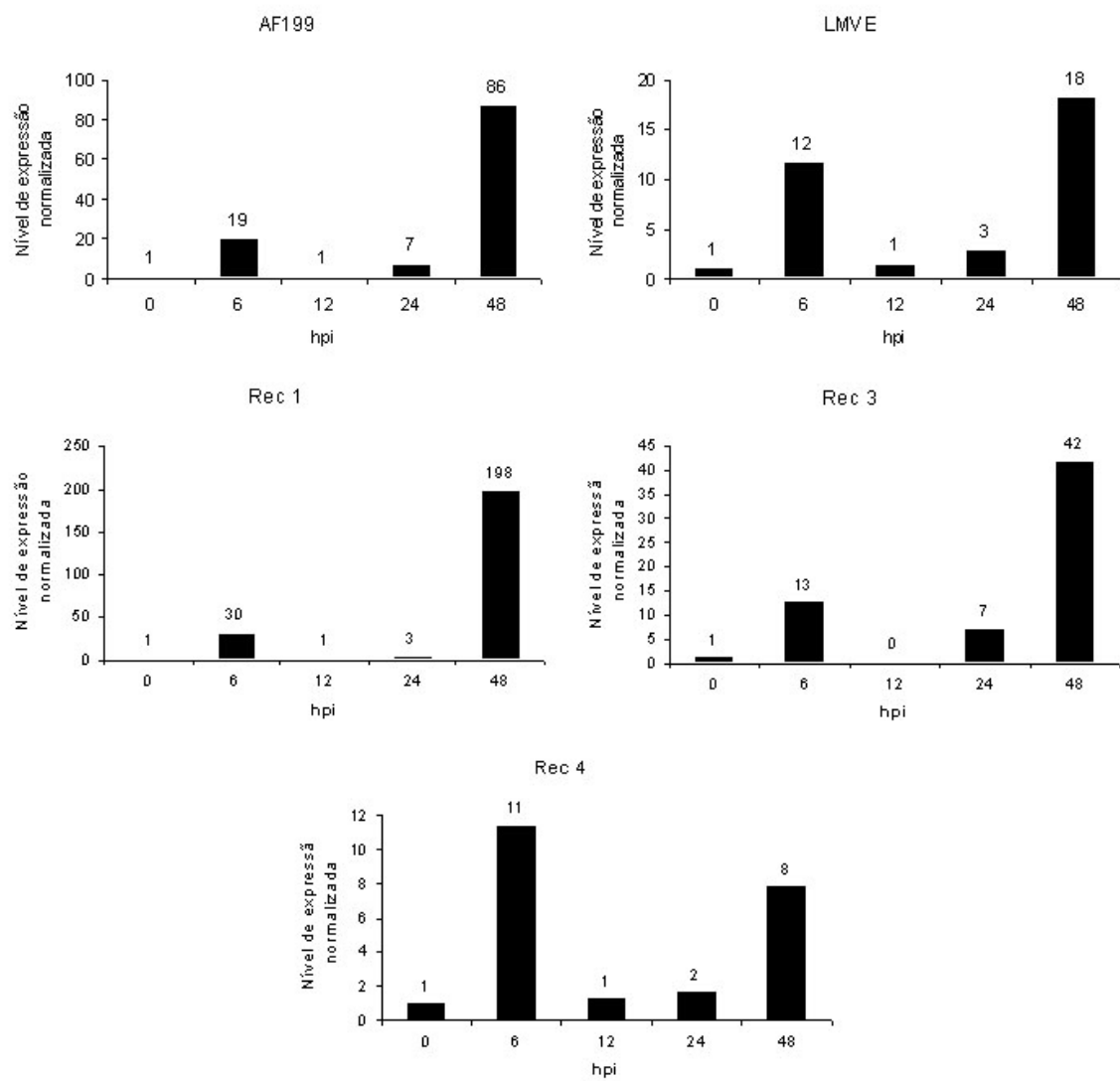


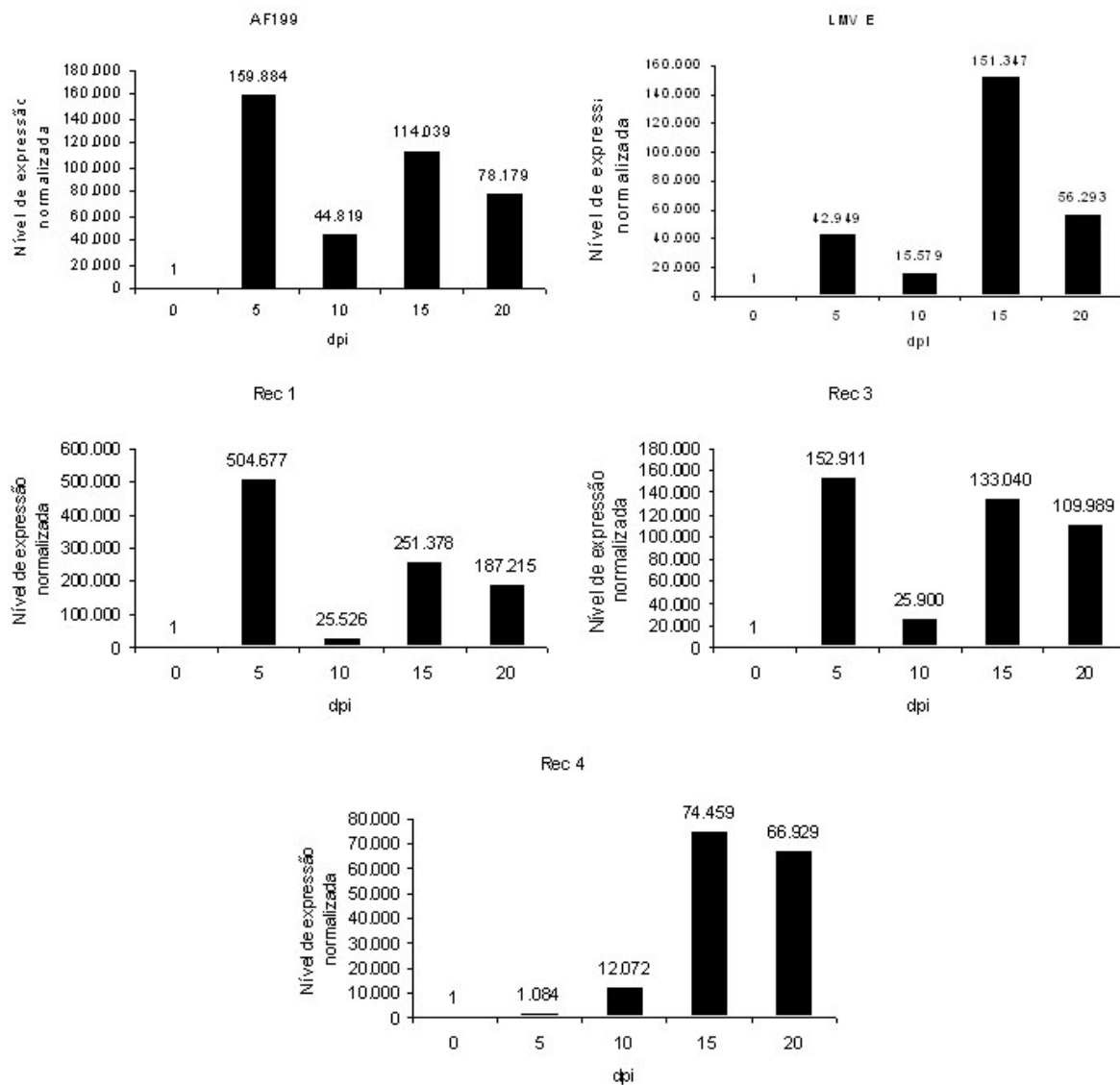
Figura 2



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**

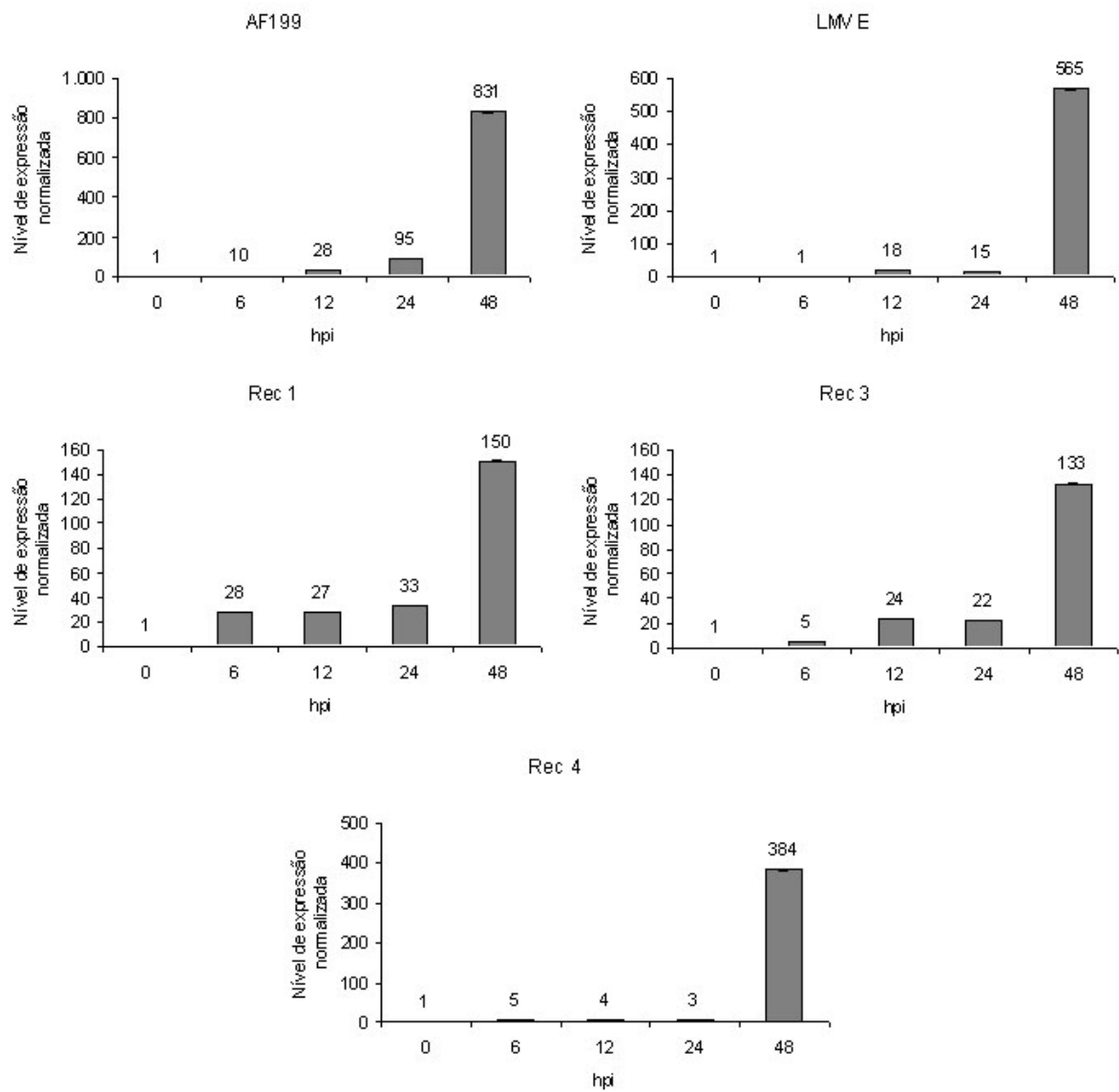
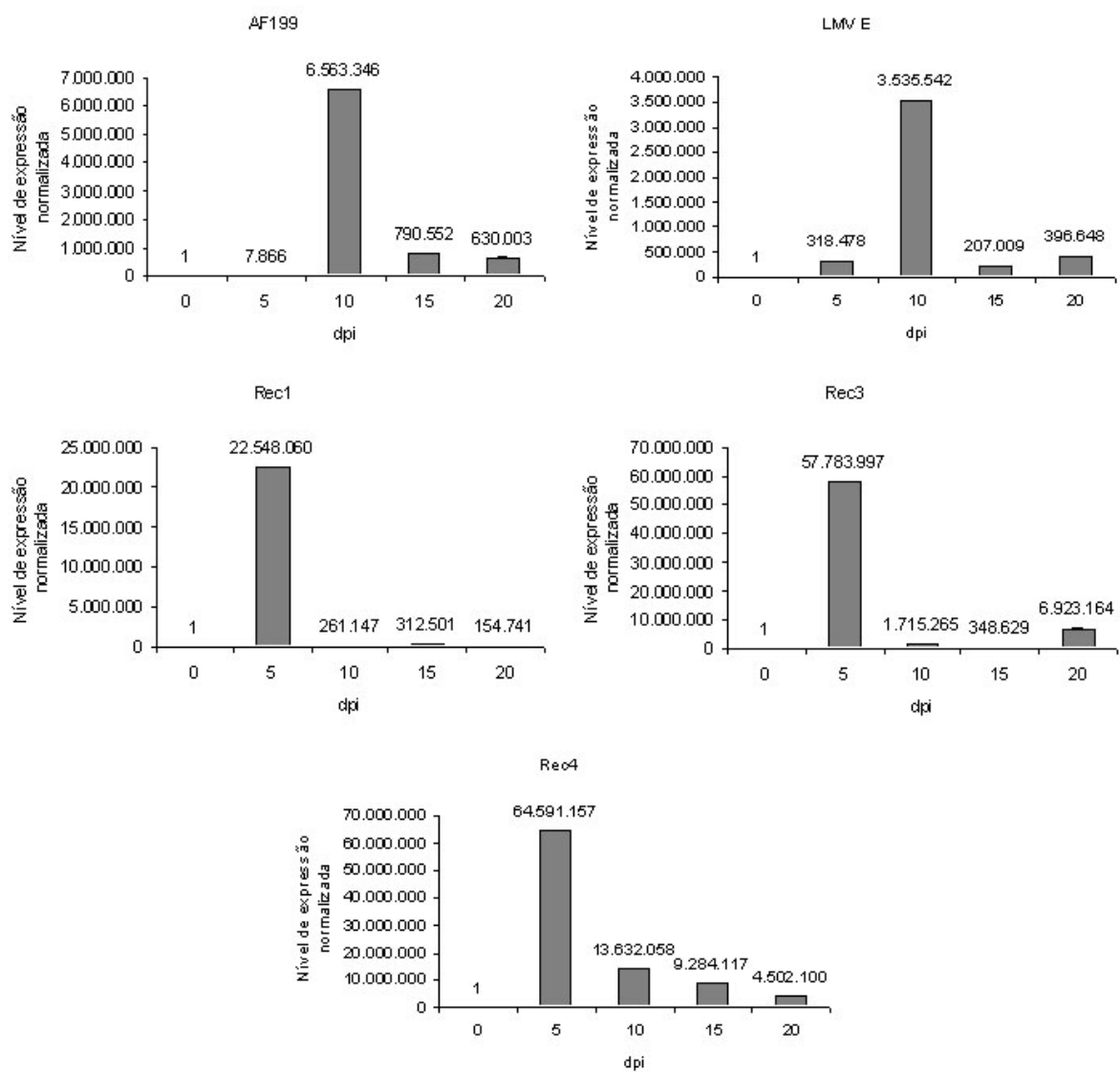


Figura 6



# Figura 7

## A

```

LMVE      AGCGACGTCGCACGAAACTTCTGGAACGGATACTCAACTTGTTTCATGCACAACACCCCA 60
LMVAF199  AGCGACGTCGCACGAAACTTCTGGAACGGATACTCAACTTGTTTCATGCACAATACCCCA 60
*****

LMVE      AAGGACATACTCCATACCTGCACATCAGATTTTGATGTTAAAGATGCGGCACTGTCGCA 120
LMVAF199  AAGGACATACTCCATACCTGCACATCAGATTTTGATGTTAAAGATGTTGGCACTGTCGCA 120
*****

LMVE      GCACTTTTAACTCAAACACTGTTTCAATTTGGGAAAATCACCTGTGAAAATGCGCAATC 180
LMVAF199  GCACTTTTAACTCAAACACTGTTTCAATTTGGGAAAATCACCTGTGAAAATGCGCAATC 180
*****

LMVE      GAGTACAAAATCTAACCGGAGATGAGCTTGCCACGCGTGTAAATAAGGAGATCGATGGA 240
LMVAF199  GAGTACAAAATCTAACCGGAGATGAGCTTGCCACGCGTGTAAATAAGGAGATCGATGGA 240
*****

LMVE      ACCATAATCAGTATTCAAACTCAGCATCCACGCTTCGTGCATGACTCAAATTTCTCAGG 300
LMVAF199  ACCATAATCAGTATTCAAACTCAGCATCCACGCTTCGTGCATGACTCAAATTTCTCAGG 300
*****

LMVE      TTAATTAACAAGTCTCAATGCTAAGAATGGGAACCTTTGAGCATTTCAGAGACGGAG 360
LMVAF199  TTAATTAACAAGTCTCAATGCTAAGAATGAGAACCTTTGAGCATTTCAGAGACGGAG 360
*****

LMVE      AGGATAATTGGGGATCGAATGGATGCACCTTCTCACACGTAATAAGTTGAATGCTATC 420
LMVAF199  AGGATAATTGGGGATCGAATGGATGCACCTTCTCACACGTAATAAGTTGAATGCTATC 420
*****

LMVE      GTCATTAAGGTAATCAAGCAACTCCGATGAGATGGCACAAGCATCGAACCATGTCCCTC 480
LMVAF199  GTCATTAAGGTAATCAAGCAACTCCGATGAGATGGCACAAGCATCGAACCATGTCCCTC 480
*****

LMVE      GAAATCGCCCGATATTTCAAGAACCGGACTGAGAACATCCAAAAGGGCTCACTAAAGTCA 540
LMVAF199  GAAATCGCCCGATATTTCAAGAACCGGACTGAGAACATCCAAAAGGGCTCACTAAAGTCA 540
*****

LMVE      TTCAGGAACAAGATCTCCGGTAAGGCACACTTAAATCCGAGTCTTATGTGTGACAATCAA 600
LMVAF199  TTCAGGAACAAGATCTCCGGTAAGGCACACTTAAATCCGAGTCTTATGTGTGACAATCAA 600
*****

LMVE      CTTGATAAGAATGTTGGGTTTGAATGGGGCAGCGAAGTTACCATGCCAAAAGGTTTTC 660
LMVAF199  CTTGATAAGAATGTTGGGTTTGAATGGGGCAGCGAAGTTACCATGCCAAAAGGTTTTC 660
*****

LMVE      GACGGGTACTTCGAAACCATTGACCTTCCGATGGCTACAGCAAATACACCATAAGACGC 720
LMVAF199  GACGGGTACTTCGAAACCATTGACCCATCTGATGGCTATAGCAAATACACCATAAGACGC 720
*****

LMVE      AATCCAAATGGGCATCGAAAGTTGGCAATTGGTAATTTGATCGTCTCCACAACTTTGAA 780
LMVAF199  AATCCAAATGGGCATCGAAAGTTGGCAATTGGTAATTTGATCGTCTCCACAACTTTGAA 780
*****

LMVE      TCACATAGAAGAAGTATGTTGGAGAACCAATTGAAGACCTGGTCTCACTAATCAGTGC 840
LMVAF199  TCACATAGAAGAAGTATGTTGGAGAATCAATCGAAGACCTGGTCTCACTAACCAGTGC 840
*****

LMVE      GTAAGCAAAGAGGGAGGTGCCTTCATCTATCCATGCTGCTGTGTACAGATGAATATGGT 900
LMVAF199  GTAAGCAAAGAGGGAGATGCCTTCATCTATCCATGCTGCTGTGTACAGATGAATATGGT 900
*****

LMVE      AAACCAACATTATCTGAGATCAAATGCCACAAAGCATCATTTAGTCCTAGGAAATGCC 960
LMVAF199  AAACCAACATTATCTGAGATCAAATGCCACAAAGCATCATTTAGTCCTAGGAAATGCC 960
*****

LMVE      GGTGACCCCAATATGTGGATTTACCAAAGGAAGCGGAAGGAAAGATGTTTCGTAGCAAAA 1020
LMVAF199  GGTGACCCCAATATGTGGATTTACCAAAGGAAGCGGAAGGAAAGATGTTTCGTAGCAAAA 1020
*****

LMVE      GATGGATATGTTACATAAACATTTCTTGGCTATGCTGCTGACGTCCTCCAGAGGATCAG 1080
LMVAF199  GATGGATATGTTACATAAACATTTCTTGGCTATGCTGCTGACGTCCTCCAGAGGATCAA 1080
*****

```



**Figura 7 (cont.)**

```

LMVE      GCTAAAGATTTACGAAAATGGCACGCGAGATAGCAGTGAACAGCTCGGGGAGTGGCCC 1140
LMVAF199 GCTAAAGATTTACGAAAGATGGCACGCGAGATAGCAGTGAACAGCTCGGGGAGTGGCCC 1140
          *****
LMVE      TCAATGATGGATGTAGCAACGGCTTGTAATATACTGGCTACATTTTATCCAGACACCCGA 1200
LMVAF199 TCAATGATGGATGTAGCAACGGCTTGTAATATAATTAGCTACATTTTATCCAGACACTCGA 1200
          ***** * *****
LMVE      AGATCGGAATTACCCCGAATCTTAGTCGATCATGCAACGAAAACATTTTATGTTTATTGAC 1260
LMVAF199 AGATCGGAGTTACTTCGAATCTTAGTCGATCAGCAACGAAAACATTTCCATGTAATTGAT 1260
          ***** * *****
LMVE      TCATATGGTTCAATCAGACTGGATATCATATTTCTGAAAGCCAAATACCGTGACCAACTC 1320
LMVAF199 TCATATGGTTCAATCAGACTGGATTCATATTTCTGAAAGCCAAACACCGTGACCAACTC 1320
          *****
LMVE      GTCAAGTTCGCTCATGAATCACTAGAATCCGAGATGCAACACTACAGAGTCGGG 1374
LMVAF199 GTCAAGTTCGCGCATGAGTCACTAGAATCTGAGATGCAACACTACAGAGTAGGG 1374
          ***** *

```

**B**

```

LMVE      SDVARNFWNGYSTCFMHNTPKDILHTCTSDFDVKDCGTVAALLTQTLFQFGKITCGKCAI 60
LMVAF199 SDVARNFWNGYSTCFMHNTPKDILHTCTSDFDVKECGTVAALLTQTLFQFGKITCEKCAI 60
          *****
LMVE      EYKNLTRDELATRVNKEIDGTIIISIQTQHPRFVHVLNFLRLIKQVLNAKNGNFGAFQETE 120
LMVAF199 EYKNLTRDELATRVNKEIDGTIIISIQTQHPRFVHVLNFLRLIKQVLNAKNEINFGAFQETE 120
          *****
LMVE      RRIIGDRMDAPFVSHVKNLNAIVIKGNQATSDEMAQASNHVLEIARYFKNRTENIQKGLSKS 180
LMVAF199 RRIIGDRMDAPFVSHVKNLNAIVIKGNQATSDEMAQASNHVLEIARYLKNRTENIQKGLSKS 180
          *****
LMVE      FRNKISGKAHLNPSLMCDNQLDKNGGFQWQSYHAKRFFDGYFETIDPSDGYSKYTIRR 240
LMVAF199 FRNKISGKAHLNPSLMCDNQLDKNGGFQWQSYHAKRFFDGYFETIDPSDGYSKYTIRR 240
          *****
LMVE      NPNGHRKLAIGNLIVSTNFESHRRSMVGEPIEDPGLTNQCVSKEGGAFIYPCCCVTDEYG 300
LMVAF199 NPNGHRKLAIGNLIVSTNFESHRRSMIGESIPIEDPGLTNQCVSKEGGDAFIYPCCCVTDEYG 300
          ***** *
LMVE      KPTLSEIKMPTKHHLLVLGNAGDPKYVDLPKEAEGKMFVAKDGYCYINIFLAMLVDVPEDQ 360
LMVAF199 KPTLSEIKMPTKHHLLVLGNAGDPKYVDLPKEAEGKMFVAKDGYCYINIFLAMLVDVPEDQ 360
          *****
LMVE      AKDFTKMAREIAVKQLGEWPSMMDVATACNILATFHPDTRRSELPRILVDHATKTFHVID 420
LMVAF199 AKDFTKMAREIAVKQLGEWPSMMDVATACNILATFHPDTRRSELPRILVDHATKTFHVID 420
          *****
LMVE      SYGSITTGPHILKANTVTQLVKFAHESLESEMQRHYRVG 458
LMVAF199 SYGSITTGPHILKANTVTQLVKFAHESLESEMQRHYRVG 458
          *****

```