



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**INTERAÇÃO DO VÍRUS DO ANEL DO PIMENTÃO (*PEPPER RINGSPOT VIRUS* - PepRSV) COM PLANTAS HOSPEDEIRAS**

**MOANA LIMA TAVARES**

**BRASÍLIA/DF**  
**2017**

**MOANA LIMA TAVARES**

**INTERAÇÃO DO VÍRUS DO ANEL DO PIMENTÃO (PEPPER RINGSPOT VIRUS -  
PepRSV) COM PLANTAS HOSPEDEIRAS**

Dissertação apresentada à  
Universidade de Brasília como  
requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre  
em Fitopatologia pelo  
Programa de Pós-Graduação  
em fitopatologia

**Orientadora:**

Dr. Alice Kazuko Inoue Nagata

**BRASÍLIA**  
**DISTRITO FEDERAL - BRASIL**  
**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Tavares, Moana Lima.

Interação do vírus do anel do pimentão (*Pepper ringspot virus* - PepRSV) com plantas hospedeiras. / Moana Lima Tavares

Brasília, 2017

p. 104

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. *Pepper ringspot virus* (PepRSV) – Interação

I. Universidade de Brasília PPG/FIT

II. Interação do vírus do anel do pimentão (*Pepper ringspot virus* - PepRSV) com plantas hospedeiras.

Aos meus pais Alanita de Lima Tavares e Carlos Alberto Tavares e ao meu irmão Tássio Lima Tavares pelo carinho, incentivo e por serem exemplos de determinação e persistência para minha vida.

*Dedicatória*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela vida, oportunidade e poder conviver com tantas pessoas que me ensinaram nesta trajetória.

Especialmente por toda a minha família por tudo que me proporcionam diariamente.

Ao meu namorado Danilo Akio de Sousa Esashika e por sua família maravilhosa que sempre me acolheram com muito carinho e alegria, todas as vezes que precisei. Por todo o carinho e apoio em me incentivar a crescer.

À minha orientadora Dr. Alice Kazuko Inoue Nagata que tanto admiro, pela amizade, orientação, oportunidade, apoio, incentivo profissional. E por ser a representação ética para mim.

Ao Dr. Tatsuya Nagata pela paciência em me ensinar, pela oportunidade, pelo incentivo e pelo apoio.

Ao Dr. José Osmar Gaspar (São José do Rio Preto/UNESP) por fornecer o isolado de PepRSV para a realização deste trabalho.

Aos amigos do curso de pós-graduação em Fitopatologia pelos momentos de aprendizado e alegria em especial ao Cristiano, Marcelo e Jamile.

Aos colegas e amigos do laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças, Camila, Pedro, Tadeu, Thais Thiago, Vivian, Daniely por toda ajuda, atenção, ensinamentos, amizade e pelos inúmeros momentos de risada.

Aos funcionários da Embrapa Hortaliças em especial ao seu Amilton e ao Lúcio pela direta contribuição na realização deste trabalho, com auxílio, ensinamentos, amizade e apoio.

Aos colegas e amigos do laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Universidade de Brasília, Karoline, Layssa, Elen, Raquel Sampaio, Raquel Bonnet,

Nataly, João, Kenia, Dayane, Taina, Pedro, Rosana por todos os ensinamentos, apoio atenção, carinho e amizade.

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida para realização deste trabalho.

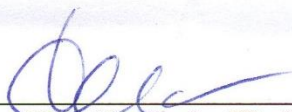
À Universidade de Brasília (UnB) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelo seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram todo meu aprendizado acadêmico e ético, durante a realização da pós-graduação.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Dr. Alice Kazuko Inoue Nagata, com apoio do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças – EMBRAPA Hortaliças, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade de Brasília (UnB).

**INTERAÇÃO DO VÍRUS DO ANEL DO PIMENTÃO (*PEPPER RINGSPOT VIRUS* -  
PepRSV) COM PLANTAS HOSPEDEIRAS.**

**MOANA LIMA TAVARES**

**DISSERTAÇÃO APROVADA em 17/ 02 /2017 por:**



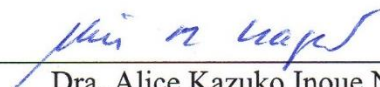
Dr. Elliot Watanabe Kitajima

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo - ESALQ  
(Examinador externo)



Dr. Renato de Oliveira Resende

Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (Examinador Interno)



Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

Embrapa – CNPH (Orientador – Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
2017

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	iv
GENERAL ABSTRACT .....	v
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
PROBLEMA .....	2
JUSTIFICATIVA.....	3
OBJETIVO GERAL .....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA .....	6
1.1 Família VIRGAVIRIDAE.....	6
1.2 Gênero TOBRAVIRUS.....	7
1.2.1 Organização genômica .....	7
1.2.2 Distribuição geográfica e sintomatologia.....	9
1.2.3 Transmissão por nematoides vetores da família Trichodoridae .....	11
1.2.4 Recombinação do RNA2.....	15
1.2.5 Associação das partículas virais com as mitocôndrias .....	16
1.2.7 Construção de clones infecciosos de <i>Tobravirus</i> .....	16
1.2.8 Tobravírus como vetores de expressão ou indutores de silenciamento gênico ...	18
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E PRODUÇÃO DE ANTISORO DE <i>PEPPER RINGSPOT VIRUS</i> .....	21
RESUMO .....	21
ABSTRACT.....	22
2.1. INTRODUÇÃO .....	23
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
2.2.1 Origem e manutenção do Isolado.....	26
2.2.2 Purificação de partícula viral.....	26
2.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	28
2.2.4 Produção de antissoro policlonal.....	28
2.2.5 Círculo de hospedeiros .....	29
2.2.6 Dot-ELISA .....	31
2.2.7 Imunomarcção .....	32
2.2.8. Teste sorológico com outros isolados de PepRSV .....	33
2.2.8. Estudo preliminar da incidência de PepRSV no campo.....	34



2.3 RESULTADOS.....	35
2.3.1 Manutenção do isolado CAM .....	35
2.3.2 Purificação de partículas virais e análise em microscópio eletrônico de PepRSV isolado CAM.....	35
2.3.3 Antissoro .....	37
2.3.4 Círculo de hospedeiros .....	39
2.3.5 Detecção por dot-ELISA da distribuição de PepRSV (CAM) em folha e raiz .....	43
2.3.5 Imunomarcção .....	47
2.3.6 Detecção de PepRSV em tomateiros de campo .....	49
2.3.7 Caracterização de PepRSV isolados LAV e Ag1.....	49
2.4. DISCUSSÃO.....	52
2.5 CONCLUSÕES.....	56
CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS DE <i>PEPPER RINGSPOT VIRUS</i> .....	58
RESUMO .....	58
ABSTRACT .....	59
3.1 INTRODUÇÃO .....	60
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	62
3.2.1 Extração do RNA total .....	62
3.2.2 Amplificação do genoma completo dos isolados (CAM e LAV) de PepRSV para construção do clone infeccioso.....	63
3.2.3 Construção dos clones infecciosos.....	65
3.2.4 Comparação das sequencias dos clones infecciosos dos isolados (CAM e LAV) de PepRSV com sequencias depositadas no banco de dados.....	69
3.2.5 Avaliação da infectividade dos clones .....	69
3.2.6 Análise do RNA2 do novo isolado (Ag1) de PepRSV.....	71
3.3 RESULTADOS.....	72
3.3.1 Amplificação dos segmentos genômicos completos dos isolados (CAM e LAV) de PepRSV .....	72
3.3.2 Construção dos clones infecciosos.....	74
3.3.3 Análise da sequência nucleotídica dos clones selecionados dos isolados CAM e LAV de PepRSV .....	75
3.2.5 Avaliação da infectividade dos clones .....	76
3.3.6 Análise do RNA2 do isolado Ag1 de PepRSV .....	82
3.4 DISCUSSÃO.....	84
3.5 CONCLUSÕES.....	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	89

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90
----------------------------------	----

## RESUMO GERAL

TAVARES, Moana Lima. **Interação do vírus do anel do pimentão (*Pepper ringspot virus* - **PepRSV**) com plantas hospedeiras**. 2017. 104p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas no mundo. O cultivo de tomateiro representa uma importante atividade econômica e social no Brasil. As viroses representam um grande desafio fitossanitário para as principais regiões produtoras desta hortaliça, sendo que os begomovírus, tospovírus e crinivírus destacam-se pela importância e alta incidência. Recentemente, houve relatos de ocorrência de um tobravírus em tomateiro no Brasil e a carência de informações sobre essa virose justifica uma alta demanda para a realização de estudos sobre esse importante grupo de vírus de plantas. Representantes do gênero *Tobravirus* apresentam o genoma constituído por RNA senso positivo e bipartido (RNA1 e RNA2). Os tobravírus são transmitidos planta a planta por nematoides de solo e raízes dos gêneros *Paratrichodorus* e *Trichodorus* (Família Trichodoridae), considerados seus vetores naturais. Este gênero é representado por apenas três espécies, *Tobacco rattle virus* (TRV), *Pea early-browning virus* (PEBV) e *Pepper ringspot virus* (PepRSV). Conhecido como vírus da mancha anelar do pimentão ou vírus da faixa amarela do tomateiro, o PepRSV foi descrito somente no Brasil, causando doenças nas culturas de pimenta, alcachofra, patchuli e tomate. O primeiro isolado a ser caracterizado foi proveniente de pimenta e é conhecido como isolado CAM (Campinas-SP). Em 2012, a ocorrência de dois isolados de PepRSV foi relatada em tomateiro rasteiro em Luziânia, GO, denominados LAV e Pivo4. O objetivo geral deste trabalho foi estudar a interação de PepRSV com plantas hospedeiras e construir clones infecciosos de PepRSV (isolado CAM e LAV). Dois isolados foram utilizados, CAM de pimentão e LAV, isolado de tomateiro. Inicialmente, estes isolados foram caracterizados biologicamente e um antissoro foi produzido (cap. 2). Adicionalmente, clones infecciosos foram construídos (cap. 3). No capítulo 2, o círculo de hospedeiro foi analisado a partir inoculação mecânica em plantas indicadoras e cultivares de tomateiro. Partículas virais foram purificadas visando a produção de anticorpos em coelhos. A presença das partículas purificadas foi confirmada em microscópio eletrônico de transmissão e o antissoro anti-CP foi produzido. No capítulo 3, descreve-se a construção de clones infecciosos de PepRSV isolado CAM e LAV através da extração de RNA total, seguido por uma RT-PCR do RNA1 e RNA2 que foram inseridos no vetor de clonagem pJL-89 por Gibson Assembly. Os clones de PepRSV (isolado CAM e LAV) gerados foram agroinfiltrados em plantas de *N. benthamiana*. Conclui-se com esse trabalho que foi possível a produção do antissoro policlonal anti-CP que foi utilizado como técnica de detecção sorológica para determinar o círculo de hospedeiros do isolado CAM de PepRSV (infectou sistemicamente 16 plantas distintas); PepRSV isolado CAM se transloca para o sistema radicular quando inoculado na parte aérea das hospedeiras *Nicotiana tabacum* ‘Samsun’, *N. tabacum* ‘TNN’, *N. rustica*, *Capsicum chinense* PI159236, *C. annuum* ‘Ikeda’, *S. lycopersicum* cv. Santa Clara, *Chenopodium quinoa* e *Gomphrena globosa*; as cultivares de tomateiro Santa Clara, AP533, N901, U2006, Money Maker e Gaucho são susceptíveis à infecção por PepRSV isolado CAM; foi detectado um novo isolado de PepRSV denominado Ag1. Finalmente, os clones infecciosos de dois isolados construídos se mostraram infectivos em plantas de *N. benthamiana*, viabilizando a realização de estudos aprofundados de replicação, transmissão e translocação.

**Palavras-chave:** *Tobravirus*, gama de hospedeiros, purificação, clone infeccioso

## GENERAL ABSTRACT

TAVARES, Moana Lima. **Interaction of 'vírus do anel do pimentão' (*Pepper ringspot virus* - PepRSV) with plant hosts**. 2017. 104p. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the main vegetables grown in the world. The cultivation of tomato represents an important economic and social activity in Brazil. Viruses represent a major phytosanitary problem for the major growing regions of this vegetable, being the begomovirus, tospovirus and crinivirus the ones with great importance and high incidence. Recently, there were reports of the occurrence of a tobnavirus in Brazil and the lack of information about this virus disease justifies a high demand on starting a research on this important virus group. Members of the genus *Tobravirus* have the genome constituted by positive sense RNA in a bipartite genome (RNA1 and RNA2). Tobnaviruses are transmitted plant-by-plant by soil nematodes of the genus *Paratrichodorus* and *Trichodorus* (family Trichodoridae), considered as their natural vectors. This genus is represented by only three species, *Tobacco rattle virus* (TRV), *Pea early-browning virus* (PEBV) and *Pepper ringspot virus* (PepRSV). Known as 'vírus da mancha anelar do pimentão' or 'vírus da faixa amarela', PepRSV is only described in Brazil, causing diseases in pepper, artichoke, patchuli and tomato plants. The first isolate characterized was from pepper and is known as isolate CAM (Campinas-SP). In 2012, the occurrence two isolates of PepRSV was reported in processing tomatoes in Luziânia, GO, denominated LAV and Pivo4 . The general objective of this work was to study the interaction of PepRSV with the host. Two isolates were used, CAM from pepper and LAV, collected in tomato in 2012. Initially, these isolates were characterized biologically and an antibody was produced (Chapter 2). Furthermore, infectious clones were constructed (Chapter 3). In the chapter 2, the host range was analyzed after mechanical inoculation in indicator plants, and tomato cultivars. Viral particles were purified for the production of antibodies in rabbits. The presence of the purified particles was confirmed by transmission electron microscopy, and an antibody with good specificity was produced. In the chapter 3, PepRSV infectious clones were constructed by extracting total RNA, followed by an RNA-1 and RNA2 RT-PCR that were inserted into the pJL-89 cloning vector by Gibson Assembly and later were agro-infiltrated into susceptible plants. It was concluded that it was possible to produce anti-CP polyclonal antibody; the PepRSV CAM isolate infects 16 different plants systemically; PepRSV isolate CAM translocates to the root system when inoculated on the aerial part of the hosts *Nicotiana tabacum* 'Samsun', *N. tabacum* 'TNN', *N. rustica*, *Capsicum chinense* PI159236, *C. annuum* 'Ikeda', *S. lycopersicum* cv. Santa Clara, *Chenopodium quinoa* and *Gomphrena globosa*; the tomato cultivars AP533, N901, U2006, Money Maker and Gaucho were susceptible to infection by PepRSV isolated CAM; a new PepRSV isolate named Ag1 was detected; and finally the clones of PepRSV were infectious to *N. benthamiana* plants.

**Keywords:** *Tobravirus*; host range, purification, infectious clone

## INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das principais hortaliças cultivadas no mundo e o Brasil destaca-se entre os maiores produtores mundiais de tomate (IBGE, 2015). Dentre as doenças da cultura do tomateiro, as viroses representam um grande desafio fitossanitário para as principais regiões produtoras desta hortaliça (Lopes *et al.*, 2003). Recentemente, o tobravírus conhecido como vírus do anel do pimentão (*Pepper ringspot virus* - PepRSV) foi relatado em tomateiro em Goiás, podendo-se tornar alvo de preocupação para a tomaticultura nacional.

O gênero *Tobravirus* é formado por apenas três espécies relatadas no mundo, *Tobacco rattle virus* (TRV), *Pea early-browning virus* (PEBV) e *Pepper ringspot virus* (ADAMS *et al.*, 2012). TRV e PEBV não ocorrem no território brasileiro, sendo que TRV é considerado como praga quarentenária A1 (ausente) no Brasil (MAPA, 2016).

As partículas dos vírus desse gênero são alongadas e rígidas, bipartidas com dois tamanhos: longo (180 a 215 nm) e curto (46 a 114 nm). O genoma é constituído por RNA de fita simples, senso positivo e bipartido (RNA 1 e RNA 2), com uma estrutura de "tRNA-like" na região 3' (Offord, 1966), sem cauda poli (A). Esses vírus apresentam como vetor de transmissão os nematoides da família *Trichodoridae*.

O RNA 1 dos tobravírus codifica proteínas essenciais para a replicação viral (pequena e grande subunidade da replicase - ORF 1a e ORF 1b), proteína de movimento célula-a-célula (ORF 2) e o supressor de RNAi (ou silenciamento gênico pós-transcricional; ORF 3) (Macfarlane, 1999). O RNA 2 é responsável por codificar a capa protéica (CP) e as proteínas não-estruturais 2b e 2c, que são necessárias para a transmissão por nematoides, relatadas para as espécies TRV e PEBV (Macfarlane, 2010).

PepRSV é pouco estudado e três isolados (CAM, Pivo4 e LAV) foram caracterizados anteriormente (Costa & Kitajima, 1968; Batista *et al.*, 2014). O isolado CAM é o primeiro

isolado identificado em pimentão, coletado em São Carlos, SP (Costa & Kitajima, 1968), e os isolados Pivo4 e LAV foram coletados em 2012 em tomateiro, na região de Luziânia, GO (Batista *et al.*, 2014).

Curiosamente, o isolado CAM de PepRSV não possui os genes que codificam as proteínas 2b e 2c descritas para as espécies TRV e PEBV, possivelmente deletadas durante a manutenção do isolado por repetidas inoculações mecânicas (Bergh *et al.*, 1985). Especula-se que o isolado CAM não seja transmissível por nematoides devido à falta destas proteínas. Já a sequência do RNA 2 do isolado LAV (PepRSV) é maior e apresenta o gene da proteína 2b, sendo, porém, distinta da proteína 2b de TRV e PEBV (Batista *et al.*, 2014). Como o isolado LAV (PepRSV) não foi propagado por inoculação mecânica, é esperado que a sua transmissão ocorra normalmente pelos nematoides. Portanto, existe uma dúvida se o mecanismo de transmissão de PepRSV por nematoide é distinto dos demais tobrovírus ou se existem fatores ainda desconhecidos nesta interação entre o vírus e o vetor.

Este trabalho tem como objetivo estudar a interação entre PepRSV e os hospedeiros e foi dividido em duas partes principais. A primeira parte consiste na caracterização biológica (círculo de hospedeiros), produção do antissoro policlonal e avaliação da sua ocorrência natural de PepRSV no Distrito Federal. Na segunda parte, foram construídos clones infecciosos de dois isolados de PepRSV, CAM e LAV.

## **PROBLEMA**

As espécies TRV e PEBV causam grandes danos econômicos principalmente em culturas de batata e ervilha, respectivamente. A espécie PepRSV parece não ter uma relevância em termos de incidência, porém, pode representar um risco para a cultura do tomateiro, pimenteira e batateira. Em 2012, foram encontrados dois novos isolados (LAV e Pivo4) em áreas de cultivo de tomateiro rasteiro no estado de Goiás. As plantas infectadas apresentavam sintomas de manchas em anéis cloróticos nas folhas baixas. Durante a

realização deste trabalho, no ano de 2016, foi encontrado em Alexandre Gusmão, DF, um outro isolado de PepRSV denominado Ag1 causando infecção em plantas de tomateiro estaqueado tipo grape. A ocorrência desses isolados representam um alerta para os pesquisadores para a importância que este tobrovírus pode ter para as culturas do tomateiro, pimenteira e batateira no Brasil.

## **JUSTIFICATIVA**

Considerando que PepRSV é o único tobrovírus encontrado no território brasileiro, torna-se importante realizar um estudo para aprofundar o conhecimento quanto à interação entre vírus-planta-vetor antes que este vírus venha causar importantes danos econômicos em nossa produção. Observa-se que há poucos estudos recentes que envolvem a caracterização biológica, sorológica e molecular desse vírus. Adicionalmente, PepRSV é o único tobrovírus que não foi caracterizado quanto à transmissão por nematoides e as diferenças observadas no genoma dos novos isolados podem indicar propriedades de transmissão de PepRSV distintas de demais tobrovírus.

## **OBJETIVO GERAL**

Com o objetivo final de estudar detalhadamente a interação entre PepRSV, o hospedeiro e o vetor, este trabalho visou a caracterização biológica de PepRSV e a produção de ferramentas para o estudo deste vírus, como antissoro e clones infecciosos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar o círculo de hospedeiro do isolado (CAM) de PepRSV para compreender quais hospedeiras são susceptíveis a esse vírus;
- Purificar partículas de PepRSV e produzir antissoro policlonal para utilizar como técnica de detecção (rápida e de baixo custo);
- Detectar partículas virais nas raízes e folhas por sorologia para analisar a distribuição das partículas virais de PepRSV (isolado CAM) em diferentes hospedeiros;

- Produzir os clones infecciosos de PepRSV (isolados CAM, LAV).



# CAPÍTULO 1

---

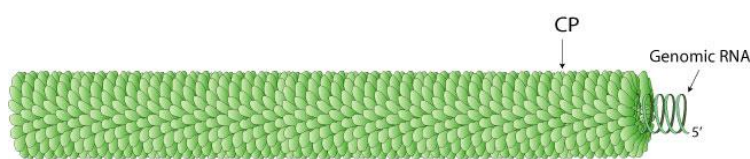
---

**REVISÃO DE LITERATURA**

## CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Família VIRGAVIRIDAE

Os vírus da família *Virgaviridae* apresentam partículas virais em formato de bastonete (envolvidos por subunidades de proteínas da capa) com diâmetro entre 20-25 nm (Figura 1.1). Os gêneros que constituem esta família são: *Furovirus*, *Goravirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* e *Tobravirus* (Adams *et al.*, 2012).



**Figura 1.1:** Representação do formato da partícula da família *Virgaviridae* (Fonte: ViralZone, [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/734.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/734.html)).

Os membros desta família apresentam genoma de RNA fita simples senso positivo com uma estrutura de t-RNA like na região 3' terminal do segmento genômico, proteína de revestimento com peso entre 19-24 kDa e proteína de replicação com conformação alfa-hélice (Adams *et al.*, 2009). A transmissão mecânica pode ser realizada para todos os membros desta família, porém para aqueles do gênero *Tobamovirus* é o único meio de transmissão conhecido (Almeida, 2005). Os vírus do gênero *Hordeivirus* são transmitidos através de pólen e sementes. Os vírus dos gêneros *Furovirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus* são transmitidos por fungos de solo. Somente o gênero *Tobravirus* é transmitido por nematoides fitoparasitas (Almeida, 2005; Adams *et al.*, 2009).

O número de segmentos genômicos é variável dentro dos vírus desta família podendo ser de 1, 2 ou 3 dependendo do gênero. Os vírus dos gêneros *Hordeivirus* e *Pomovirus* apresentam o genoma tripartido, enquanto aqueles dos gêneros *Furovirus*, *Goravirus*, *Pecluvirus* e *Tobravirus* são bipartidos; e somente os membros do gênero *Tobamovirus* são monopartidos. O que diferencia o gênero *Tobravirus* é a capacidade de manter uma relação

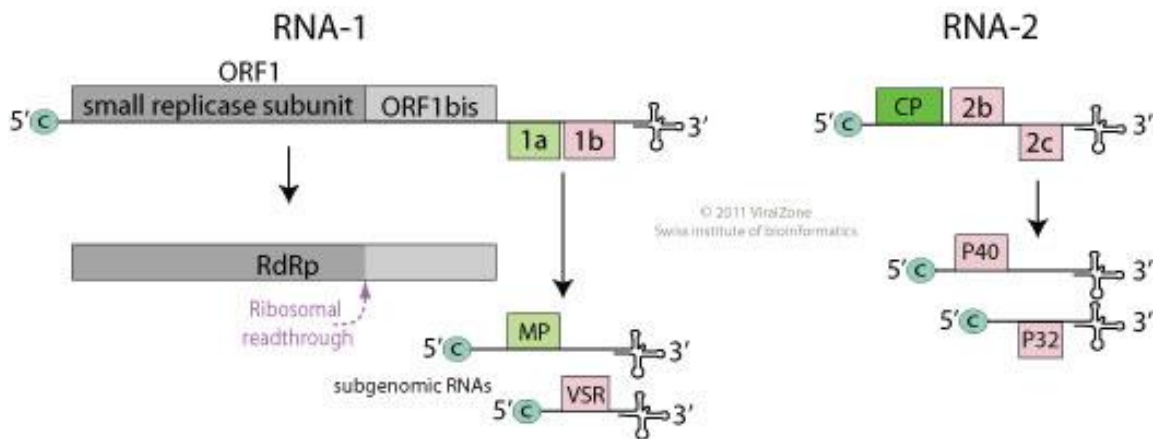
de transmissão com um agente biológico, os nematoides fitoparasitas (Adams *et al.*, 2009). O alvo deste estudo pertence ao gênero *Tobravirus*.

## 1.2 Gênero TOBRAVIRUS

Três espécies pertencem ao gênero tobravirus, *Tobacco rattle virus* (TRV), a espécie-tipo, *Pea early-browning virus* (PEBV) e *Pepper ringspot virus* (PepRSV) (Maat, 1963; Robinson & Harrison, 1989; Adams *et al.*, 2012).

### 1.2.1 Organização genômica

A organização genômica dos vírus do gênero *Tobravirus* é bipartida, sendo constituído de duas moléculas de ssRNA senso positivo, que são encapsidadas em uma partícula longa (RNA1) de 180 a 215 nm e uma partícula curta (RNA2) de 46 a 114 nm (Harrison & Robinson, 1986; Macfarlane, 1999; Adams *et al.*, 2012). O RNA1 é responsável por codificar algumas proteínas necessárias para a infecção viral. A região 5' próxima a ORF ("open reading frame") codifica uma proteína de massa molecular de 134-141 kDa, denominada de metiltransferase e helicase. A tradução do códon 3' terminal da ORF em uma estratégia conhecida como "leaky stop codon" dá origem a uma proteína de massa molecular de 194-201 kDa, constituindo a polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) (Koonin, 1991; Rozanov *et al.*, 1992). A ORF1a codifica a proteína de movimento célula-a-célula de 29-30 kDa e a ORF1b codifica a proteína supressora de silenciamento gênico rica em cisteína de 12-16 kDa (Hamilton & Baulcombe, 1989; Koonin *et al.*, 1991). As proteínas helicase e RdRp são traduzidas diretamente do RNA1 e as proteínas 1a e 1b são traduzidas a partir dos RNAs sub-genômicos (sgRNAs) (Figura 1.2).



**Figura 1.2:** Representação da organização genômica dos tobavírus (Fonte: ViralZone, [http://viralzone.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/644.html](http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/644.html)).

O RNA2 codifica a proteína de revestimento (CP) de 22-24 kDa e as proteínas não estruturais 2b e 2c (variam entre 1.8-3.9 kDa), que estão envolvidas na transmissão dos tobavírus por nematoides (Figura 1.2) (Hughes *et al.*, 1986; Goulden *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 1997). A região 3' terminal não codificadora do RNA2 apresenta região semelhante com parte da região 3' terminal do RNA1 (Macfarlane, 1997). De acordo com Vassilakos (2001) a deleção de proteínas 2b e 2c do RNA2 influencia no processo de transmissão por nematoides e isolados somente com a CP não são capazes de ser transmitidos por nematoides (Macfarlane *et al.*, 1995). Acredita-se que a proteína 2b desempenha um importante papel no controle da distribuição dos vírus na planta (caule-raiz) (Pitcher, 1967; Coiro & Sasanelli, 1994). A região 5' próxima ao gene da CP não é traduzida através dos sgRNAs.

Devido sua organização genômica bipartida, os tobavírus têm habilidade de causar dois tipos de infecção (Cadman & Harrison, 1959; Sanger, 1969). Plantas infectadas apenas com a partícula viral longa (RNA1) apresentam infecção do tipo NM (não multiplicados). Neste caso, os vírus podem se replicar e propagar sem a síntese da proteína CP. Este tipo de infecção foi observado em campos de batata infectadas com TRV (Macfarlane, 2010). Durante experimentos em casa de vegetação foi observado em plantas de *Petunia hybrida*

infecção do tipo NM causando sintomas sistêmicos que se translocam via sistema vascular (Harrison & Robinson, 1978). Outro trabalho demonstrou que apenas o RNA1 pode induzir sintomas sistêmicos em *N. benthamiana* e *N. clevelandii* inoculadas com clone infeccioso contendo a proteína fluorescente verde (GFP) (Swanson *et al.*, 2002). Foi também demonstrado o movimento do vírus pelo sistema vascular e a sua distribuição para as folhas jovens, concluindo que os tobrovírus não dependem da síntese da proteína CP para realizar o movimento sistêmico. Porém para que os segmentos genômicos RNA1 e RNA2 se movimentem sistemicamente juntos é essencial a presença no genoma da região 3' terminal do gene da CP, mesmo sem a formação de partículas (Swanson *et al.*, 2002).

Plantas infectadas com partículas longas (RNA1) e curtas (RNA2) apresentam a infecção do tipo M (multiplicador) (Cadman & Harrison, 1959). Neste tipo M de infecção ocorre a síntese da CP e a transmissão pelo agente vetor (nematóides) devido a presença do segmento genômico do RNA2 (Cadman & Harrison, 1959; Sanger, 1969). Em cultivares de batata Wilja a infecção por TRV do tipo M foi experimentalmente demonstrada (Dales *et al.*, 2000). Neste caso, a infecção se estabelece de forma sistêmica causando alteração no fenótipo e na composição química dos tecidos do tubérculo e afetando a qualidade do produto a ser comercializado (Dales *et al.*, 2000).

### **1.2.2 Distribuição geográfica e sintomatologia**

TRV é amplamente distribuído mundialmente e pode infectar um grande número de espécies de plantas, por exemplo, causando doenças economicamente importantes em batata (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e plantas ornamentais (Macfarlane, 1999). Os principais sintomas observados nas plantas infectadas são anéis cloróticos e encarquilhamento nas folhas, redução no crescimento das plantas, deformação e necrose circular interna nos tubérculos (Robinson & Harrison, 1989; Dale *et al.*, 2000).

PEBV é encontrado no norte da Europa e norte da África. Esse vírus infecta principalmente leguminosas como ervilha (*Pisum sativum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), alfafa (*Medicago sativa*) e as não leguminosa beterraba (*Beta vulgaris esculenta*) e alcachofra (*Cynara scolymus*) (Boulton, 1996). Os sintomas observados em ervilhas são manchas marrons nas hastes e nas folhas; amarelecimento, manchas e necroses no topo das plantas deixando-as mais quebradiças; modificação na coloração das sementes para cinza-esverdeado e no seu tegumento interno tornando-os enrugados (Boulton, 1996).

TRV e PEBV não foi relatado no território Brasil, mas somente TRV é considerado praga quarentenária A1 (ausência da doença) (Mapa, 2016).

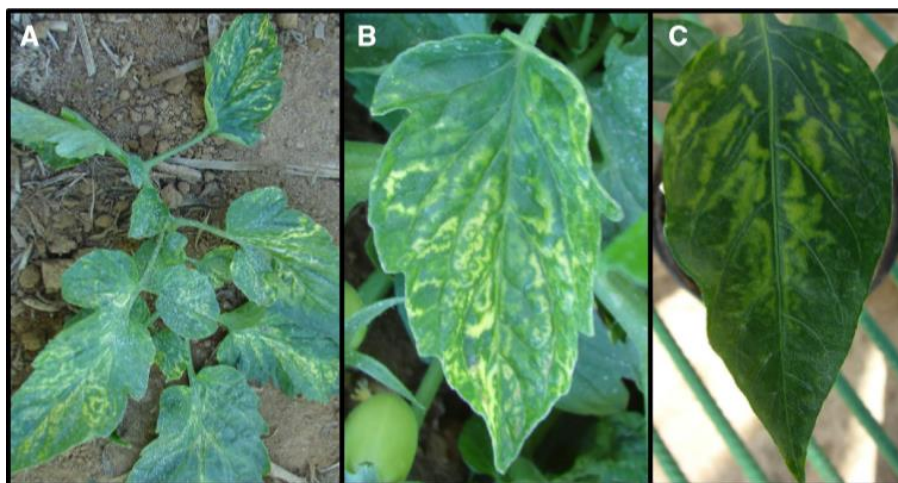
PepRSV é conhecido como vírus da mancha anelar do pimentão ou vírus da faixa amarela do tomateiro, descritos por Costa & Kitajima, (1968) e Silberschmidt, (1963), respectivamente. O primeiro relato do vírus da mancha anelar do pimentão foi em amostras coletadas em 1960 no estado de São Paulo, Brasil (Costa & Kitajima, 1968). Posteriormente foi relatado o isolado que infecta tomateiro e causa sintomas de faixa amarela e anéis cloróticos em folhas de *Solanum lycopersicum* (Silberschmidt, 1963).

A caracterização de propriedades físicas e químicas do vírus da mancha anelar isolado de pimentão foi realizada por Silva (1965) e posteriormente foi realizado estudo da morfologia das partículas por Kitajima *et al.* (1969) demonstrando a similaridade com a espécie TRV, mas considerando-o distinto. Mais tarde, testes de hibridização demonstraram que não havia nenhuma afinidade do vírus da mancha anelar do pimentão com a sequência de ácidos nucleicos de TRV e PEBV, sendo então sugerida a sua classificação como *Pepper ringspot virus* (PepRSV), uma nova espécie dentro do gênero *Tobravirus* (Robinson & Harrison, 1985 e 1989).

A espécie PepRSV foi relatada infectando diversas plantas de tomateiro (*S. lycopersicum*) (Salomão *et al.*, 1969; Silberschmidt *et al.*, 1970 & Cupertino *et al.*, 1991);

alcachofra (*Cynara scolymus*) (Chagas & Silberschmidt, 1972); batata (*S. tuberosum*) (Souza-Dias *et al.*, 1979); *Columnnea* sp. (Kitajima *et al.*, 1991); gérbera (*Gerbera hybrida*) (Chagas *et al.*, 1987) e patchuli (*Pogostemon patchuli*) (Gama *et al.*, 1983).

Dois novos isolados de PepRSV foram coletados em Luziânia, GO, Brasil em 2012 em plantas de tomateiro industrial (Batista *et al.*, 2014). Os sintomas encontrados no campo foram de manchas em anéis e faixas amarelas localizado nas folhas baixas (Figura 1.3). Os isolados foram denominados Lavrinha (LAV) e Pivo4 (locais a 10 km de distância entre uma lavoura e outra) (Batista *et al.*, 2014).



**Figura 1.3:** Plantas infectadas com PepRSV isolado Pivo4. Tomateiro com sintomas de manchas em anéis e faixas amarelas em folhas baixas no campo (A, B) e pimenteira (*C. annuum*) artificialmente inoculada com sintomas de faixas cloróticas (Fonte: Batista *et al.*, 2014).

### 1.2.3 Transmissão por nematoides vetores da família *Trichodoridae*

Espécies da família *Trichodoridae* são nematoides ectoparasitas migratórios (não se alimenta em local fixo) de plantas, altamente polípagos e amplamente distribuídas no mundo. A família *Trichodoridae* é composta por cinco gêneros, sendo *Trichodorus*, *Paratrichodorus*, *Monotrichodorus*, *Allotrichodorus* e *Ecuadorus*. Os gêneros relatados como vetores de tobravírus são os didélficos (dois ovários), *Trichodorus*, *Paratrichodorus*.

Para os três gêneros monodélficos (apenas um ovário), *Monotrichodoros*, *Allotrichodoros* e *Ecuadorus*, não há relatos na literatura de espécies vetoras de vírus de plantas (Almeida & Decraemer, 2005). O primeiro relato de vírus transmitido por nematoide foi para a espécie *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) com nematoide vetor *Xiphinema index* (Hewitt *et al.*, 1958), dois anos após foi relatada a transmissão de tobnavírus por trichodorídeos (Sol *et al.*, 1960).

Os trichodorídeos apresentam um comprimento entre 0,35 e 1,8 mm, o corpo é cilíndrico com aspectos dilatados e a região labial e caudal apresentam a mesma espessura (Decraemer, 1995). O estilete é do tipo onquioestilete relativamente longo, o esôfago é do tipo dorilaimida (apresenta parte anterior estreita sem distinção entre procorpo e metacorpo, na porção posterior dilatada apresenta o bulbo basal com sua musculatura e suas glândulas esofagianas) (Decraemer, 1995). O macho possui apenas um testículo distendido anteriormente, variando as células espermáticas na forma e tamanho (Decraemer, 1995). As fêmeas podem ser do tipo didélfico-anfidélfico ou monodélfico-prodélfico, os ovários recurvados e o oviduto com duas células granuladas podem apresentar ou não uma espermateca (Almeida & Decraemer, 2005).

O ciclo de vida dos trichodorídeos se completa com 40 a 45 dias, sendo necessário uma temperatura de 15 a 27°C (Pitcher, 1967). A reprodução é considerada anfimítica (reprodução sexual, quando há presença de machos) ou partenogenética (reprodução assexuada na ausência de machos) e o desenvolvimento dos oócitos está diretamente ligado à fonte de alimento (Pitcher, 1967; Coiro & Sasanelli, 1994).

A transmissão dos tobnavírus por trichodorídeo é do tipo semi-persistente não circulativa (Almeida & Decraemer, 2005). Após adquirir as partículas virais, o nematoide é capaz de reter as partículas em seu corpo e transmitir o vírus por mais de um ano. Após a



troca de cutícula o nematoide se torna incapaz de transmitir o vírus e só se torna novamente virulífero após o acesso a uma fonte (planta) infectada (Karanastasi *et al.*, 2003).

Para que o nematoide se torne virulífero, é necessário que as partículas virais fiquem aderidas à superfície da cutícula que recobre toda a superfície interna do esôfago até a porção inferior do intestino (Taylor & Robertson, 1970). Após o período de aquisição, as partículas serão injetadas junto com a saliva no momento da alimentação do nematoide na célula da hospedeira (Harrison *et al.*, 1974; Karanastasi, 2000). O processo de transmissão foi dividido por Brown & Weischer (1998) em seis etapas: aquisição, absorção, retenção, liberação, transferência e estabelecimento.

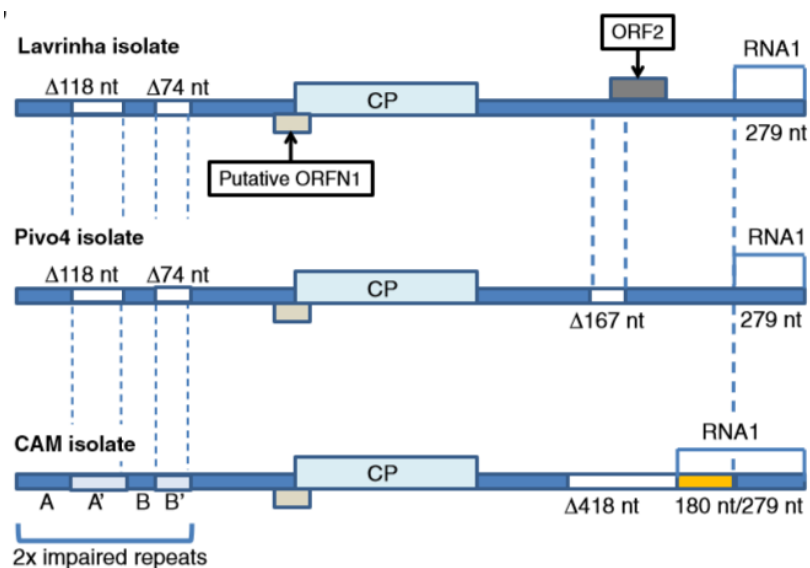
O segmento genômico responsável pela transmissão por nematoides dos tobnavírus é o RNA2 (Ploeg *et al.*, 1993). Através do uso de pseudo-recombinantes e isolados do tipo NM (somente RNA1) e M (RNA1 e RNA2), eles demonstraram que o RNA2 é essencial para que ocorra a transmissão dos tobnavirus por nematoides vetores (Ploeg *et al.*, 1993). As proteínas não estruturais necessárias para que ocorra a transmissão são denominadas 2b e 2c e estão presentes na região 3' terminal do RNA2 das espécies TRV e PEBV (Vassilakos *et al.*, 2001).

A proteína 2b de TRV (isolado PpK20) apresenta alta identidade com a proteína homóloga dos isolados de PEBV; enquanto a proteína 2c de TRV e PEBV apresenta uma baixa identidade entre suas sequências (Hernández *et al.*, 1997). A diferença de identidade da proteína 2c está associada com a relação dessa proteína com as diferentes espécies de nematoides dentro os gêneros *Trichodorus*, *Paratrichodorus* que são os agentes vetores (Hernández *et al.*, 1997), devido a isto TRV e PEBV são mais eficientes para diferentes espécies de nematoides vetores.

A organização genômica do RNA2 de PepRSV (isolados CAM, Pivo4 e LAV) é distinta daquela de TRV e PEBV. O isolado CAM utilizado não apresenta 2b e 2c na

extremidade 3' terminal do RNA2 apresentando uma deleção de 418 nt. O isolado Pivo4, na extremidade 3' terminal do RNA2, apresenta uma deleção de 167 nt não apresentando as proteínas 2b e 2c e o isolado LAV apresenta na região 3' terminal uma possível ORF, mas que não é homóloga à proteína 2b de TRV e PEBV (Figura 1.4) (Batista *et al.*, 2014).

Acredita-se que a diferença visualizada na região 3' do RNA2 dos diferentes isolados (CAM e Pivo4) ocorreu devido a passagens sequenciais do vírus através de inoculações mecânicas, ocasionando mutações artificiais nas ORFs que codificam as proteínas não estruturais necessárias para a transmissão (Hernandez *et al.*, 1996). O isolado CAM vem sendo mantido durante anos em casa de vegetação por inoculação mecânica, já o isolado Pivo4 foi inoculado mecanicamente apenas uma vez e o isolado LAV não foi propagado mecanicamente nenhuma vez antes do isolamento para clonagem e sequenciamento (Figura 1.4).



**Figura 1.4:** Organização genômica dos três isolados de PepRSV (Fonte: Batista *et al.*, 2014)  
CP = capa proteica; Δ= deleções.

Os testes de transmissão realizados com o isolado CAM coletado diretamente do campo demonstraram que a espécie *P. minor* é o potencial vetor (Gama *et al.*, 1983), sendo

necessário testes de transmissão com os novos isolados (LAV e Pivo4) para demonstrar quais espécies de nematoides são os potenciais vetores de PepRSV.

#### **1.2.4 Recombinação do RNA2**

O RNA1 e RNA2 de TRV, PEBV e PepRSV compartilham a mesma região não codificadora na extremidade 3' terminal (Macfarlane, 1999). A região compartilhada é de cerca de 1 kb podendo ser completa ou altamente idêntica as regiões dos genes 1a e 1b do segmento genômico RNA1 (Goulden *et al.*, 1992). Esse fenômeno foi provavelmente derivado de um processo de recombinação entre essas moléculas. A recombinação pode ocorrer entre as diferentes espécies de tobnavírus, como por exemplo o RNA2 de TRV isolado TCM apresenta a região 5' terminal derivada do RNA2 do TRV (isolado PBL), a região central derivada do RNA2 do PEBV e a região 3' derivada do RNA1 do TRV (isolado PBL) (Goulden *et al.*, 1992). Essas regiões semelhantes entre as espécies podem ocorrer em altas taxas. Trabalhos realizados nos países baixos demonstraram que dos isolados presentes na região 30% são semelhantes a TRV e PEBV (Ploeg *et al.*, 1991).

A espécie PepRSV também apresentam regiões semelhantes entre os seus isolados. O isolado CAM (primeiro isolado identificado) no RNA2 na região 3' terminal apresenta 459 nt semelhantes ao RNA1 do isolado CAM (Figura 1.4). Os isolados LAV e Pivo4 de PepRSV RNA2 apresentam 279 nt semelhantes a PepRSV RNA1 isolado CAM com a identidade observada de 93,2%. Estima-se que esta recombinação pode ter ocorrido, por pelo menos, três décadas atrás, sendo o tempo necessário para acumular a diversidade observada (Batista *et al.*, 2014). Com base nestas evidências, fica clara a necessidade de estudos para melhor compreender a finalidade biológica e evolutiva das regiões semelhantes entre o segmento genômico do RNA1 e RNA2 dos diferentes isolados de PepRSV.

### **1.2.5 Associação das partículas virais com as mitocôndrias**

A associação das partículas virais com as mitocôndrias do hospedeiro é uma característica peculiar que distingue PepRSV das demais espécies. Segundo Kitajima & Costa (1969), observou-se associação apenas da partícula longa (RNA1), dispostas de forma agrupada e paralelas entre si, com as mitocôndrias. Mais tarde, Gaspar *et al.* (1984) observaram a associação tanto das partículas longas e como curtas com as mitocôndrias.

A relação físico-química da associação com as mitocôndrias é desconhecida, mas se acredita que possa existir uma provável tentativa da célula de inviabilizar a liberação de sinais que ativam o processo mitogênico (MAPKs) relacionado com a defesa das plantas a invasores (Liu *et al.*, 2007; Rikhvanov *et al.*, 2007). Outra hipótese levantada para a associação entre a mitocôndria e partículas virais é que a mitocôndria pode ser utilizada por PepRSV para replicação e montagem de partículas.

Esta característica é exclusiva para PepRSV entre os tobrovírus conhecidos, porém é observada em outro vírus como *Henbane mosaic virus* (HMV) (gênero *Potyvirus*) (Kitajima & Lovisolo, 1972). Além disso, foi relatada associação estreita entre as cristas mitocondriais e as partículas virais para as espécies *Beet yellow stunt virus* (BYSV) (gênero *Closterovirus*; (Esau, 1979) e *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) (gênero *Tombusvirus*; (Russo & Martelli, 1981).

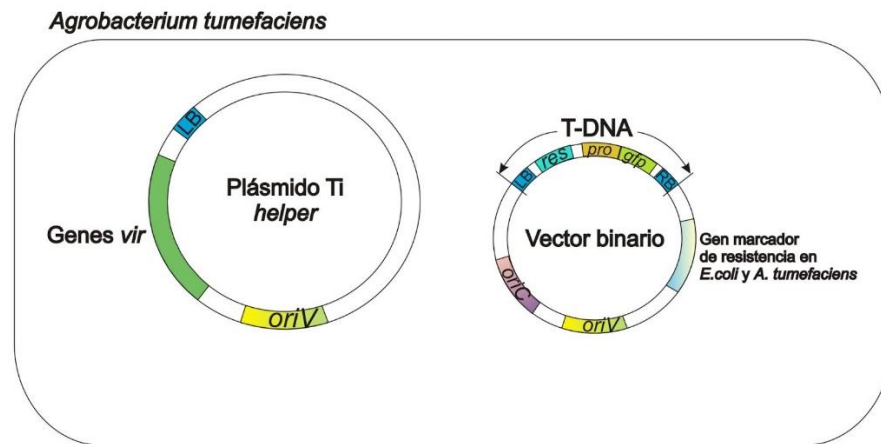
### **1.2.7 Construção de clones infecciosos de *Tobravirus***

A genética reversa é uma técnica que é utilizada para a construção de clones infecciosos e permite a manipulação de vírus de RNA a partir de seu DNA clonado, sendo uma técnica desenvolvida na década de 80 por Ahlquist *et al.* (1984). Eles demonstraram que o cDNA de *Brome mosaic virus* (BMV) (*Bromoviridae*) pode ser recuperado por transcrição *in vitro*, a partir de um clone contendo um promotor de reconhecimento da RNA polimerase de *Escherichia coli*.

O primeiro clone infeccioso de tobrovírus foi produzido por Hamilton & Baulcombe, (1989) para a espécie TRV (isolado SYM) somente para o segmento genômico do RNA1. O plasmídeo utilizado foi o pPM1 (Ahlquist & Janda, 1984) com os promotores T4, T7 e SP6. Após a síntese dos transcritos as plantas de *N. tabacum* cv. 'Samsun' foram inoculadas e 15 minutos após a inoculação amostras foliares foram coletadas para a análise por Northern blotting do segmento genômico do RNA1 (Hamilton & Baulcombe, 1989). No mesmo ano Angenent *et al.* (1989) construíram o clone infeccioso para o segmento genômico RNA2 de TRV (isolado PLB). Para a análise da infectividade foi utilizado a pseudo-recombinação com o segmento do RNA1 de TRV isolado PBL (Hamilton & Baulcombe, 1989) demonstrando alta infectividade e um alto potencial para a utilização destes clones como vector para a expressão de material genético em células vegetais. Mais tarde, foram produzidos com sucesso clones infecciosos para o RNA1 e RNA2 dos tobrovírus TRV e PEBV (MacFarlane *et al.*, 1991, MacFarlane *et al.*, 1992; Hernandez *et al.*, 1995; MacFarlane *et al.*, 1996) utilizando a produção dos transcritos *in vitro*. Para a espécie PepRSV não há nenhum clone infeccioso produzido.

Uma estratégia alternativa foi desenvolvida para a inoculação de clones de vírus de planta (Herrera-Estrella *et al.*, 1983; Zambryski *et al.*, 1983). Esta estratégia tem como característica a facilidade de inoculação, não necessitando da síntese de transcritos. Esta técnica é denominada agroinoculação e consiste na inoculação do cDNA (genoma completo) sob o comando do promotor 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e um terminador de nopalina sintase (TNos). A sequência viral (genoma completo) é flanqueada pela região do T-DNA (Figura 1.5) de um vetor binário. A inoculação consiste na introdução dessa construção em células de *Agrobacterium tumefaciens* que posteriormente serão transferidas para dentro das células das plantas. Isso resulta na transcrição do genoma viral dentro da célula estabelecendo a infecção viral (Hellens & Mullineaux, 2000). Vetores binários

apresentam a capacidade de se multiplicar tanto em bactérias (*E. coli*) como em agrobactéria (*A. tumefaciens*) e são geralmente maiores que 10 kb (Murai, 2013).



**Figura 1.5:** Representação dos plasmídeos de *A. tumefaciens* necessários para a agroinoculação: plasmídeo Ti helper e o vetor binário contendo a região do T-DNA e a região de inserção do genoma viral. Legenda: LB: Left border; RB: Right border, GFP: proteína de fluorescência verde; oriV: origem de replicação em *A. tumefaciens*, oriC: origem de replicação em *E. coli*, res: gene de resistência ao antibiótico canamicina, pro: proteína de interesse para expressão em planta; T-DNA: região que integra no genoma da planta.

A produção de clones de cDNA infecciosos de vírus de RNA é uma importante ferramenta utilizada para a compreensão da interação vírus hospedeiro (reprodução dos sintomas) e estudos básicos de replicação viral.

### 1.2.8 Tobravírus como vetores de expressão ou indutores de silenciamento gênico

O desenvolvimento de vetores de expressão foi criado com base no segmento genômico do RNA2 de TRV e PEBV para expressar proteínas em folhas e em raízes e é utilizado em combinação com o segmento genômico do RNA1 de TRV (Macfarlane & Popovich, 2000).

Os vetores virais dos tobrovírus (TRV e PEBV) são principalmente utilizados como vetor de silenciamento gênico (Macfarlane, 2010). O silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) destaca-se como importante ferramenta para estudo da interação entre planta e

patógeno (Eamens *et al.*, 2008). A estratégia utilizada pela maioria dos pesquisadores consiste em inserir uma sequência de um gene-alvo no vetor viral (VIGS) e introduzir esta construção em plantas, visando o desencadeamento do processo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) específico do gene e avaliação do fenótipo resultante (Unver & Budak, 2009).

O estudo do mecanismo de PTGS é um tema de grande importância na atualidade, pois busca compreender qual a finalidade deste mecanismo. De acordo com inúmeros estudos o processo, basicamente, consiste na introdução de moléculas de RNA fita dupla (dsRNA) na célula. Estas moléculas são processadas pela enzima “Dicer” em pequenos RNAs interferentes (siRNAs) de aproximadamente 21-24 nucleotídeos (Tomari *et al.*, 2004). Estes siRNAs clivados pela DICER são incorporadas ao complexo de silenciamento RISC (“RNA induced silencing complex”) (Tomari *et al.*, 2004). O complexo RISC identifica e direciona a degradação dos RNAs complementares do siRNA (Hutvagner & Zamore, 2002). Acredita-se que o mecanismo de PTGS pode estar envolvido na manutenção e no funcionamento dos genes, porém, necessita-se de mais estudos para a melhor compreensão deste mecanismo.

# CAPÍTULO 2

---

---

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E SOROLÓGICA DE *PEPPER RINGSPOT VIRUS***



## CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E PRODUÇÃO DE ANTISSORO DE *PEPPER RINGSPOT VIRUS*

### RESUMO

O gênero *Tobravirus* é constituído de três espécies, *Tobacco rattle virus* (TRV), *Pea early-browning virus* (PEBV) e *Pepper ringspot virus* (PepRSV). Somente o PepRSV foi relatado no território brasileiro, sendo que até o momento são conhecidos os isolados CAM (primeiro isolado identificado e caracterizado), LAV e PIVO4, além de alguns não nomeados. Informações sobre a característica biológica, molecular e de transmissão pelo vetor nematoide desse vírus ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi avançar na caracterização de PepRSV, incluindo a produção de um antissoro policlonal contra a capa proteica viral de PepRSV que será utilizado para a determinação do círculo de hospedeiros de PepRSV isolado CAM, estudar a distribuição do vírus ao longo do tempo e em diferentes tecidos da planta infectada e avaliar a ocorrência natural de PepRSV no campo. Foi utilizado o isolado CAM para a purificação de partículas virais. A observação no microscópio eletrônico de transmissão confirmou a purificação de partículas alongadas e rígidas de dois tamanhos, típicas de tobravírus. Essas partículas foram injetadas em coelhos para a produção do antissoro policlonal. O antissoro produzido mostrou ser específico e útil para testes de detecção. O isolado CAM foi inoculado em 21 plantas-teste para a determinação do círculo de hospedeiros, com o auxílio do antissoro para a confirmação da infecção. As hospedeiras suscetíveis foram *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* ‘Samsun’, *N. tabacum* ‘TNN’, *N. rustica*, *Capsicum chinense* PI159236, *C. annuum* cv. Ikeda, *Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara, *Chenopodium quinoa* e *Gomphrena globosa*. Reação sorológica positiva foi obtida de tecidos foliares e radiculares dessas plantas. Em um teste com diferentes cultivares de tomateiro, Santa Clara, AP533, N901, U2006, Money Maker e Gaucho apresentaram plantas infectadas, enquanto somente a cultivar Viradoro não apresentou nenhuma planta infectada por PepRSV via inoculação mecânica. Uma lavoura foi visitada em Alexandre Gusmão, região do cinturão verde de Brasília, e o teste sorológico foi aplicado em amostras coletadas aleatoriamente na lavoura de tomateiro tipo grape da cultivar Sweet Heaven. Uma taxa de infecção natural de 22,5% foi observada nesta lavoura. Um novo isolado, denominado Ag1, foi coletado e incorporado ao grupo de isolados de PepRSV da UnB/Embrapa Hortaliças. Concluiu-se com esse trabalho que o isolado CAM de PepRSV infecta 16 das 21 plantas testadas, incluindo as cultivares de tomateiro Santa Clara, AP533, N901, U2006, Money Maker e Gaucho. Foi possível confirmar que PepRSV isolado CAM se transloca para o sistema radicular quando inoculado na parte aérea da planta. Foi constatada uma incidência natural de 22,5% de PepRSV em tomateiro no Distrito Federal.

**Palavras-chave:** *Tobravirus*, círculo de hospedeiros, produção de antissoro.

# BIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND ANTISERA PRODUCTION OF *PEPPER RINGSPOT VIRUS*

## ABSTRACT

The genus *Tobravirus* consists of three species, *Tobacco rattle virus* (TRV), *Pea early-browning virus* (PEBV) and *Pepper ringspot virus* (PepRSV). Only PepRSV occurs in the Brazilian territory, and three isolates CAM (first isolate identified and characterized), LAV and PIVO4 are known, together with some others not named. The biological, molecular and nematode-transmission properties of this virus is poorly known. The objective of this study was to advance in the characterization of PepRSV, including the production of a polyclonal antiserum against PepRSV coat protein, evaluate the host range of the CAM isolate of PepRSV and the virus distribution over time in different tissues of the plant, and to survey the natural occurrence of PepRSV in the field. The CAM isolate was used for the purification of viral particles. Analysis in the transmission electron microscope confirmed the successful purification of two-sized elongated and rigid particles, typical of tobnaviruses. These particles were injected into rabbits to produce the polyclonal antiserum. The obtained antisera reacted with PepRSV and it was demonstrated to be useful for detection tests. The CAM isolate was inoculated in 21 test-plants to determine the susceptible hosts, which was confirmed by serology. The susceptible hosts were *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* 'Samsun', *N. tabacum* 'TNN', *N. rustica*, *Capsicum chinense* PI159236, *C. annuum* cv. Ikeda, *Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara, *Chenopodium quinoa* and *Gomphrena globosa*. Positive serological reaction was obtained from leaf and root tissues of these plants. In a test with different tomato cultivars, Santa Clara, Viradoro, AP533, N901, U2006, Money Maker and Gaucho were infected with PepRSV, whereas only in the cultivar Viradoro no infected plant was observed after mechanical inoculation. A field was visited in Alexandre Gusmão, in the greenbelt region of Brasília, and a serological test was applied to randomly collected samples from the grape type cultivar Sweet Heaven. A natural infection rate of 22.5% was observed in this field. A new isolate, named Ag1, was collected and incorporated into the PepRSV isolates collection of UnB / Embrapa Hortaliças. It was concluded that the CAM isolate of PepRSV infects 16 within the tested 21 plants, including the tomato cultivars Santa Clara, AP533, N901, U2006, Money Maker and Gaucho. It was possible to confirm that this PepRSV isolate translocates to the root system when inoculated in the foliar part of the plant. Finally, an unexpected high incidence of PepRSV was observed in tomato plants in the Federal District.

**Keywords:** *Tobravirus*, host circle, antiserum production

## 2.1. INTRODUÇÃO

O gênero *Tobravirus* é composto de três espécies diferentes, *Tobacco rattle virus* (TRV), espécie-tipo, *Pea early-browning virus* (PEBV) e *Pepper ringspot virus* (PepRSV) (Harrison, 1973). Esses vírus apresentam partículas alongadas e rígidas em formato de bastonetes, em partículas curtas (46 a 114 nm) e longas (180 a 215 nm), com genoma constituído por RNA de fita simples, senso positivo bipartido (RNA1 e RNA2) com uma estrutura de CAP na região 5' e tRNA-like na região 3' (Offord, 1966).

O RNA1 codifica proteínas que são essenciais para a replicação viral, sendo codificadas pela ORF1 a pequena e a grande subunidade da replicase de 134 kDa (TRV), 141 kDa (PEBV) e 136 kDa (PepRSV). O gene 1a codifica uma proteína de 29 kDa (TRV e PepRSV) e 30 kDa (PEBV), que exerce a função de movimento célula-a-célula, e o gene 1b codifica uma proteína rica em cisteína de 16 kDa (TRV) e 12kDa (PepRSV e PEBV) (Macfarlane, 2010). O RNA 2 é responsável por codificar a proteína capsidial (CP) e as proteínas não estruturais 2b e 2c que são essenciais para a transmissão por nematoides (Macfarlane, 2010).

A transmissão dos tobravírus pode ser horizontal (mais frequente) ou vertical (menos frequente). A transmissão horizontal é mediada por nematoides dos gêneros *Trichodorus* e *Paratrichodorus* (Van Hoof, 1964). Espécies destes gêneros caracterizam-se por serem ectoparasitas e vetores naturais de vírus de plantas (Sol *et al.*, 1960). A transmissão vertical é mediada por sementes, cuja taxa pode variar dependendo da espécie botânica; por exemplo, sabe-se que PEBV tem uma frequência de transmissão por sementes de 1-2% em ervilha (Harrison & Robinson, 1986). O vírus PepRSV foi relatado como capaz de ser transmitido por 15 a 30% das sementes de tomateiro infectado (Costa & Kitajima, 1968). Além disso, partículas virais de TRV foram observadas em tecidos do ovário e da antera em

plantas de tabaco e pimentão, demonstrando uma transmissão natural através dos grãos de pólen (Otulak *et al.*, 2015).

A distribuição geográfica dos vírus do gênero *Tobravirus* é bastante variada. O TRV é uma espécie com ampla distribuição e responsável por prejuízos significativos na produção, principalmente em cultivo de batata na Europa (Dale *et al.*, 2000), mas pode infectar fumo, plantas ornamentais, pimentão e tomate em regiões de clima temperado e tropical (Macfarlane, 1999). No Brasil, o TRV é considerado como uma praga quarentenária ausente (A1) (Mapa, 2016). PEBV é encontrado na região norte da Europa e norte da África, podendo infectar diversas leguminosas, entre elas a ervilha, causando sintomas de escurecimento e enrugamento severo no tegumento da semente e grandes perdas na produção (Boulton, 1996).

O vírus PepRSV é descrito somente no Brasil, causando sintomas de faixa amarela e anéis cloróticos e necróticos em folhas de *S. lycopersicum*, *C. annuum*, *Columnea* sp., *Cynara scolymus*, *N. tabacum*, *S. tuberosum*, *Pogostemon patchuli* e *Gerbera hybrida* (Costa & Kitajima, 1968; Chagas & Silberschmidt, 1972; Gama *et al.*, 1983; Chagas *et al.*, 1987; Cupertino *et al.*, 1991; Kitajima *et al.*, 1991). Três isolados de PepRSV são conhecidos (CAM, Pivo4 e LAV), sendo o CAM o primeiro isolado brasileiro caracterizado e sequenciado, além de outros isolados não nomeados (Kitajima *et al.*, 1969; Bergh *et al.*, 1985; Cupertino *et al.*, 1991). Os isolados Pivo4 e LAV foram coletados em 2012 na região de Luziânia – GO (Batista *et al.*, 2014).

A ocorrência de PepRSV nas plantações de tomateiro no Brasil não é frequente e a sua detecção é dificultada pela falta de um antissoro específico e sensível. O recente relato de isolados de PepRSV em tomateiro (Batista *et al.*, 2014) sugere que o vírus pode estar ocorrendo de forma despercebida em várias regiões de produção de tomate. A produção de um antissoro específico para PepRSV pode contribuir para o conhecimento da importância e

distribuição desse vírus em território nacional. Além da utilização do antissoro como ferramenta de detecção, este pode ser extremamente útil para o estudo da interação vírus-planta-vetor, como nas análises do processo de infecção ao longo do tempo e da planta. Em uma infecção por PepRSV, sabe-se que os sintomas da infecção por esse vírus podem desaparecer das folhas com o decorrer do tempo (dados não publicados). Entretanto, acredita-se que o vírus permanece presente no sistema radicular, pois o agente vetor é um nematoide que pertence à família *Trichodoridea*. Nesse caso, a detecção sorológica do vírus poderia esclarecer essa questão com facilidade.

Este trabalho tem como objetivo aprofundar o conhecimento sobre PepRSV e sua interação com a planta. Para tanto, este estudo visou produzir um antissoro policlonal contra a partícula viral de PepRSV que será utilizado para determinar o círculo de hospedeiros de PepRSV isolado CAM, detectar o PepRSV isolado CAM no hospedeiro ao longo do tempo; detectar partículas de PepRSV isolado CAM nas células e tecido do hospedeiro e avaliar a ocorrência natural de PepRSV no campo.

## **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular do Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPq- Embrapa Hortaliças) localizado no Distrito Federal.

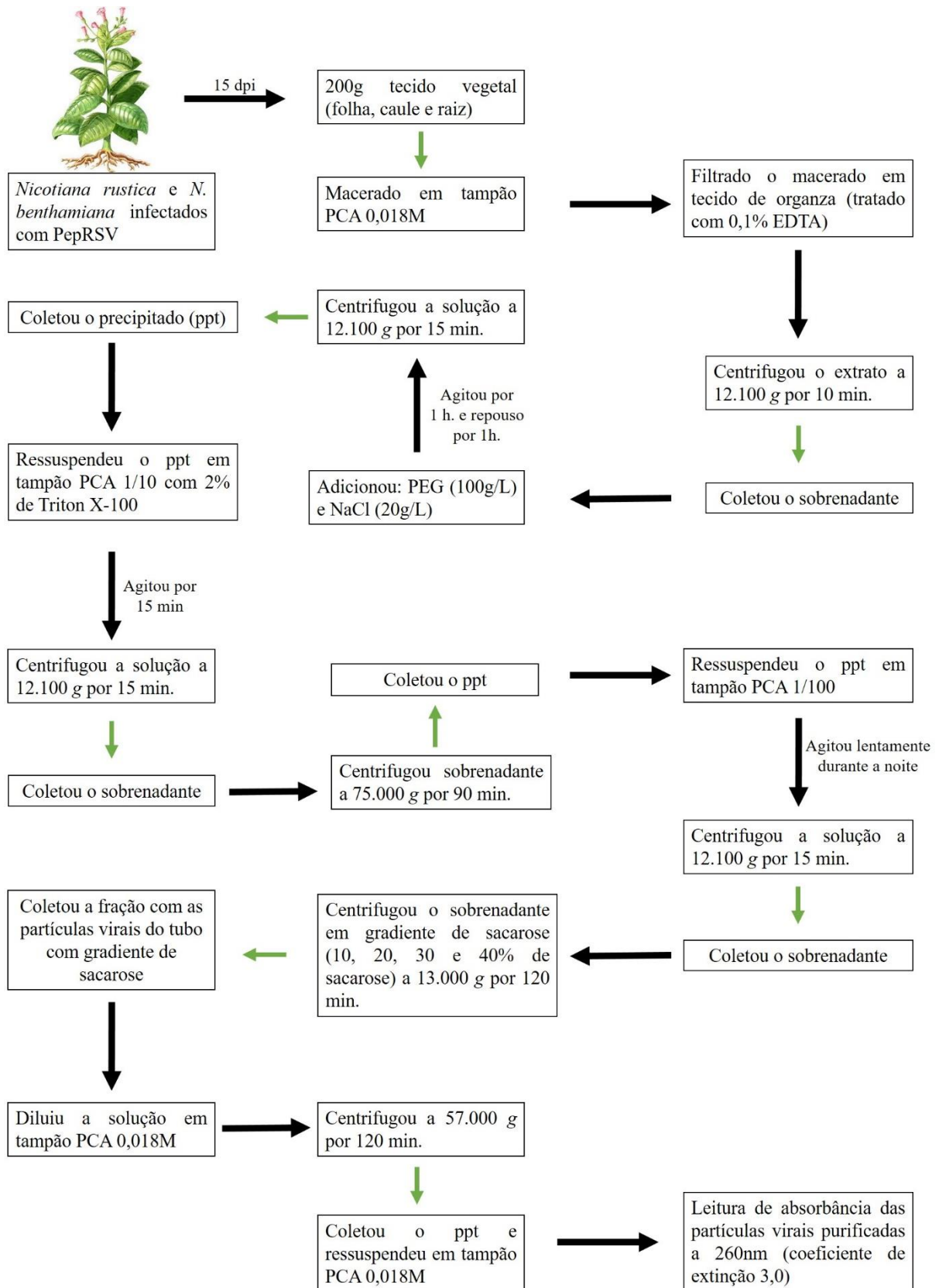
### **2.2.1 Origem e manutenção do Isolado**

O isolado CAM de PepRSV foi fornecido pelo Prof. Dr. José Osmar Gaspar (São José do Rio Preto/UNESP) para a realização deste trabalho, sendo o primeiro isolado de PepRSV identificado no Brasil. Este isolado foi coletado em São Carlos – SP no ano de 1960 e foi mantido na UNESP em plantas vivas em casa de vegetação (com seguidas inoculações mecânicas). O isolado CAM recebido para a realização do trabalho foi mantido em casa de vegetação em plantas de *N. tabacum* ‘Samsun’, *N. tabacum* ‘TNN’ e congelado a -80°C.

### **2.2.2 Purificação de partícula viral**

Plantas de *Nicotiana rustica* e *N. benthamiana* foram inoculadas mecanicamente com o isolado CAM para a purificação de partícula viral. Foram utilizadas aproximadamente 120 plantas de cada espécie para cada procedimento de purificação.

O protocolo de purificação foi adaptado de Nixon & Harrison (1959) e foi realizado três vezes para obtenção da quantidade de partículas necessárias (0,17 mg por injeção) para a produção do antissoro policlonal. Para o procedimento de purificação de partículas virais foram necessários aproximadamente 200g de tecido vegetal fresco (folha, caule e raiz), coletados 15 dias após a inoculação com PepRSV (isolado CAM). O tampão utilizado no procedimento de purificação foi o tampão fosfato/ ácido cítrico (PCA) 0,018M, pH 7,0 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M, Citrato 0,1M). O procedimento de purificação de partículas virais está descrito no esquema diagramático da figura 2.1.



**Figura 2.1:** Procedimento de purificação de partículas virais de PepRSV, adaptado de Nixon & Harrison (1959).

No final do procedimento, foi realizada a leitura de absorvância das partículas purificadas em espectrofotômetro a 260 nm e a concentração viral foi calculada utilizando o coeficiente de extinção de tobravírus de 3,0 (Robson & Harrison, 1985). Após medida a absorvância as partículas purificadas foram armazenadas a -80°C.

### **2.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão**

A preparação purificada foi observada em microscópio eletrônico de transmissão (MET), no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília. Para analisar no MET foram necessários 10 µL da preparação purificada em 50 µL de ácido fosfotungstíco (PTA) 2 %, formando uma gota. Em seguida duas telas de cobre recobertas com Formvar/carbono foram colocadas sobre a gota e incubadas por um minuto. Após esse período, as telas foram removidas e secas com papel-filtro. As telas foram submetidas a tratamento de vácuo por 30 minutos e posteriormente visualizadas no MET (Modelo: JEOL JEM 1011)

### **2.2.4 Produção de antissoro policlonal**

As partículas purificadas (item 2.2.2) foram utilizadas para a produção do antissoro policlonal específico para a CP do PepRSV. O antissoro foi produzido com a imunização em dois coelhos, através de aplicações subcutâneas das partículas virais purificadas (emulsificadas com adjuvante completo de Freund's na primeira injeção e adjuvante incompleto a partir da segunda) no dorso do coelho. Foram realizadas quatro injeções para a imunização, sendo uma injeção a cada três semanas. Cada injeção foi realizada com 0,17 mg de partículas virais.

A coleta de sangue foi realizada uma vez por semana após a última imunização através de uma pequena perfuração nas orelhas dos coelhos. Este procedimento foi repetido por sete vezes, retirando aproximadamente 15 mL por coleta. Após a coleta, o sangue foi



mantido a 37°C por 1 hora e refrigerado a 4°C por 15 a 20 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação de 10.000 g por 8 minutos e coleta do sobrenadante que corresponde ao antissoro bruto e a eliminação do precipitado que é a fração coagulada. O antissoro bruto foi armazenado a -20°C para posterior teste de dot-ELISA para verificar a eficiência do antissoro bruto produzido.

Para a purificação da imunoglobulina G (IgG) do antissoro bruto, 1 mL do antissoro bruto e 1 mL de macerado de plantas sadias pré-tratado em água fervente por 10 minutos (eliminar as proteases) foram misturados e incubados por 4 h. Essa solução foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos. Ao sobrenadante coletado foi adicionado 8 mL de água destilada autoclavada. A esta mistura foi adicionada gota a gota sulfato de amônio saturado com água, totalizando 10 mL. Essa solução foi mantida por 4 h. a 4°C para precipitação das proteínas. A solução foi centrifugada a 10.000 g por 20 minutos, o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de ½ X PBS (PBS 10 X = 1,4 M NaCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM NaHPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 2 mM KCl, pH 7,4). A solução foi dialisada três vezes em 500 mL de ½ X PBS, pH 6,5, de 2 a 16 horas. Após a diálise, a imunoglobulina foi submetida a uma coluna de DEAE-Sephacel (Ion-exchange, SIGMA ALDRICH). O IgG foi coletado e submetido a leitura de absorbância a 280 nm. O IgG foi diluído para a concentração final de 1mg/mL em PBS e armazenado a - 20°C.

Após a purificação do IgG, foram realizados os testes sorológicos para avaliar a eficiência do IgG para o uso como técnica de diagnose.

### **2.2.5 Círculo de hospedeiros**

Para cada espécie do ensaio de círculo de hospedeiros foram utilizadas quatro plantas sendo três delas inoculadas com PepRSV (CAM) e uma inoculada somente com tampão de inoculação (controle negativo), com três repetições.

A inoculação mecânica do isolado CAM foi realizada utilizando extrato de folhas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e sulfito de sódio a 0,01 M. Para a determinação do círculo de hospedeiras, 21 plantas de três famílias botânicas foram inoculadas com o isolado CAM (Tabela 2.1). As plantas foram polvilhadas com Carborundum 600 mesh (abrasivo), para a formação de micro ferimentos que permitem a entrada das partículas virais no tecido vegetal. Após a inoculação, as plantas foram lavadas com água corrente. As plantas-controle foram inoculadas somente com o tampão de inoculação. As plantas inoculadas foram mantidas na casa de vegetação para a avaliação dos sintomas durante 30 dias. As avaliações foram realizadas uma vez por semana, totalizando seis semanas.

**Tabela 2.1:** Plantas utilizadas na determinação do círculo de hospedeiros.

<b>Família</b>	<b>Espécie</b>
Solanaceae	<i>Datura metel</i>
	<i>D. stramonium</i>
	<i>Nicandra physaloides</i>
	<i>Nicotiana benthamiana</i>
	<i>N. tabacum</i> ‘Samsun’
	<i>N. tabacum</i> ‘TNN’
	<i>N. rustica</i>
	<i>Capsicum chinense</i> PI159236
	<i>C. annuum</i> cv. Ikeda
	<i>Physalis pubescens</i>
	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Santa Clara
	<i>S. lycopersicum</i> cv. Viradoro
	<i>S. lycopersicum</i> cv. AP533
	<i>S. lycopersicum</i> cv. N901
<i>S. lycopersicum</i> cv. U2006	
<i>S. lycopersicum</i> cv. Money Maker	
<i>S. lycopersicum</i> cv. Gaucho	
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>
	<i>C. amaranticolor</i>
	<i>C. murale</i>
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>

Em cada avaliação, foi realizada a coleta da terceira folha mais jovem e somente na 6<sup>o</sup> semana foram coletadas as raízes das plantas inoculadas, e os sintomas foram analisados e registrados para todas as plantas do ensaio. Para a confirmação da infecção sistêmica foi realizado o teste sorológico de dot-ELISA (item 2.2.6) utilizando o antissoro anti-CP produzido (item 2.2.4), técnica de baixo custo e eficiente para teste de detecção. Esse ensaio foi repetido três vezes com coleta semanal em todas as plantas do ensaio.

Após a determinação do círculo de hospedeiras, foi realizado o estudo da distribuição de PepRSV no tecido foliar e radicular utilizando a detecção por método sorológico de dot-ELISA, durante quatro semanas após a inoculação.

### **2.2.6 Dot-ELISA**

Amostras foliares e radiculares de plantas inoculadas foram trituradas em tampão 1X TBS (Tris-base 0,02 M, NaCl 0,05 M, pH 7,5) na proporção 1:10 e 5 µL aplicados em membrana de nitrocelulose (Millipore Immobilon NC, 0,45µm). As membranas foram submetidas ao processo de secagem por 20 minutos, seguida de armazenamento na geladeira ou imediatamente processadas. Inicialmente, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora (tampão 1X TBS, 3% de leite em pó desnatado) por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação constante. Após isso, foi adicionada à solução o antissoro policlonal (item 2.2.4) na concentração de 1mg/mL, diluído 1:1000 (v:v), e foi incubada durante a noite sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com tampão 1X TBS + 0,1% tween-20, sob agitação. Após as lavagens, a membrana foi incubada com solução contendo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate, Sigma) diluído 1:30000 (v:v) em tampão 1X TBS, por 4 horas, sob agitação constante, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente três vezes com tampão 1X TBS + 0,1% tween-20. A interação antígeno-anticorpo foi detectada adicionando o tampão de revelação alcalino (100 mM NaCl + 100

mM Tris-base + 5 mM MgCl<sub>2</sub>(6H<sub>2</sub>O), pH 9,5), 0,165 mg/mL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil, Sigma) e 0,33 mg/mL de NBT (nitro blue tetrazolium chloride, Sigma) (Bollag & Edelstein, 1991). A membrana foi incubada nesta solução em condição de pouca luminosidade (escuro), sob agitação lenta, por 10 a 15 minutos, incubada em água para parar a reação e em seguida a membrana foi examinada.

Para avaliar a eficiência e especificidade do antissoro bruto anti-CP de PepRSV produzido foi utilizado o teste de dot-ELISA. Foi utilizado o antissoro bruto da 1<sup>o</sup> a 4<sup>o</sup> sangria dos coelhos (A e B) e o antígeno (partículas de PepRSV purificadas) foi diluído em 1/10, 1/100 e 1/1000.

### **2.2.7 Imunomarcção**

Plantas de *N. benthamiana* e *N. tabacum* cv. Samsun foram inoculadas com PepRSV isolado CAM. Duas semanas após a inoculação, as plantas infectadas foram submetidas ao procedimento de imunomarcção. Foram feitos cortes histológicos (utilizando lâminas cortantes, com espessura de 0,15 mm) em raízes e em folhas com sintomas de infecção e em seguida esses cortes foram transferidos para microtubos (1,5 mL) e fixados com 500µL de solução de fixação PFA (paraformaldeído 3% e glutaraldeído 0,1%). Após a fixação, os microtubos (contendo os cortes histológicos de folhas ou raízes) foram transferidos para uma câmara e submetidos ao vácuo por 10 minutos. Os cortes histológicos vegetais fixados foram lavados duas vezes com 1mL de tampão 1X PBS sob agitação à temperatura ambiente. Após as lavagens, os tecidos vegetais em cortes histológicos foram submetidos ao tampão de bloqueamento (tampão 1X PBS, 5% BSA), sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes histológicos foram lavados três vezes com 1mL de tampão 1X PBS por 5 minutos, sob agitação. Após as lavagens, foi adicionado no microtubo contendo o tecido vegetal o antissoro policlonal (IgG concentração 1mg/ml) produzido contra capa proteica (CP) de PepRSV na concentração final de 1mg/200ml (v:v)

em 1mL de tampão 1X PBS, 0,1% tween-20 por 4 horas, sem agitação, à temperatura de 4°C. Após o período de incubação, o tecido vegetal foi lavado três vezes em tampão 1X PBS, 0,1% tween-20 por 5 minutos sob agitação. Após isso, adicionou no microtubo com tecido vegetal uma solução contendo o anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Thermo Fisher, Immunofluorescence (IF)) como foi realizado em tecido vegetal foi diluído em 1:1000 (v:v) em tampão 1X PBS, 0,1% tween-20, por 2 horas, sob agitação constante, à temperatura ambiente. O tecido vegetal em cortes histológicos foi novamente lavado uma vez com tampão 1X PBS + 0,1% tween-20. O complexo antígeno-anticorpo foi detectado nos cortes histológicos através da incubação em tampão de revelação alcalino e os reagentes BCIP e NBT (descritos no método de dot-ELISA, item 2.2.6) mantidos por 15 a 20 minutos. O tecido vegetal foi lavado com tampão 1X PBS, 0,1% tween-20 para retirar o excesso do substrato.

Após o tratamento com o IgG anti-CP, todas as amostras de tecido vegetal em cortes histológicos foram examinadas no microscópio confocal a laser (Confocal scanning = Leica TCS SP5). Nesse experimento, utilizou-se seis amostras sendo duas de raízes, duas de folhas e dois controles negativos para cada espécie de planta *N. benthamiana* e *N. tabacum* cv. Samsun. As plantas de *N. benthamiana* não inoculadas foram utilizadas como controle negativo. Esse ensaio foi repetido três vezes com o mesmo número de amostras.

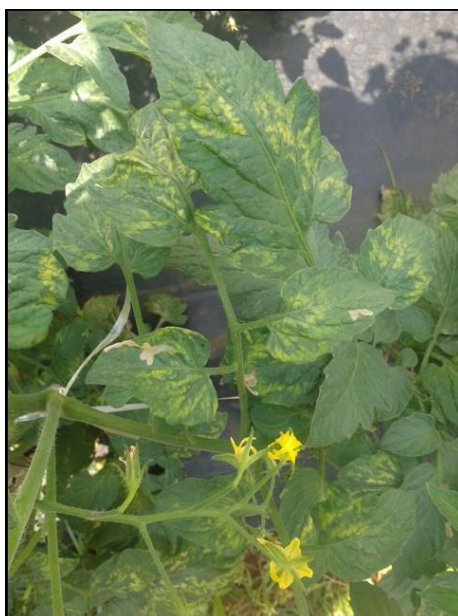
#### **2.2.8. Teste sorológico com outros isolados de PepRSV**

Dois outros isolados de PepRSV foram utilizados: LAV e Ag1. O isolado LAV foi coletado em Luziânia, Goiás, no ano de 2012 em tomateiro rasteiro com sintomas de anéis cloróticos nas folhas mais velhas (Batista *et al.*, 2014). O isolado Ag1 foi coletado em Alexandre Gusmão, Distrito Federal, no ano de 2016 em plantas de tomateiro grape estaqueado com sintomas característicos de faixas e anéis cloróticos (Figura 2.2). Estes isolados foram inoculados mecanicamente em plantas de *S. lycopersicum* cv. Santa Clara e o

tecido de plantas infectadas armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  no CNPH. Foi utilizada a técnica de dot-ELISA (item 2.2.6) para a avaliação da reação do antissoro anti-CP com esses isolados de PepRSV.

### 2.2.8. Estudo preliminar da incidência de PepRSV no campo

Duas lavouras foram avaliadas quanto à porcentagem de plantas infectadas por PepRSV. As lavouras estavam localizadas em Alexandre Gusmão, Distrito Federal e as coletas foram realizadas no mês de novembro de 2016. A coleta foi realizada de forma aleatória em uma área com plantio de tomateiro grape em estágio final de frutificação (40 amostras) e em uma área com tomateiro grape em estágio vegetativo (20 amostras). O teste sorológico de dot-ELISA com o antissoro anti-CP foi utilizado para a detecção de PepRSV nas amostras (item 2.2.6).



**Figura 2.2:** Sintomas de anéis e faixas cloróticas em *S. lycopersicum* infectada com PepRSV isolado Ag1, coletado em Alexandre Gusmão, Distrito Federal.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Manutenção do isolado CAM

Plantas de *S. lycopersicum* cv. Santa Clara inoculadas com o extrato foliar de planta infectada com PepRSV isolado CAM apresentaram o sintoma típico de faixas e anéis cloróticos nas folhas (Figura 2.3). As plantas sintomáticas foram mantidas na casa de vegetação e parte das folhas foi armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 2.3:** Planta de tomateiro cv. Santa Clara infectada com o isolado CAM e exibindo sintomas de anéis e faixas cloróticas

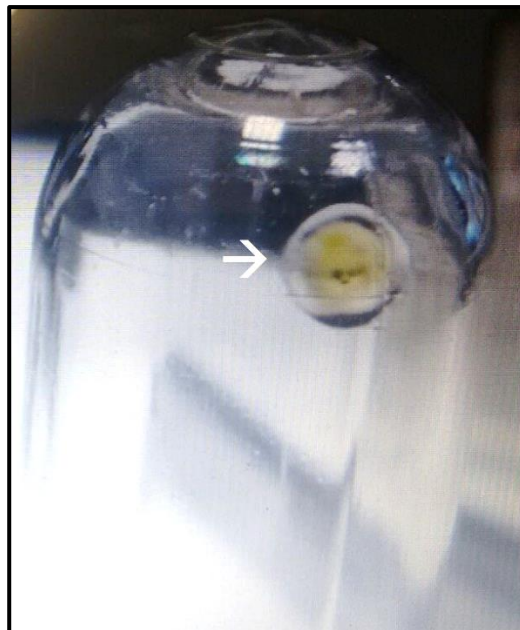
### 2.3.2 Purificação de partículas virais e análise em microscópio eletrônico de PepRSV isolado CAM

Para a produção do anticorpo específico anti-CP de PepRSV foi realizada a purificação de partículas de PepRSV (isolado CAM). Durante o procedimento de purificação foi observado após a centrifugação em gradiente de sacarose uma banda difusa na metade superior do gradiente. Como as partículas de PepRSV apresentam dois tamanhos, sendo de partícula curta e longa, acredita-se que a banda difusa foi devido à diferença do

tamanho das partículas (Figura 2.4). A banda difusa foi coletada e submetida a uma nova ultracentrifugação, o precipitado formado após a ultracentrifugação apresentou aspecto gelatinoso (Figura 2.5).



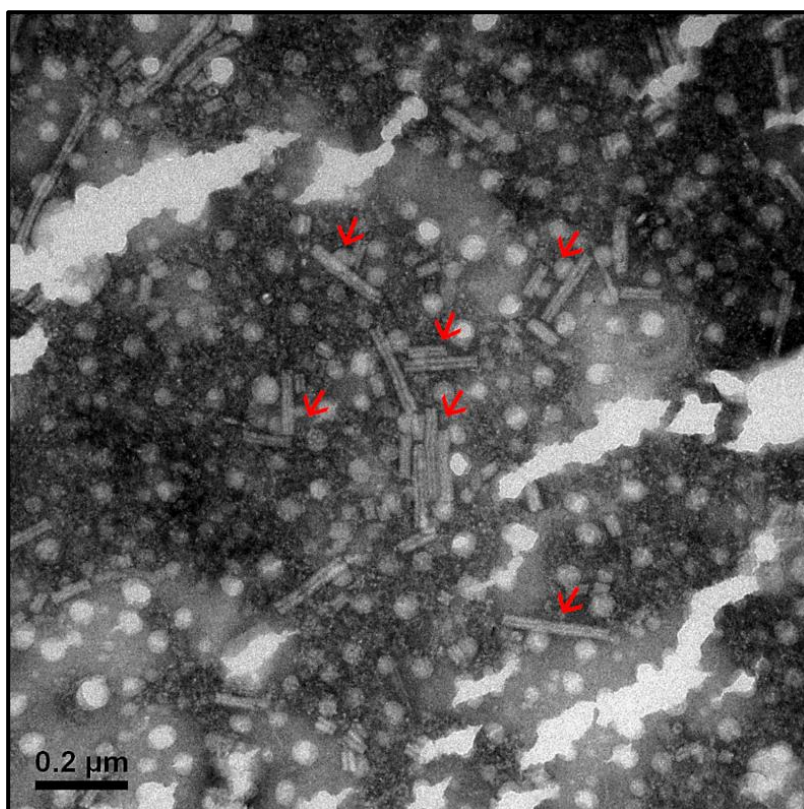
**Figura 2.4:** Tubo de centrifuga com gradiente de sacarose, exibindo porção mediana da solução turva e indicando a presença de partículas virais



**Figura 2.5:** Precipitado do processo de purificação da partícula viral após a última etapa de ultracentrifugação. Setas indicam precipitados de partículas de PepRSV purificadas.



Após a purificação de partículas, o purificado foi submetido a análise em MET para confirmar a presença de partículas virais e observar suas características morfológicas. As preparações virais purificadas de PepRSV isolado CAM foram observadas na forma de partículas tubulares e rígidas (Figura 2.6). Essa preparação foi utilizada para a produção do antissoro de PepRSV.

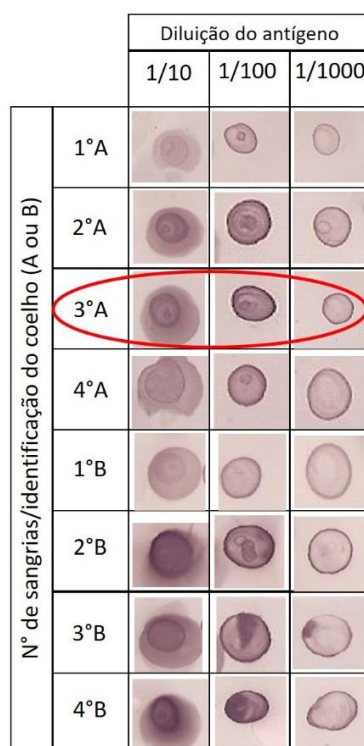


**Figura 2.6:** Micrografia eletrônica de transmissão da preparação purificada de PepRSV isolado CAM contrastada com ácido fosfotúngstico 2 %. (Foto: Tatsuya Nagata).

### 2.3.3 Antissoro

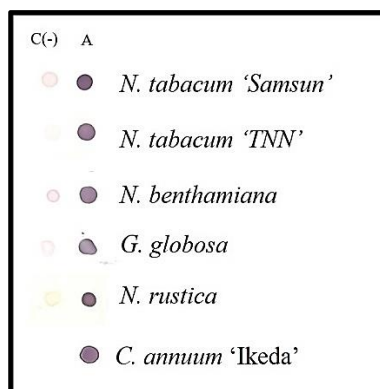
Foram realizadas três purificações de partículas virais obtendo-se 1,785 mg de preparação purificada, que foram divididas em quatro injeções em dois coelhos com 0,17 mg por coelho. As partículas virais purificadas (item 2.3.2) foram injetadas em dois coelhos (coelho A e B) para a produção de antissoro policlonal de PepRSV anti-CP. Avaliou-se a reatividade e a sensibilidade do antissoro produzido pelo coelho A e B por dot-ELISA com

diferentes diluições do vírus purificado (1/10; 1/100; 1/1000) (Figura 2.7). O resultado demonstra que os antissoros de todas as sangrias (1 a 4) dos dois coelhos apresentaram reações positivas com as diluições do antígeno de 1/10 e 1/100, porém fracas na diluição 1/1000. A sangria selecionada para ser utilizada nos testes de dot-ELISA foi a 3<sup>o</sup> sangria do coelho A, apesar que outros lotes poderiam ser usados por apresentar respostas semelhantes (Figura 2.7).



**Figura 2.7:** Dot-ELISA de diferentes sangrias dos dois coelhos A e B. A preparação purificada de partículas de PepRSV foi diluída 1/10; 1/100 e 1/1000. A marcação em vermelho representa a sangria escolhida para a continuação dos trabalhos.

Como foi observada uma fraca reação não específica em extrato de planta sadia (dados não mostrados), o antissoro bruto produzido foi submetido a tratamento com extrato bruto de planta sadia e o IgG purificado. A ausência de reação do IgG purificado com extrato de planta sadia foi confirmada em teste dot-ELISA (Figura 2.8).



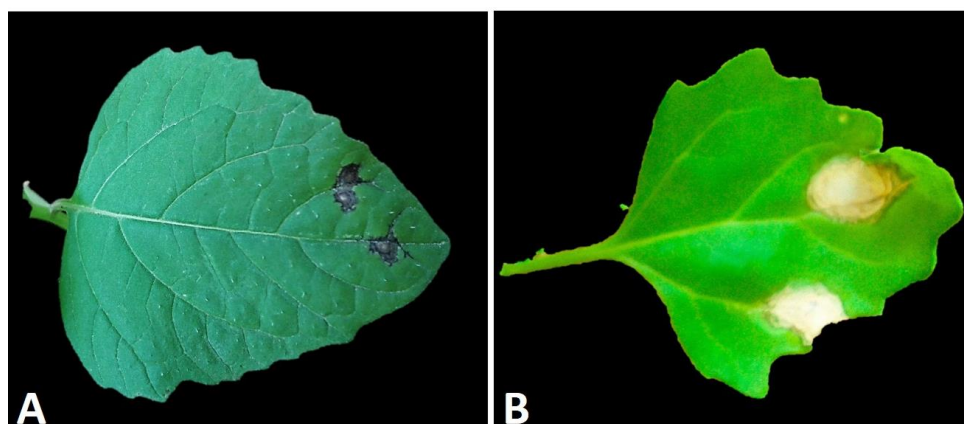
**Figura 2.8:** Teste de dot-ELISA para avaliar a especificidade e eficiência do IgG purificado de PepRSV com detecção de PepRSV (isolado CAM) em diferentes hospedeiras inoculadas. A letra C (-) controle negativo, representando as plantas sadias (não inoculadas); A: representa as amostras da 3<sup>o</sup> folha mais jovem (não inoculada) das plantas inoculadas com PepRSV isolado CAM.

### 2.3.4 Círculo de hospedeiros

No ensaio de círculo de hospedeiros, as plantas de *D. stramonium*, *D. metel* e *Physalis pubescens* não apresentaram sintomas. Em teste sorológico, somente uma planta de *D. stramonium* apresentou reação positiva com antissoro anti-CP de PepRSV pelo teste sorológico dot-ELISA nas folhas e raízes, durante o período de seis semanas (42 dias) (Tabela 2.2). Isso indica que as plantas *D. metel* e *Physalis pubescens* não foram suscetíveis à infecção por PepRSV isolado CAM e *D. stramonium* permitiu a multiplicação de PepRSV embora a planta infectada não tenha mostrado sintomas da infecção.

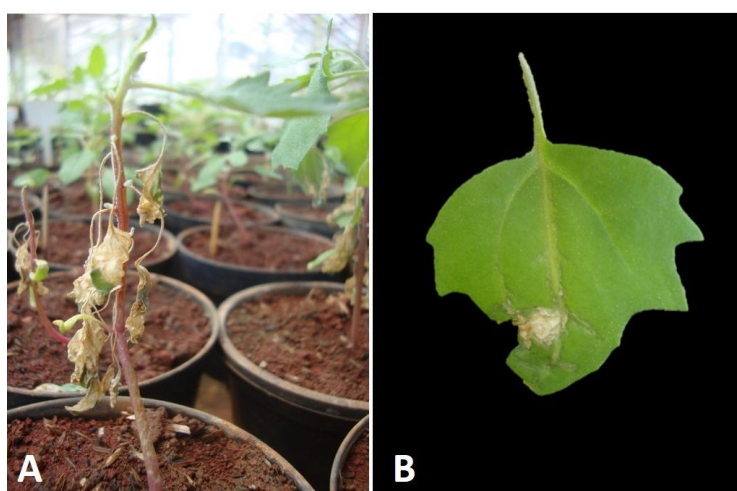
As espécies *N. physaloides* e *C. murale* apresentaram sintomas de lesão local, isto é, apenas nas folhas inoculadas (Figura 2.9). A detecção por dot-ELISA nas folhas não inoculadas confirmaram que *N. physaloides* não é infectado sistemicamente por PepRSV. Em contraste, em duas amostras de *C. murale* houve detecção de PepRSV em folhas superiores. Acredita-se que houve um erro no momento da coleta das folhas não inoculadas. É possível que folhas inoculadas foram acidentalmente coletadas nessas duas plantas com reação positiva, devido ao crescimento foliar lento desta hospedeira. O ensaio precisa ser

repetido para essa planta em vista da dúvida que persiste se essa planta é sistemicamente infectada.



**Figura 2.9:** Plantas de *N. physaloides* (A) e *C. murale* (B) inoculadas com PepRSV (isolado CAM) e com sintomas de lesões necróticas locais.

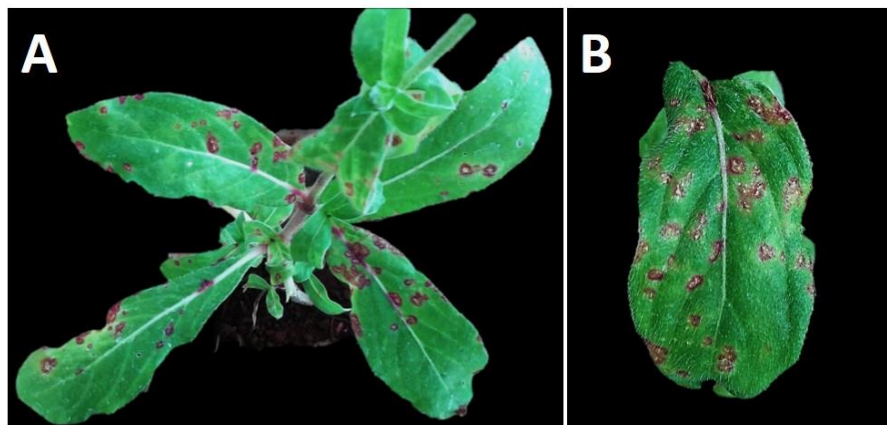
As plantas de *C. quinoa* apresentaram sintomas sistêmicos de lesão local necrótica em folhas não inoculadas. Neste caso, as lesões necróticas evoluíram rapidamente e muito frequentemente resultaram na morte da folha com sintomas e da planta inoculada, dificultando a coleta de amostras foliares. No teste sorológico, três plantas apresentaram resultado positivo em folhas não inoculadas (Tabela 2.2 e figura 2.10).



**Figura 2.10:** Plantas de *C. quinoa* (A, B) com sintoma de lesão local necrótica causado por PepRSV (isolado CAM).

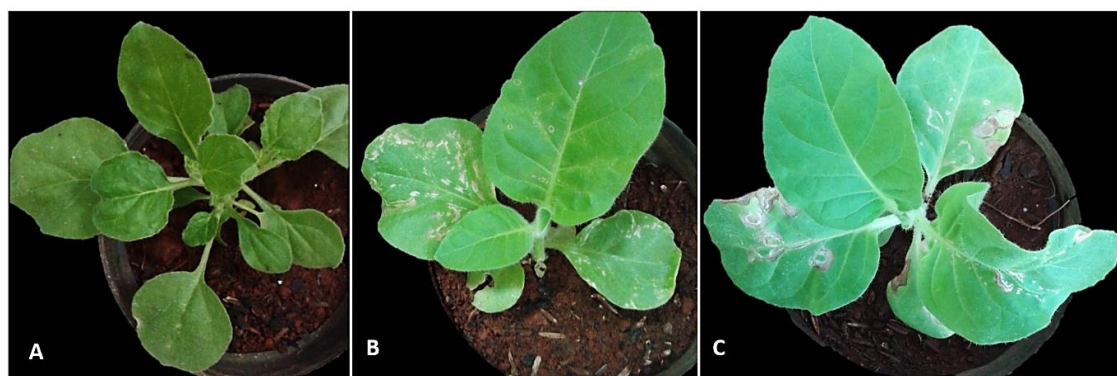
*G. globosa* (Figura 2.11) mostrou ser um excelente hospedeiro para PepRSV quando comparada com outras hospedeiras testadas. Os sintomas de anéis necróticos com halo

vermelho nas lesões foram observados a partir da primeira semana (7 dias) de inoculação em folhas inoculadas e não inoculadas, sempre com a formação de claras lesões necróticas com halo avermelhando.



**Figura 2.11:** Plantas de *G. globosa* (A, B) com sintoma de anel necrótico causado por PepRSV isolado CAM.

As plantas de *N. benthamiana*, *N. tabacum* ‘Samsun’, *N. tabacum* ‘TNN’ apresentaram 85,7% (Tabela 2.2) das plantas inoculadas com sintomas sistêmicos de bolhosidade em *N. benthamiana* e anéis necróticos nas plantas *N. tabacum* ‘Samsun’, *N. tabacum* ‘TNN’ (Figura 2.12). A infecção nessas plantas com sintomas foi confirmada por reação de dot-ELISA.



**Figura 2.12:** Plantas inoculadas com PepRSV isolado CAM. A: *N. benthamiana*; B: *N. tabacum* ‘Samsun’; C: *N. tabacum* ‘TNN’. Sintomas de leve bolhosidade em *N. benthamiana* e anéis necróticos nas plantas *N. tabacum* ‘Samsun’ e *N. tabacum* ‘TNN’ podem ser observados.



**Tabela 2.2:** Teste de inoculação de plantas-teste com PepRSV isolado CAM

<b>Família</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nºinfectado/ Nºinoculado</b>	<b>Sintomas (FI e FNI)</b>	<b>Deteccão Dot-Elisa em FNI</b>
<b>Solanaceae</b>	<i>Datura metel</i>	0/14	-	0/14
	<i>D. stramonium</i>	0/14	-	1/14
	<i>Nicandra physaloides</i>	14/14	LL	0/14
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	12/14	B	12/14
	<i>N. tabacum</i> ‘Samsun’	12/14	AN	12/14
	<i>N. tabacum</i> ‘TNN’	12/14	AN	12/14
	<i>N. rústica</i>	7/14	B	7/14
	<i>Capsicum chinense</i> PI159236	1/11	N, ACI	1/11
	<i>C. annuum</i> ‘Ikeda’	5/14	ACI	5/14
	<i>Physalis pubescens</i>	0/14	-	0/14
	<i>S. lycopersicum</i> cv. Santa Clara	7/14	ACI	7/14
<b>Chenopodiaceae</b>	<i>Chenopodium quinoa</i>	14/14	LN	3/14
	<i>C. amaranticolor</i>	14/14	LL	0/14
	<i>C. murale</i>	14/14	LL	2/14
<b>Amaranthaceae</b>	<i>Gomphrena globosa</i>	7/14	AN	7/14

FI: folha inoculada e FNI: folha não inoculada; (-): sem sintoma; LL: lesão local; LN: lesão necrótica B: bolhosidade; AN: anel necrótico; N: necrose; ACI: anel clorótico

Além de avaliar diferentes hospedeiras indicadoras, foram realizados dois ensaios de avaliação de infecção de PepRSV isolado CAM em diferentes cultivares de tomateiro que são plantados no território brasileiro. Para cada ensaio, inoculou-se cinco plantas de cada cultivar. O teste de detecção foi realizado uma e duas semanas após a inoculação.

As cultivares de tomateiro inoculadas que apresentaram sintomas de anéis cloróticos foram Santa Clara, AP533, N901, U2006, Money Maker e Gaucho. Para essas cultivares, foi possível detectar o vírus após uma semana de inoculação, mas para a cultivar AP533 foi detectada somente após duas semanas (Tabela 2.3). Todas as plantas positivas para o teste de dot-ELISA apresentaram sintomas de faixa e anel clorótico, porém a severidade dos

sintomas foi variável para as cultivares. Somente a cultivar Viradoro não apresentou plantas com sintomas e com detecção positiva por sorologia, sugerindo que essa cultivar não é susceptível à infecção pelo vírus PepRSV isolado CAM (Tabela 2.3).

Os resultados da detecção por dot-ELISA de PepRSV isolado CAM em cultivares de tomateiro sugerem que a taxa de infecção nessas plantas é baixa para todas as cultivares analisadas indicando que o tomateiro não é boa hospedeira de PepRSV isolado CAM.

**Tabela 2.3:** Detecção por dot-ELISA de PepRSV isolado CAM inoculado em cultivares de tomateiro.

Família	Espécie	Detecção folhas	
		1° Semana	2° Semanas
Solanaceae	<i>S. lycopersicum</i> cv. Santa Clara	3/10	3/10
	<i>S. lycopersicum</i> cv. Viradoro	0/10	0/10
	<i>S. lycopersicum</i> cv. AP533	0/10	1/10
	<i>S. lycopersicum</i> cv. N901	1/10	1/10
	<i>S. lycopersicum</i> cv. U2006	1/10	1/10
	<i>S. lycopersicum</i> cv. Money Maker	1/10	2/10
	<i>S. lycopersicum</i> cv. Gaucho	1/10	1/10

### 2.3.5 Detecção por dot-ELISA da distribuição de PepRSV (CAM) em folha e raiz

As plantas utilizadas para este estudo foram *Datura metel*; *D. stramonium*; *Nicandra physaloides*; *N. tabacum* ‘Samsun’; *N. tabacum* ‘TNN’; *N. rustica*; *Capsicum chinense* PI159236; *C. annuum* ‘Ikeda’; *Physalis pubescens*; *S. lycopersicum* cv. Santa Clara; *Chenopodium quinoa*; *C. amaranticolor*; *C. murale*; e *Gomphrena globosa*.

O estudo da distribuição de PepRSV isolado CAM no tecido foliar e radicular foi realizado utilizando o antissoro produzido (item 2.3.4) pela técnica sorológica de dot-ELISA. Este ensaio foi realizado independente do ensaio de círculo de hospedeiros. Foram utilizadas doze plantas de cada espécie testada, sendo que a cada avaliação semanal (total de

quatro semanas) quatro plantas foram coletadas (folhas e raízes) para realizar o teste de detecção por dot-ELISA. Das quatro plantas avaliadas, três foram inoculadas com PepRSV isolado CAM e uma com tampão, como controle negativo (-).

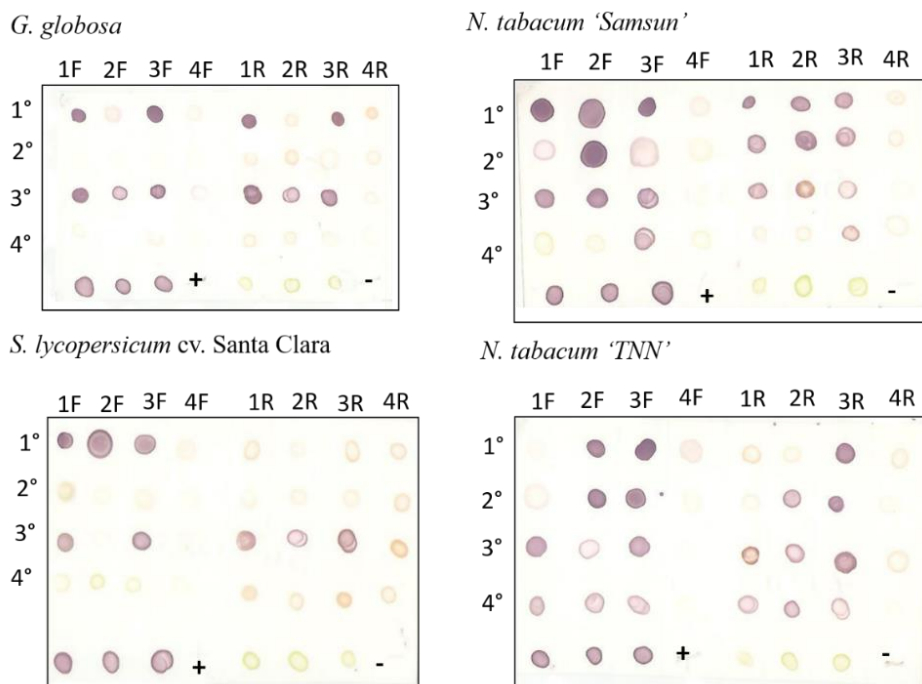
Os resultados da distribuição de PepRSV isolado CAM no tecido foliar e radicular das plantas indicadoras *N. tabacum* ‘Samsun’, *N. tabacum* ‘TNN’ e *Gomphrena globosa* demonstraram que durante quatro semanas o vírus permanece no sistema foliar e apresentaram sintomas de anéis necróticos em todas as plantas inoculadas. Para essas mesmas hospedeiras observa-se que com uma semana de inoculação o vírus foi detectado no sistema radicular (Figura 2.13 e Tabela 2.4).

A detecção do PepRSV em *C. annuum* ‘Ikeda’ no sistema radicular ocorreu na primeira e quarta semana, não sendo detectado no sistema foliar, mesmo apresentando sintomas fracos de anéis cloróticos nas folhas. O mesmo foi observado para outra espécie *C. chinense* PI159236 que foi detectado somente no sistema radicular.

Em plantas de *C. quinoa* foram detectadas no sistema foliar e no sistema radicular na primeira e na terceira semana após a inoculação (Tabela 2.4), demonstrando que essa planta é uma hospedeira suscetível e que o vírus permanece tanto nas folhas como nas raízes.

Para a espécie *S. lycopersicum* cv. Santa Clara a detecção de PepRSV isolado CAM no tecido foliar foi observada na primeira e na terceira semana. No tecido radicular o vírus foi detectado somente na terceira semana. Isso sugere que esse vírus em tomateiro se transloca lentamente para o sistema radicular quando comparado com as espécies de *N. tabacum* ‘Samsun’, *N. tabacum* ‘TNN’, *C. chinense* PI159236, *C. annuum* ‘Ikeda’ e *G. globosa* (Figura 2.13 e Tabela 2.4).





**Figura 2.13:** Detecção por dot-ELISA utilizando antissoro anti-CP 1:1000 de PepRSV em tecido foliar (F) e radicular (R) diluídos em 1:1000. A detecção foi realizada semanalmente de 1 a 4 semanas após a inoculação (número representado na esquerda). As plantas 1 a 3 foram inoculadas com PepRSV isolado CAM e a planta 4 com tampão (controle negativo). Legenda: n°F (número da amostra foliar), n°R (número da amostra radicular), (+): amostras de plantas inoculadas com PepRSV, controle positivo e (-): amostras de plantas não inoculadas, controle negativo.

A espécie *D. stramonium* foi detectada com infecção de PepRSV no tecido foliar somente com uma semana após a inoculação, mas não foi possível detectar o vírus em tecido radicular em nenhuma das amostras.

PepRSV não foi detectado em nenhuma amostra de plantas de *D. metel*, *N. physaloides*, *P. pubescens* e *C. amaranticolor* (Tabela 2.4). Esse resultado corrobora o ensaio de círculo de hospedeiros e indica que essas plantas não são hospedeiras suscetíveis para infecções sistêmicas. Para a espécie *C. murale*, o vírus foi detectado somente no tecido foliar na primeira semana após a inoculação, demonstrando a possibilidade da coleta das folhas inoculadas e não das folhas não inoculadas (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4:** Detecção de PepRSV isolado CAM em plantas inoculadas em períodos de uma a quatro semanas na parte aérea e radicular

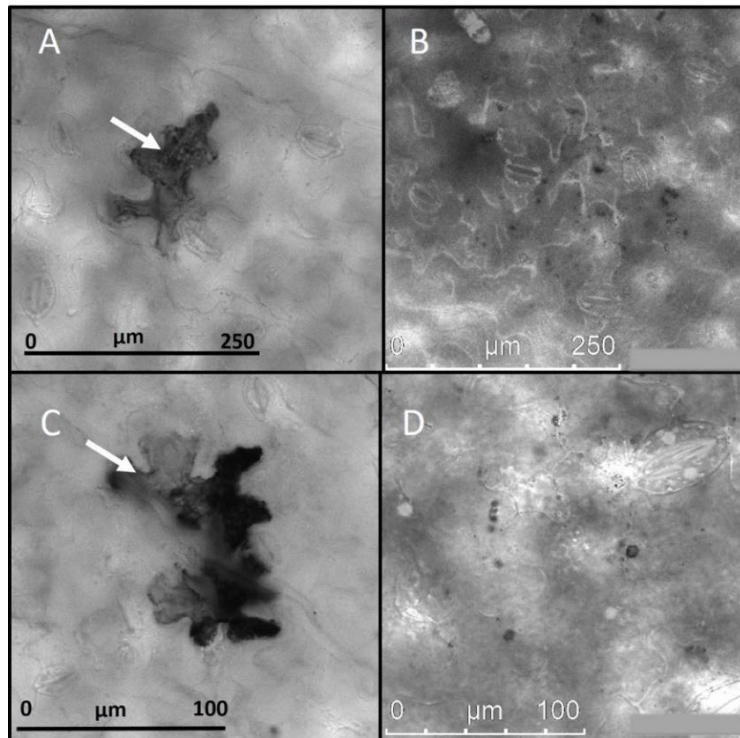
Família	Espécie	Detecção Folhas				Detecção Raiz			
		1ªSemana	2ª Semana	3ªSemana	4ªSemana	1ªSemana	2ª Semana	3ªSemana	4ªSemana
Solanaceae	<i>Datura metel</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	<i>D. stramonium</i>	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	<i>Nicandra physaloides</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	<i>N. tabacum</i> ‘Samsun’	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	<i>N. tabacum</i> ‘TNN’	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	<i>N. rustica</i>	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3
	<i>Capsicum chinense</i> PI159236	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	<i>C. annuum</i> ‘Ikeda’	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	1/3
	<i>Physalis pubescens</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	<i>S. lycopersicum</i> cv. Santa Clara	3/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>	1/3	0/3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	<i>C. amaranticolor</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	<i>C. murale</i>	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	2/3	0/3	3/3	0/3	2/3	0/3	3/3	0/3

### 2.3.5 Imunomarcaco

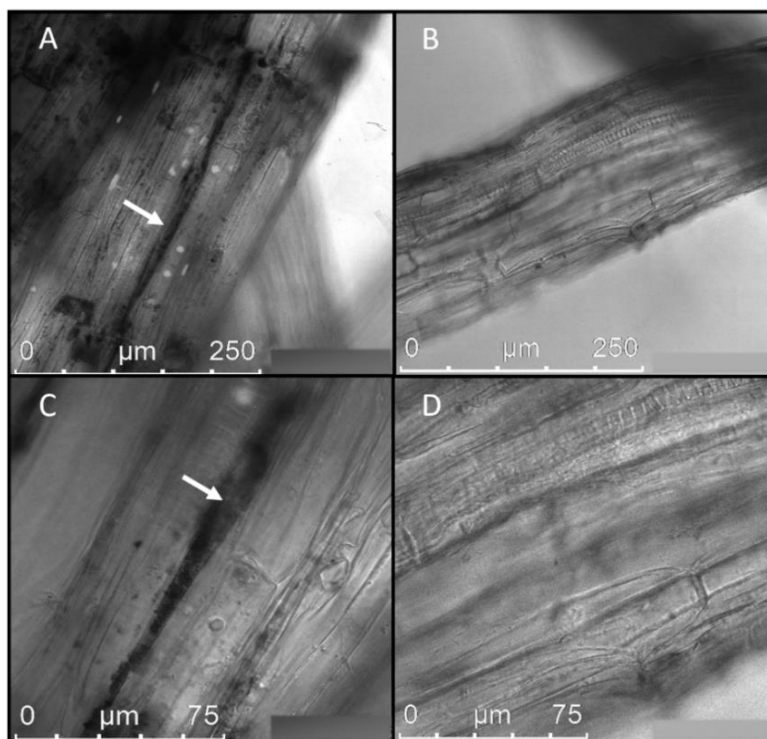
Plantas de *N. benthamiana* e *N. tabacum* cv. Samsun inoculadas com PepRSV isolado CAM foram submetidas ao ensaio de imunomarcaco para determinar a localizaco das partculas virais na planta infectada. Foram realizados trs ensaios com trs plantas para cada espcie (duas plantas inoculadas e uma planta como controle negativo). Neste teste, as partculas imunomarcadas so visualizadas em coloraco preta como agregados.

Nas duas plantas avaliadas, foram observadas as marcaoes de coloraco preta (agregados) na regio da epiderme foliar (Figura 2.14). Foi possvel verificar que a marcao no  generalizada, isto , o vrus no est presente em todas as clulas. Como o teste foi realizado em plantas aps duas semanas da infeco, uma incubaco mais longa poder resultar na distribuo mais generalizada do vrus no tecido foliar.

Na anlise do tecido radicular dessas plantas inoculadas com PepRSV (CAM), imunomarcaco positiva (agregados pretos) foi observada nos tecidos vasculares do floema, sugerindo a habilidade do vrus em se translocar para o tecido radicular. Plantas no inoculadas (controle negativo) no apresentaram reaco positiva no tecido radicular (Figura 2.15).



**Figura 2.14:** Imunomarcção em tecido foliar de *N. tabacum* cv. Samsun. A e C são células do tecido foliar imunomarcadas positivas. A seta preta indica as células imunomarcadas em coloração preta (agregados). B e D são células do tecido foliar não inoculadas com PepRSV, controle negativo.



**Figura 2.15:** Imunomarcção em tecido radicular de *N. benthamiana*. A e C tecido vascular do floema imunomarcado positivamente. Seta branca indica o tecido vascular do floema imunomarcado; B e D tecido vascular do floema não inoculados com PepRSV, controle negativo.

### 2.3.6 Detecção de PepRSV em tomateiros de campo

Um produtor em Alexandre Gusmão com cultivo de tomateiro estaqueado tipo grape foi visitado para se determinar a ocorrência de PepRSV em condições naturais de cultivo no Distrito Federal. O produtor tinha duas lavouras de tomateiro em fases distintas. O primeiro em fase final de colheita e o segundo ainda em fase de desenvolvimento vegetativo. Amostras foliares foram coletadas aleatoriamente para determinar a porcentagem de plantas infectadas. Um total de 40 amostras foi coletado na área 1 e 20 na área 2. Foi utilizado o teste dot-ELISA para a detecção de PepRSV nas plantas. Na área 1, a porcentagem de plantas infectadas com PepRSV foi de 22,5% e 0% na área 2 (Tabela 2.5).

Algumas plantas apresentavam sintomas de faixa e anéis cloróticos nas folhas baixas característicos de infecção por PepRSV. Uma amostra foi coletada separadamente, denominada Ag1, e incorporada à coleção de trabalho de PepRSV para caracterização.

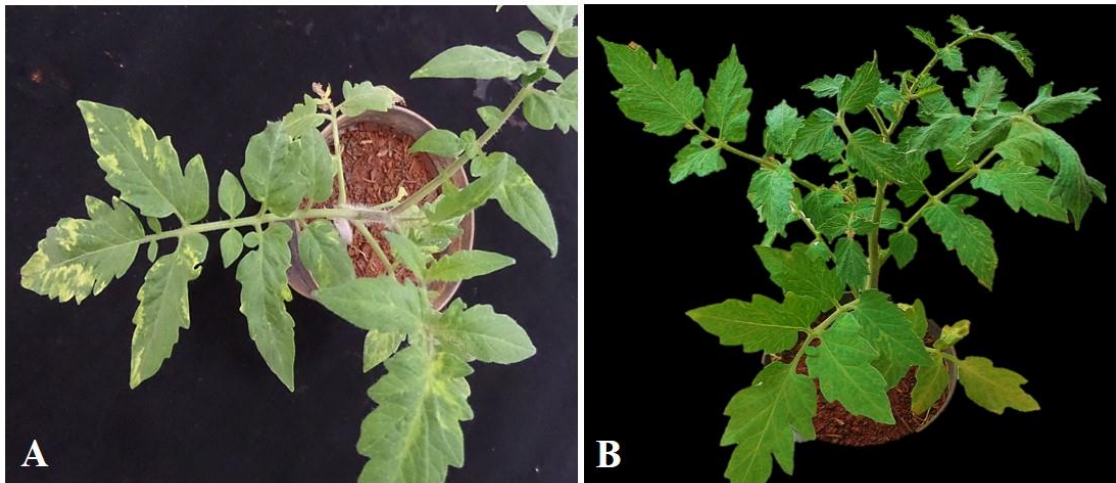
**Tabela 2.5:** Detecção de PepRSV em amostras de campo em Alexandre Gusmão

Amostras de PepRSV	Detecção nas folhas	Porcentagem (%)
Área 1 - Plantas em estágio final de frutificação	9/40	22,5%
Área 2 - Plantas em estágio vegetativo	0/20	0%

### 2.3.7 Caracterização de PepRSV isolados LAV e Ag1

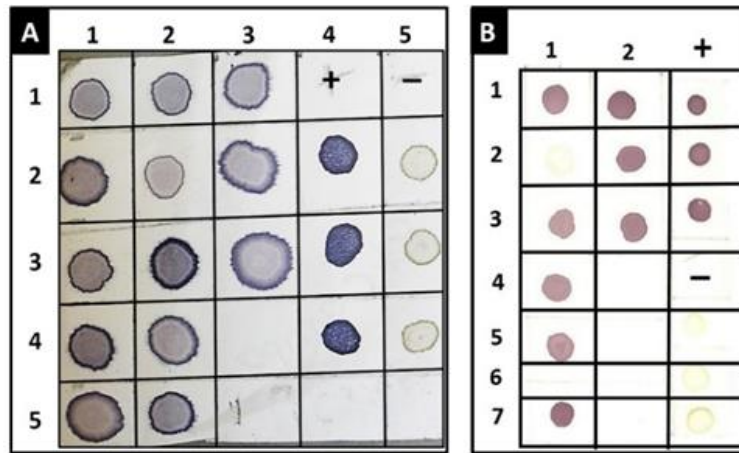
Os isolados LAV e Ag1 de PepRSV foram inoculados em plantas de *S. lycopersicum* cv. Santa Clara. As plantas infectadas apresentaram sintomas típicos de anéis e faixas cloróticas, semelhante aos sintomas observados no campo. Em contraste com o isolado LAV, as plantas de tomateiro cv. Santa Clara inoculadas com o isolado Ag1 apresentaram fortes sintomas nas folhas (Figura 2.16). Os sintomas causados pelo isolado LAV foram menos severos e menos persistentes (Figura 2.16), sugerindo uma característica biológica distinta entre estes isolados.

Todas as plantas de *S. lycopersicum* cv. Santa Clara inoculadas com os isolados Ag1 (13 plantas) foram infectadas exibindo sintomas e PepRSV foi detectado por dot-ELISA com duas semanas após a inoculação (Figura 2.17). Somente em uma planta inoculada com o isolado LAV, dentre 10 plantas, o PepRSV não foi detectado por dot-ELISA e não apresentava sintomas típicos de anéis cloróticos (planta B 1 X 2 na Figura 2.17).



**Figura 2.16:** Plantas de *S. lycopersicum* cv. Santa Clara inoculadas com PepRSV isolado Ag1 (A) e LAV (B), com sintomas de anéis e faixas cloróticas nas folhas.

Esse resultado demonstra que o antissoro produzido detecta outros isolados de PepRSV e que os isolados Ag1 e LAV infectam com alta eficiência plantas de tomateiro comparado ao isolado CAM em que a porcentagem de detecção foi baixa para várias cultivares de tomate avaliadas (item 2.3.4).



**Figura 2.17:** Detecção por dot-ELISA utilizando antissoro anti-CP 1:1000 em amostras de *S. lycopersicum* cv. Santa Clara inoculadas com PepRSV isolado Ag1 (13 plantas) e LAV (10 plantas). A: membrana de nitrocelulose com amostras de plantas inoculadas com PepRSV isolado Ag1 (linhas 1 a 3); linha 4: controle positivo do teste (+); e linha 5: controle negativo (-); B: Amostras de plantas inoculadas com PepRSV isolado LAV (linhas 1 e 2); (+): controle positivo; e (-): controle negativo.

## 2.4. DISCUSSÃO

A morfologia das partículas purificadas neste trabalho e observadas no microscópio eletrônico foi compatível com os vírus do gênero *Tobravirus*, que apresentam partículas tubulares rígidas, com dois comprimentos distintos, sendo uma partícula longa (200 nm) e outra curta (50 nm) (Offord, 1966; Kitajima *et al.*, 1969; Adams *et al.*, 2012). Durante o procedimento de purificação de partículas foi observado uma banda turva após a centrifugação com gradiente de sacarose. Essa característica foi associada à presença de partículas de pelo menos dois tamanhos (curtas e longas). Geralmente, após a purificação com gradiente de sacarose observa-se uma banda bem delimitada para os vírus monopartidos (Brakke, 1967). O mesmo não ocorre para os vírus segmentados de tamanhos distintos, assim como, foi observado neste trabalho.

O precipitado da purificação de partículas apresentou uma coloração marrom claro/esverdeado sugerindo a presença de contaminação com tecido vegetal. O fato foi confirmado pelo teste de especificidade do antissoro bruto reagindo com extrato de planta sadia. O antissoro apresentou alta especificidade e eficiência após o tratamento de limpeza. Essas características o tornam apto para a detecção de PepRSV.

A determinação do círculo de hospedeiros é tradicionalmente utilizada como um importante método biológico e como uma ferramenta de diagnose, sendo muito utilizada como o primeiro passo para identificar novas espécie de vírus (Hull, 2014). Os vírus podem causar sintomas variados em diferentes hospedeiras ou podem causar sintomas semelhantes a outras espécies de vírus, devido a isto a identificação baseada somente por sintomatologia irá depender da experiência do virologista, mas é considerada uma técnica essencial na diagnose.

Os sintomas causados por PepRSV em plantas foram classificados em dois tipos, sintomas necróticos ou cloróticos. O sintoma do tipo necrótico ocorreu tanto em folhas



inoculadas, assim como, em folhas não inoculadas. Para a maioria das plantas, o sintoma necrótico do tipo de lesão local necrótica só foi observado nas folhas inoculadas e a infecção não se tornou sistêmica nas plantas que apresentam esse sintoma.

Para as espécies *C. amaranticolor* e *C. murale* que apresentaram o sintoma de lesão local necrótica, a infecção não se tornou sistêmica (Silberschmidt, 1963; Kitajima *et al.*, 1969; Cupertino *et al.*, 1991). Ambas espécies podem ser consideradas hospedeiras de lesão local utilizadas para determinar a concentração do inóculo inicial a partir do número de lesões formadas (Roberts, 1964). A lesão necrótica observada em *C. murale* quando inoculadas com PepRSV isolado CAM apresentou lesões grandes, recobrando a nervura em contraste com as lesões pequenas em *C. amaranticolor*. Essa característica sugere que há uma maior multiplicação viral de PepRSV nesta planta. Novos testes precisam ser realizados para comprovar se PepRSV multiplica-se e causa infecção sistêmica nesta planta.

A espécie *N. physaloides* apresentou o sintoma de lesão local necrótica não sistêmica. Esta é a primeira observação da resposta à inoculação de PepRSV nesta hospedeira. Este resultado sugere que *N. physaloides* não é uma provável fonte de inóculo de PepRSV nas áreas de cultivo de tomate no Brasil. Informação relevante, já que *N. physaloides* é uma importante planta daninha encontrada nas plantações de tomateiro.

A espécie *C. quinoa* também apresentou o sintoma de lesão local necrótica, porém, a infecção se tornou sistêmica. Resultado semelhante foi observado por Polak *et al.* (1968) em plantas de *C. quinoa* infectadas com TRV, as quais também apresentaram infecção sistêmica mesmo com sintoma de lesão local necrótica. O mesmo não foi observado por Silberschmidt (1963) e Cupertino *et al.* (1991), onde a infecção por PepRSV em *C. quinoa* não se tornou sistêmica apresentando sintoma de lesão local necrótica.

A espécie *G. globosa* apresentou infecção sistêmica com sintoma de anel necrótico com halo vermelho. O mesmo não foi observado por Silberschmidt (1963) e Cupertino *et al.*

(1991), em que a infecção por PepRSV em *G. globosa* não se tornou sistêmica apresentando sintoma de anel necrótico com halo vermelho. Para espécie TRV esse mesmo resultado foi observado por Polak *et al.* (1968) em *G. globosa* com sintoma de anel necrótico com halo vermelho e a infecção não se tornou sistêmica. Para PepRSV isolado CAM, a hospedeira *G. globosa* foi considerada como uma planta adequada para a manutenção do isolado vivo em casa de vegetação quando comparada com as demais hospedeiras testadas neste trabalho. Porém, existe o risco que a manutenção constante nesta hospedeira pode resultar seleção de isolados que estejam bem adaptados a essa planta e não tenham capacidade de infectar os hospedeiros originais, como tomateiro e pimenteira.

As espécies *N. tabacum* ‘Samsun’ e *N. tabacum* ‘TNN’ apresentaram o sintoma de faixa e anel necrótico com infecção sistêmica em infecção por PepRSV. Resultado semelhante foi observado por Silberschmidt (1963) e Cupertino *et al.* (1991), em que a infecção por PepRSV se tornou sistêmica em plantas de *N. tabacum* ‘Samsun’ e *N. tabacum* ‘TNN’ com sintoma de faixa e anel necrótico. Polak *et al.* (1968) observou resposta idêntica para TRV. Devido à alta taxa de infecção nestas plantas e a expressão clara de sintomas essas plantas foram selecionadas para a manutenção do isolado CAM juntamente com a hospedeira *G. globosa*, tomateiro e pimenteira.

Para as espécies *N. tabacum* ‘Samsun’, *N. tabacum* ‘TNN’ e *Gomphrena globosa*, foi possível observar que PepRSV isolado CAM infecta os tecidos foliares e radiculares, sendo detectado nas raízes em uma semana de inoculado e permanecendo ao longo do período avaliado no tecido foliar e radicular. Isso indicou que essas plantas são boas candidatas para uso como fonte de inóculo para estudos de transmissão por nematoide.

As espécies *S. lycopersicum*, *C. annuum* ‘Ikeda’ e *Capsicum chinense* PI159236 apresentaram sintoma de faixa e anel clorótico com infecção sistêmica, de forma semelhante àqueles relatados por Silberschmidt (1963) e Cupertino *et al.* (1991). De forma intrigante,

para as solanáceas *C. annuum* 'Ikeda' e *C. chinense* PI159236, PepRSV foi melhor detectado nas raízes do que nas folhas, ao contrário do observado em tomateiro. Esses ensaios serão repetidos para se confirmar esses resultados preliminares.

Allen & Davis (1982) monitoraram por técnica sorológica a presença dos vírus TRV (tobravírus) e PVX (*Potato virus X*) (potexvírus) em tecido foliar e radicular. Os autores demonstraram que TRV infecta 91,6% (11/12) do sistema radicular das hospedeiras testadas, diferente do observado para PVX que infecta 50% (6/12). Eles concluem que TRV necessita se translocar para o sistema radicular para ser transmitido por nematoide o que não ocorre para PVX que é eficientemente transmitido mecanicamente, sendo uma característica evolutiva que diferencia a translocação destes vírus no hospedeiro. É importante avaliar se PepRSV também compartilha com TRV essas características de facilidade de infecção de raízes.

A maioria das cultivares de tomateiro avaliadas se mostrou suscetível à infecção por PepRSV, isolado CAM, porém, a taxas baixas variando de 10% a 30%. Por outro lado, os isolados LAV e Ag1, quando inoculados em plantas de tomateiros variedade Santa Clara as taxas de infecção foram 80% e 100%, respectivamente. Esses resultados sugerem que há uma certa especificidade ao hospedeiro e que o isolado CAM parece não ser bem adaptado ao tomateiro ou as alterações geradas nesse isolado durante a manutenção por inoculações mecânicas consecutivas têm influência nas características biológicas desse isolado.

O isolado Ag1 foi coletado em uma área de tomateiro estaqueado em campo aberto com taxa de infecção de PepRSV observada de 22,5%. Essa alta taxa de infecção sugere que PepRSV pode vir a causar grandes danos à tomaticultura brasileira. Estudos de monitoramento e levantamento de perdas são necessários para se avaliar a importância desse vírus à cadeia de produção de tomates brasileira.

## 2.5 CONCLUSÕES

O Antissoro de PepRSV anti-CP foi produzido e é útil para a detecção de PepRSV.

O isolado CAM de PepRSV infecta de forma sistêmica 16 espécies pertencentes a três famílias botânicas sendo Solanaceae, Chenopodiaceae e Amaranthaceae.

PepRSV isolado CAM se transloca para o sistema radicular quando inoculado na parte aérea das hospedeiras *N. tabacum* ‘Samsun’, *N. tabacum* ‘TNN’, *N. rustica*, *Capsicum chinense* PI159236, *C. annuum* ‘Ikeda’, *S. lycopersicum* cv. Santa Clara, *Chenopodium quinoa* e *Gomphrena globosa*.

As cultivares de tomateiro Santa Clara, AP533, N901, U2006, Money Maker e Gaucho são susceptíveis à infecção por PepRSV isolado CAM.

Foi verificada uma taxa de incidência de 22.5% de PepRSV em condições naturais em uma lavoura em Alexandre Gusmão, DF.

As taxas de infecção em tomateiro para os isolados Ag1 e LAV de PepRSV são superiores ao isolado CAM.

# CAPÍTULO 3

---

---

PRODUÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS DE *PEPPER RINGSPOT*

*VIRUS*

## CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS DE *PEPPER RINGSPOT* *VIRUS*

### RESUMO

O gênero *Tobravirus* é constituído de três espécies *Tobacco rattle virus* (TRV), *Pea early-browning virus* (PEBV) e *Pepper ringspot virus* (PepRSV). O genoma dos vírus deste gênero é bipartido (RNA1 e RNA2) com RNA de fita simples, senso positivo, tendo na extremidade 5' uma estrutura de CAP e na extremidade 3' uma estrutura de tRNA-like. Clones infecciosos de TRV e PEBV já foram produzidos e são extremamente úteis para o estudo da interação entre vírus e planta hospedeira e funções gênicas diversas. Não há, entretanto, clones infecciosos de PepRSV, único tobrovírus relatado no Brasil. O objetivo deste trabalho foi produzir clones infecciosos de PepRSV a partir de dois isolados distintos em sua organização genômica (CAM e LAV). O RNA2 de CAM não apresenta os dois genes associados à transmissão por nematoide, 2b e 2c, e LAV apresenta apenas um potencial gene 2b, quando comparados ao genoma de TRV e PEBV. A estratégia consiste em utilizar um clone do RNA1 e dois clones (CAM e LAV) do RNA2. O estudo foi dividido em quatro objetivos específicos: (1) amplificar o fragmento completo correspondente ao RNA1 e RNA2 do isolado CAM e RNA2 de LAV; (2) produzir clones infecciosos de PepRSV (CAM e LAV) no vetor binário pJL\_89; (3) analisar a infectividade dos clones infecciosos; e (4) definir e validar um protocolo de detecção de PepRSV por RT-PCR em amostras de campo. A amplificação foi bem-sucedida com a obtenção de fragmento de DNA de 6,8 kb para o RNA1 de PepRSV isolado CAM e de 1,7 kb (isolado CAM) e 2,0 kb (isolado LAV) para o RNA2. Três clones foram selecionados para os testes de infectividade: RNA1-CAM3; RNA2-CAM1 e RNA2-LAV2. A combinação RNA1 e RNA2 para CAM e LAV e posteriormente a agroinfiltração em plantas de *Nicotiana benthamiana* resultou na indução, para ambas as construções, de sintomas de encarquilhamento e bolhosidade nas plantas, indicando que os clones foram infectivos. Primers para detecção foram produzidos para a região após a capa proteica até a região 3' terminal do genoma do RNA2 e detectaram PepRSV em amostras coletadas em lavouras de Alexandre Gusmão. Um novo isolado denominado Ag1 foi coletado, verificou-se que apresenta um componente RNA2 maior que os outros isolados e este foi incluído na coleção de PepRSV da UnB/Embrapa. As conclusões deste trabalho são: foi possível amplificar e clonar o RNA1 e RNA2 completo de PepRSV por RT-PCR; há pouca ou nenhuma diferença na sequência de nucleotídeos entre os novos clones e as sequências depositadas no banco de dados; os clones produzidos (RNA1-CAM3 e RNA2-CAM1; e RNA1-CAM3 e RNA2-LAV2) são infecciosos em plantas de *N. benthamiana*; o RNA2 de LAV é compatível com o RNA1 de CAM; a inoculação com apenas o clone RNA1-CAM3 causa sintomas em folhas não inoculadas de *N. benthamiana*; Ag1 é um isolado de PepRSV e apresenta um RNA2 maior que dos isolados CAM e LAV.

**Palavras-chave:** *Tobrovírus*, clone infeccioso, PepRSV

## PRODUCTION OF INFECTIOUS CLONES OF *PEPPER RINGSPOT VIRUS*

### ABSTRACT

The genus *Tobravirus* consists of three species *Tobacco rattle virus* (TRV), *Pea early-browning virus* (PEBV) and *Pepper ringspot virus* (PepRSV). The genome of the viruses of this genus is bipartite (RNA1 and RNA2) with single stranded RNA, positive sense, having at the 5' end a CAP structure and at the 3' end a tRNA-like structure. Infectious clones of TRV and PEBV have already been produced and are extremely useful for studying the interaction between virus and host plant and various gene functions, particularly the TRV clones. There are, however, no infectious clones of PepRSV, the only tobnavirus present in Brazil. The objective of this work was to produce PepRSV infectious clones from two isolates, which are distinct in their genomic organization (CAM and LAV). CAM RNA2 does not present the two genes associated with nematode transmission, 2b and 2c, and LAV has only a potential 2b gene when compared to the genome of TRV and PEBV. The strategy consists of using one clone of RNA1 and two clones (CAM and LAV) of RNA2. The study was divided into four specific objectives: (1) amplify the complete fragment corresponding to RNA1 and RNA2 of the CAM isolate and RNA2 of the LAV isolate; (2) produce PepRSV infectious clones (CAM and LAV) in the binary vector pJL\_89; (3) to analyze the infectivity of infectious clones; and (4) define and validate a PepRSV detection protocol by RT-PCR in field samples. The amplification was successful with the production of a 6.8 kb DNA fragment for RNA1 of PepRSV CAM isolate and a 1.6 kb (CAM isolate) and a 2.0 kb (isolate LAV) fragment for RNA2. Three clones were selected for the infectivity tests: RNA1-CAM3; RNA2-CAM1 and RNA2-LAV2. The combination of RNA1 and RNA2 for CAM and LAV and agroinfiltration in plants of *Nicotiana benthamiana* resulted in the induction, for both constructions, of leaf distortion and blistering symptoms in plants, indicating that the clones were infective. Primers for detection were designed for the region after the coat protein and the 3' terminal region of the RNA 2 genome and detected PepRSV in samples collected in an Alexandre Gusmão field. A new isolate called Ag1 was collected, confirmed to have a longer RNA2 segment, and included in the PepRSV collection of UnB / Embrapa. The conclusions of this work were: it was possible to amplify and clone the complete RNA1 and RNA2 genomes of PepRSV by RT-PCR; few or no differences were observed in the nucleotide sequence between the new clones and the sequences deposited in the database; the obtained clones (RNA1-CAM3 and RNA2-CAM1; and RNA1-CAM3 and RNA2-LAV2) are infectious in *N. benthamiana* plants; LAV RNA2 is compatible with CAM RNA1; the inoculation with only the clone RNA1-CAM3 causes symptoms in upper leaves of *N. benthamiana*; Ag1 is a PepRSV isolate and has a longer RNA2 segment than CAM and LAV isolates.

**Keywords:** *Tobravirus*; infectious clones; PepRSV

### 3.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Tobravirus* é formado por apenas três espécies relatadas no mundo, *Tobacco rattle virus* (TRV), *Pea early-browning virus* (PEBV) e *Pepper ringspot virus* (PepRSV) (Adams *et al.*, 2012). PepRSV é a única espécie que foi relatada no território brasileiro. Até o momento, três isolados (CAM, Pivo4 e LAV) de PepRSV foram caracterizados e sequenciados, sendo o CAM proveniente de São Paulo e o primeiro isolado brasileiro caracterizado de forma molecular (GenBank, acessos L23972, X03241; Bergh *et al.*, 1985). Além dos isolados LAV e Pivo4, que também se encontram em caracterização, um novo isolado foi coletado e os testes preliminares apontam que este isolado, PepRSV Ag1, aparentemente apresenta características moleculares distintas dos demais isolados

O RNA1 dos *Tobravirus* codifica proteínas essenciais para a replicação viral pequena e grande subunidade da replicase (ORF 1a e ORF 1b), proteína de movimento célula-a-célula (ORF 2) e o supressor de RNAi (ou silenciamento gênico pós-transcricional; ORF 3) (Offord, 1966; Hamilton *et al.*, 1987). O RNA 2 é responsável por codificar a proteína capsidial (CP) e as proteínas não estruturais 2b e 2c que são necessárias para a transmissão por nematoides (Macfarlane, 2010).

A sequência do RNA2 do isolado CAM de PepRSV não possui os genes que codificam as proteínas 2b e 2c de tobrovírus (Bergh *et al.*, 1985), provavelmente relacionadas com a sua deleção durante a manutenção do isolado por inoculação mecânica (Batista *et al.*, 2014). Apesar de não conhecido, especula-se que esse isolado tenha perdido a sua habilidade de ser transmitido por nematoides. A sequência do RNA2 do segundo isolado de PepRSV, LAV, apresenta apenas o gene da proteína 2b, não sendo homóloga à proteína 2b de TRV e PEBV (Batista *et al.*, 2014). Em contraste com o isolado CAM (mantido há vários anos por inoculação mecânica em laboratório), o isolado LAV não foi propagado por



inoculação mecânica e é, portanto, esperado que a sua transmissão ocorra normalmente pelos nematoides.

Como PepRSV só foi relatado no Brasil, é estratégico obter ferramentas para melhor compreender a biologia do processo de infecção desta espécie, que apresenta características peculiares e distintas de outros tobnavírus. Devido à inexistência de clones infecciosos para PepRSV a construção desses clones é altamente desejada para viabilizar os estudos de transmissão, replicação e translocação, além de seu potencial uso como vetor para "virus induced gene silencing". Para a obtenção de clones infecciosos fez-se necessário amplificar de forma completa e perfeita o RNA 1 e RNA2 e introduzir no vetor de modo que o transcrito seja gerado sem a adição de qualquer base extra.

Os clones infecciosos foram construídos utilizando a metodologia de Gibson Assembly (G.A.) descrito por (Blawid & Nagata, 2015). A reação de G.A. é composta de três enzimas sendo: exonuclease com ação 3→5; DNA polymerase phusion e uma DNA ligase em uma reação isotérmica (50°C por duas horas). Esse método de clonagem não utiliza a inserção de sítio de enzima de restrição e o processo de clonagem ocorre por recombinação e ligação de fragmentos (podendo ser de dois a quatro fragmentos, diminuindo a eficiência da reação G.A. quanto maior o número de fragmentos) que apresentam região de sobreposição (15 nt a 30 nt, quanto maior a região de sobreposição mais específica a reação de G.A.).

O objetivo deste trabalho foi produzir clones infecciosos de PepRSV (isolado CAM e LAV) e uma ferramenta de detecção de PepRSV via RT-PCR.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB) localizado no Distrito Federal.

A fonte de isolado CAM de PepRSV foi fornecida por Dr. José Osmar Gaspar (Universidade Estadual de São Paulo, Ribeirão Preto, SP) e estava sendo mantida em - 80°C.

### 3.2.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído de plantas de *N. benthamiana*, *N. tabacum* cv. Samsun ou *S. lycopersicum* infectadas com PepRSV isolado CAM, LAV e Ag1, utilizando o reagente comercial Concert™ Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific). Os tecidos foliares (cerca de 100 mg) infectados foram triturados com nitrogênio líquido. Ao material triturado adicionou-se 500 µL de Plant RNA Reagent. Após a agitação por trinta segundos as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por cinco minutos, e centrifugadas a 12.000 g por dois minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e em seguida adicionou-se 100 µL de NaCl 5M e misturou-se. Após a adição de 300 µL de clorofórmio, misturou-se bem invertendo o tubo por quinze segundos. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 10.000 g por quinze minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro microtubo e adicionou-se 500 µL de isopropanol, em seguida foi mantido à temperatura ambiente por dez minutos. Centrifugou-se a amostra para a precipitação do RNA total por 12.000 g por dez minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µL de água tratada com 0,1 % dietilpirocarbonato de sódio (DEPC) e autoclavada.

### **3.2.2 Amplificação do genoma completo dos isolados (CAM e LAV) de PepRSV para construção do clone infeccioso**

Para a amplificação do genoma completo do RNA1 e RNA2 dos isolados CAM e LAV de PepRSV, o RNA total extraído foi submetido à síntese do cDNA e em seguida à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi amplificado o RNA1 e RNA2 do isolado CAM e somente o RNA2 do isolado LAV.

#### **- Síntese do cDNA por RT**

O RNA total foi submetido à síntese do DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa. Para aumentar a eficiência de síntese de cDNA, primers de ambas as direções (*Forward* e *Reverse*) foram adicionados na reação de RT. Ao RNA1 de CAM, o par de primers PepRSV\_R1\_35S\_For e o PepRSV\_R1/2\_Rz\_Rev foram adicionados e para o RNA2 (CAM e LAV) o par de primers PepRSV\_R2\_35S\_For e o PepRSV\_R1/2\_Rz\_Rev (Tabela 3.1). Como o RNA1 e RNA2 de PepRSV compartilham de extremidades 3' idênticas, os primers reversos são iguais para a síntese do cDNA.

A reação de desnaturação foi composta de 9 µL de RNA total extraído (RNA1 – CAM e o RNA2 – CAM ou LAV), 1 µL de 10 mM dNTP (desoxirribonucleotídeos fosfatados) e os primers (1 µL de 10 µM), os quais foram incubados a 75°C por cinco minutos. Após a incubação por três minutos no gelo, foi submetido à reação de transcrição reversa com a enzima Superscript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific), 4 µL de tampão 5X, 2 µL de DTT 0,1 M (Ditiotreitol), 1 µL de RNaseOut (40 U/µL, Invitrogen), e 1 µL de Superscript III (total de 20 µL) e incubou-se a 52°C por uma hora. Após este período, inativou-se a enzima a 75°C por quinze minutos. Posteriormente, foi feito um tratamento com 1 µL de RNase H (5 U/uL) (New England Biolabs- NEB) a 37°C por trinta minutos para fragmentar o RNA molde da reação (este tratamento foi utilizado somente para RNA1, devido ser fragmento de maior tamanho).

**Tabela 3.1:** Sequências de primers usados na transcrição reversa

Nome do Primer	Sequência (5'→ 3')	Especificidade
PepRSV_R1_35S_For	* <u>CATTTCATTTGGAGAGGATAAAACAATTAGAATATTTGAAGGG</u>	RNA1
PepRSV_R2_35S_For	* <u>CTATTCATTTGGAGAGGATAAAATTTTCAGAATGTCTTCGGG</u>	RNA2
PepRSV_R1/2_Rz_Rev	* <u>ATGCCATGCCGACCCGGGCGTGATAACGTTAC</u>	RNA1 e RNA2

\*Sequência sublinhada corresponde à região de sobreposição com vetor pJL\_89 em e *itálico/negrito* região correspondente ao inserto.

### - Amplificação do genoma completo via PCR:

Com objetivo de construir o clone infeccioso de PepRSV, os fragmentos de PCR dos segmentos genômicos e do vetor plasmidial foram amplificados com as regiões de sobreposição de 15 (para RNA2) ou 30 nucleotídeos (para RNA1). Estas regiões de sobreposição servem para recombinar e ligar os dois fragmentos de DNA de origens diferentes por Gibson Assembly. O par de primer para amplificação do RNA1 foi diferente do utilizado na RT pois o novo par de primer apresenta uma região de sobreposição maior para a reação de Gibson Assembly (para aumentar a eficiência da reação) (Tabela 3.2). O tamanho do fragmento amplificado foi 6,8 kb para o RNA1 isolado CAM, 1,7 kb para RNA2 isolado CAM e 2,0 kb para o RNA2 isolado LAV.

Os cDNAs sintetizados para o RNA1 (CAM) e RNA2 (CAM e LAV) de PepRSV foram utilizados para PCR. Os reagentes utilizados foram: 5 µL de tampão 5X Phusion DNA High-Fidelity polymerase (NEB); 0,75 µL de dNTPs 10mM; 1 µL de primers 10 mM para cada isolado (Tabela 3.2), 0,25 µL de enzima Phusion DNA High-Fidelity polymerase (0.02 U/ µL), 1 µL de cDNA e água milli-Q autoclavada. A reação foi feita de acordo com o protocolo do fabricante. Os fatores variáveis como temperatura de anelamento e tempo de extensão foram determinados para cada segmento sendo: RNA1 do isolado CAM (6,8 kb), a temperatura de anelamento de 60°C por trinta segundos e extensão de 72°C por sete

minutos; RNA2 dos isolados CAM e LAV (1,7 kb e 2,0 kb, respectivamente) a temperatura de anelamento de 62°C por trinta segundos e extensão de 72°C por três minutos, em um total de 30 ciclos.

Os DNAs amplificados foram visualizados em eletroforese de gel de agarose a 1 %, preparado em tampão 1 X TBE, (89 mM Tris base - 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH:8,0), de acordo com Green & Sambrook (2012).

**Tabela 3.2:** Sequências de primers usados na PCR para a amplificação do cDNA de RNA1

Nome do primer	Sequência (5' → 3')	Amplificação
5End_PepRSV_R1_For	* <u>GTTTCATTT</u> CATTTGGAGAGGATAAAA <b>CAATTAGAA</b> TATTTGAAGGGAC	RNA1
3End_PepRSV_R1_Rev	*ATGCCATGCCGACCCGGGCGTGATAAC <b>GTT</b> CAC	RNA1

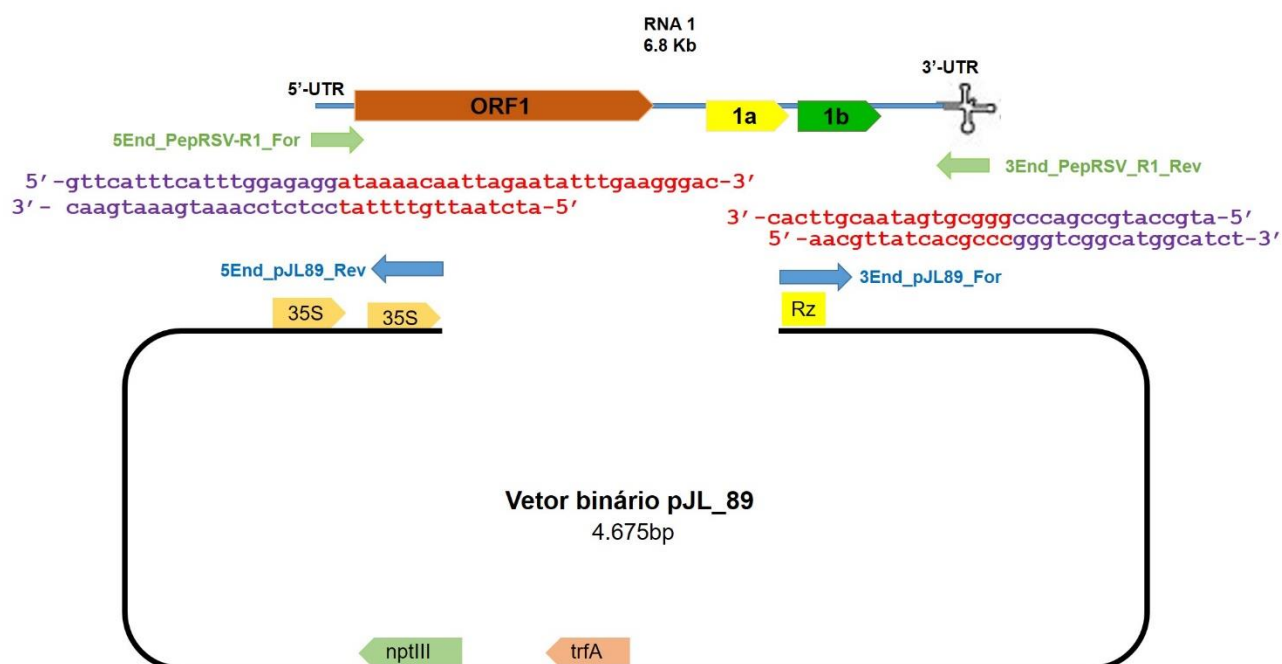
\*Sequência sublinhada corresponde à região de sobreposição com vetor pJL\_89 e em *itálico/negrito* região correspondente ao inserto.

### 3.2.3 Construção dos clones infecciosos

Para a construção de clones infecciosos, utilizou-se o plasmídeo binário pJL\_89 (Lindbo, 2007), que contém o promotor 35S duplicado de *Cauliflower mosaic virus*, sequência da ribozima de *Hepatitis delta virus* (Rz) e o terminador *nopaline synthase de agrobacterium* (NOS).

O DNA do plasmídeo pJL\_89 foi amplificado por PCR com primers que apresentam região de sobreposição com o inserto RNA1 (CAM) de 30 nucleotídeos e com o RNA2 (CAM e LAV) de 15 nucleotídeos (Figura 3.1 e Tabela 3.3). Essa característica de sobreposição foi necessária para que os fragmentos sintetizados por PCR fossem utilizados no processo de recombinação e ligação pela reação de Gibson Assembly (Blawid & Nagata, 2015). Os primers utilizados para amplificar o pJL\_89 com uma região de sobreposição com

o RNA1 foram 5End\_pJL\_Rev e 3End\_pJL\_For (com temperatura de anelamento de 61°C por trinta segundos e 72°C de temperatura de extensão por três minutos).



**Figura 3.1:** Representação da estratégia de clonagem por Gibson Assembly através da recombinação de fragmentos de DNA (pJL\_89 e PepRSV RNA1) que apresentam sobreposição, utilizado para a construção dos clones infecciosos de PepRSV. (Adaptado de Blawid & Nagata, 2015).

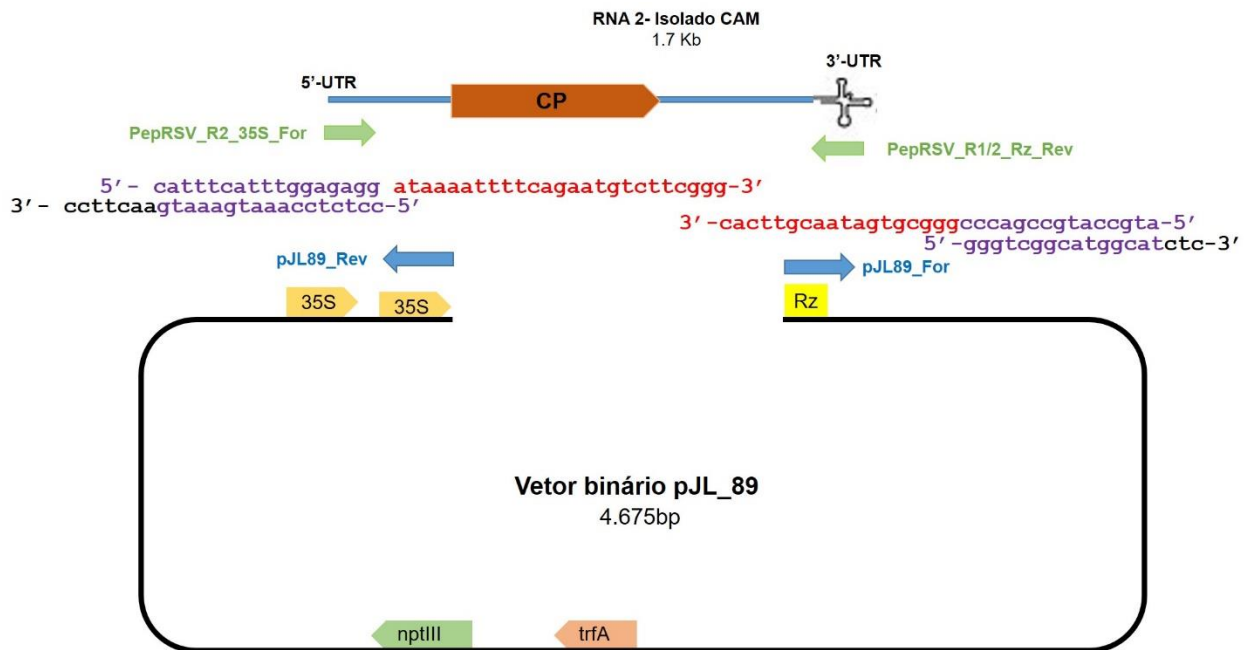
**Tabela 3.3:** Sequências de primers usados na PCR para a amplificação do DNA do vetor pJL\_89.

Nome	Sequência (5' → 3')	Amplificação
5End_pJL_Rev	* <u>TTCTAATGT</u> TTTATCCTCTCCAATGAAATGAAC	pJL_89 (sobreposição <b>RNA1</b> )
3End_pJL_For	*AACGTTATCACGCCCGGGTCGGCATGGCATCT	pJL_89 (sobreposição <b>RNA1</b> )
pJL_89_Rev	* <u>CCTCTCCA</u> AATGAAATGAACTTCC	pJL_89 (sobreposição <b>RNA2</b> )
pJL_89_For	* <u>GGGTCGG</u> CATGGCATCTC	pJL_89 (sobreposição <b>RNA2</b> )

\*Sequência sublinhada região de sobreposição com vetor pJL\_89

Os primers utilizados para amplificar o pJL\_89 com sobreposição com o RNA2 foram pJL\_89\_Rev e pJL\_89\_For (com temperatura de anelamento de 61°C por trinta segundos) e 72°C de temperatura de extensão por três minutos (Tabela 3.3 e Figura 3.2). A

PCR foi semelhante ao descrito no item 3.2.2. O resultado da amplificação foi visualizado por eletroforese de gel de agarose a 1%, como descrito anteriormente no item 3.2.2.



**Figura 3.2:** Representação da metodologia de clonagem por Gibson Assembly através da recombinação de fragmentos de DNA (pJL\_89 e PepRSV RNA2) que apresentam sobreposição, utilizado para a construção dos clones infecciosos de PepRSV (Adaptado de Blawid & Nagata, 2015).

### - Clonagem utilizando reação de Gibson Assembly (G.A.)

Para a construção do clone infeccioso, utilizou-se três fragmentos virais amplificados, RNA1(CAM), RNA2 (CAM) e RNA2 (LAV), e o vetor pJL\_89. Após a amplificação, esses foram submetidos à purificação utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Após a purificação, os fragmentos foram quantificados e submetidos a uma reação isotérmica de G.A. (Gibson Assembly<sup>®</sup> Cloning Master Mix). Essa reação consistiu da mistura entre 100 ng do vetor pJL-89 com 200 ng cada um dos fragmentos virais, separadamente, resultando em três reações. Cada reação consistiu de um volume de 20 µL [10 µL de DNA (inserto e vetor) e 10 µL do mix da reação

de G.A.], que foi incubada a 50°C por 2 horas. Após a incubação a mistura foi dialisada por 15 minutos.

#### **- Transformação em *Escherichia coli* cepa DH-10β e STBL**

As células eletrocompetentes de *E. coli* cepa DH-10β e STBL 4 (Thermo Fisher Scientific) foram transformadas com as construções por eletroporação: 2 μL da reação de G.A. (construções RNA1(CAM) + vetor pJL\_89 ou RNA2 (CAM ou LAV) + vetor pJL\_89) foram adicionados em 60 μL de células competentes DH-10β ou STBL 4 (Thermo Fisher Scientific). Após a eletroporação, foram adicionados 500 μL de meio LB em cada solução. Em seguida, incubou-se as células transformadas (DH-10β ou STBL 4) a 28°C por duas horas sob agitação constante de 200 rpm. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar com canamicina (50 μg/mL). As placas foram incubadas na estufa a 28°C por 24 ou 48 horas (para a construção RNA1 (CAM) + pJL\_89 foram incubadas por 48 horas e para as construções RNA2 (CAM ou LAV) + pJL\_89 foram incubadas por 24 horas).

As colônias que cresceram foram inoculadas em tubos com 10 mL de meio LB líquido e canamicina (50 μg/mL). Os tubos foram incubados a 28°C por vinte e quatro horas sob agitação constante de 200 rpm. A solução bacteriana originada de uma única colônia foi submetida à extração do DNA plasmidial utilizando kit Promega (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System), seguindo as recomendações do fabricante.

Para confirmar a inserção do fragmento em vetor foi realizada uma digestão com enzima de restrição *EcoR* I que foi selecionada por digerir o plasmídeo em dois sítios gerando dois fragmentos. A reação foi composta de DNA plasmidial, tampão de digestão, BSA (Bovine Serum Albumin), enzima de restrição *EcoR* I e água milli-Q autoclavada. Incubou-se a 37°C por quatro horas.

Os produtos da digestão foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%, como descrito anteriormente no item 3.2.2. Os plasmídeos contendo o inserto de tamanho



esperado foram selecionados e sequenciados na Macrogen, Inc. (Seul, Coréia do Sul). Após a confirmação da clonagem correta por sequenciamento, células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 foram transformadas com cada clone.

### **3.2.4 Comparação das sequências dos clones infecciosos dos isolados (CAM e LAV) de PepRSV com sequências depositadas no banco de dados**

Após a confirmação da clonagem correta por sequenciamento, foi realizada uma análise de comparação das sequências obtidas dos insertos dos clones RNA1 (CAM), RNA2 (CAM) e RNA2 (LAV) de PepRSV com as sequências de PepRSV disponíveis em bancos de dados produzido por Bergh *et al.* (1985). A análise comparativa foi realizada utilizando o programa Sequence Demarcation Tool Version 1.2 (Muhire *et al.*, 2014). A finalidade desta análise foi verificar a porcentagem de identidade da sequência dos clones produzidos com as sequências disponíveis no banco de dados.

### **3.2.5 Avaliação da infectividade dos clones**

#### **- Transformação em *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101**

Para a transformação de *A. tumefaciens* cepa GV3101, foram utilizados 100 ng dos plasmídeos selecionados de RNA1 (CAM3), RNA2 (CAM1) e RNA2 (LAV2) em 60 µL de preparação de células eletrocompetentes de *A. tumefaciens*. Após a eletroporação dos clones em *A. tumefaciens*, foram adicionados 500 µL de meio LB e incubados a 27°C por duas horas sob agitação a 250 rpm. A *A. tumefaciens* transformada foi plaqueada em meio LB3 (10g triptona; 5g extrato de levedura; 4g NaCl; 1g KCl ;3g MgSO<sub>4</sub>: 7H<sub>2</sub>O para 1 litro de água autoclavada) com rifampicina (20 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 28°C por dois a três dias. Após o crescimento das bactérias, algumas colônias foram selecionadas e repicadas para 10 mL de meio LB3 líquido com rifampicina (20 µg/ml) e canamicina (50 µg/ml). Os tubos foram incubados a 28°C por dois dias sob

agitação a 250 rpm. Após o crescimento das colônias no meio LB3 líquido, uma alíquota foi misturada a glicerol 80% na proporção 1:1 e foram armazenadas a -80°C, o restante da solução de agrobactéria transformada foi submetido à indução para em seguida agroinocular por infiltração.

Para o procedimento de indução de agrobactéria foi utilizado o tampão de indução incompleto que contém em um volume total de 1L: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,5g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, citrato de sódio.2H<sub>2</sub>O 0,5g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (final 1mM) 0,25g, sacarose (final 0,2% p/v) 2g, glicerol (final 0.5%) 5mL.

Para iniciar o processo de indução, alíquotou-se 600 µL de solução bacteriana de *A. tumefaciens* com as construções (RNA1-CAM; RNA2- CAM ou LAV) em 3 mL de tampão de indução completo (sem antibiótico). O tampão de indução completo consiste de 40 mL de tampão de indução incompleto, 10 µL acetosyringone 200 mM (final 50 µM) em 100% DMSO e 400 µL MES 1M, pH5,6 (10 mM final).

A solução de indução (solução bacteriana e tampão de indução completo) foi incubada a 28°C por um dia sob agitação a 200 rpm. Após o período de agitação, a solução foi centrifugada por 10 min a 2.000 g (3.300 rpm) a 4°C e o precipitado foi ressuspendido com 2.5 mL de MS completo. Em seguida, mediu-se a absorbância a OD<sub>600</sub> e a concentração de bactéria foi ajustada para a OD<sub>600</sub> de 1,0 com meio MS. Um volume de 2 mL da solução foi agroinfiltrada na face abaxial de três ou quatro folhas jovens de plantas de *N. benthamiana* com cerca de um mês de idade. A agroinfiltração foi realizada com seringas sem agulhas.

As mesmas construções com indução também foram agroinfiltradas sem a indução a fim de avaliar a infectividade. Como PepRSV é um vírus bipartido foi necessário no momento da agroinfiltração misturar o RNA1 (OD:1) e RNA2 (OD:1) na mesma proporção. As construções agroinfiltradas foram:(1) RNA1 (CAM) com RNA2 (CAM); (2) RNA1

(CAM) com RNA2 (LAV); (3) RNA1 (CAM); (4) RNA2 (CAM); (5) RNA2 (LAV). O aparecimento de sintomas foi acompanhado por 7 dias após a agroinfiltração. Após uma semana, foi realizada coleta de amostra de folhas agroinfiltradas e não inoculadas para a detecção de vírus por dot-ELISA (técnica descrita no capítulo 2, item 2.2.6) para avaliar a infectividade dos clones nas plantas de *N. benthamiana*.

### 3.2.6 Análise do RNA2 do novo isolado (Ag1) de PepRSV

Com o objetivo de caracterizar um novo isolado de PepRSV, uma amostra coletada em Alexandre Gusmão, DF, com sintomas de infecção por PepRSV (Capítulo 2 – item 2.2.8) foi submetida à extração de RNA total (item 3.2.1), síntese de cDNA utilizando primers para o RNA2 de PepRSV (Tabela 3.1) e amplificação por PCR utilizando primers para a detecção de PepRSV. Os primers para a PCR foram construídos utilizando a sequência do segmento genômico do RNA2 de PepRSV, sendo: primer PepR2\_1198\_Seq\_For e primer PepR2\_deteccao2\_Rev (Tabela 3.4). Também foram avaliados os primers utilizados para amplificar o RNA2 completo (item 3.2.2, Tabela 3.2) dos isolados CAM e LAV.

**Tabela 3.4:** Sequências de primers usados na PCR para a amplificação do cDNA .

Nome	Sequência (5'→3')	Amplificação
PepR2_1198_Seq_For	TGGAAGTTCTGGGTCCG	cDNA -RNA2
PepR2_deteccao2_Rev	CAC CCA TAC CTA GCT CAT ACA C	cDNA- RNA2

Após a PCR, as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose a 1% de forma semelhante ao descrito no item 3.2.2. Como controles foram utilizadas amostras de *N. tabacum* cv. ‘Samsun’ infectadas com os isolado CAM e LAV, que também foram submetidas a esses procedimentos para a análise comparativa do tamanho dos fragmentos na eletroforese em 1% em gel de agarose.

### 3.3 RESULTADOS

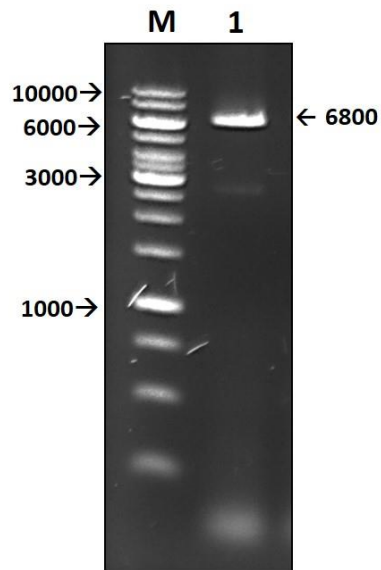
#### 3.3.1 Amplificação dos segmentos genômicos completos dos isolados (CAM e LAV) de PepRSV

Uma das primeiras etapas para a construção de um clone infeccioso consiste na clonagem dos segmentos genômicos completos do vírus.

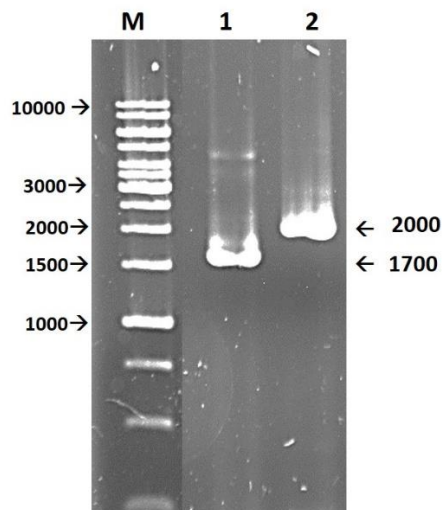
A combinação dos primers 5End\_PepRSV\_R1\_For e 3End\_PepRSV\_R1\_Rev foi utilizada para amplificar o fragmento de DNA correspondente ao RNA1 do isolado CAM (Figura 3.3). Fragmentos de DNA de tamanho esperado de 6,8 kb foram obtidos e utilizados para a construção do clone infeccioso de PepRSV RNA1 (CAM).

A amplificação de RNA1 do isolado LAV com os primers dirigidos para a clonagem do genoma completo não foi possível (dados não mostrados). Especula-se que o resultado negativo foi causado pela presença de sequências diferentes nas extremidades do RNA1 do isolado LAV. Devido a isso e com base no trabalho de Angenent *et al.* (1989) decidiu-se pelo uso do RNA1 do isolado CAM com o RNA2 de LAV.

Os primers PepRSV\_R2\_35s\_For e PepRSV\_R1/R2\_Rz\_Rev foram utilizados para a amplificação do genoma completo do RNA2 e o fragmento obtidos para o isolado CAM foi de 1,7 kb e para o isolado LAV de 2,0 kb (Figura 3.4). O tamanho dos fragmentos foi exatamente como esperado.



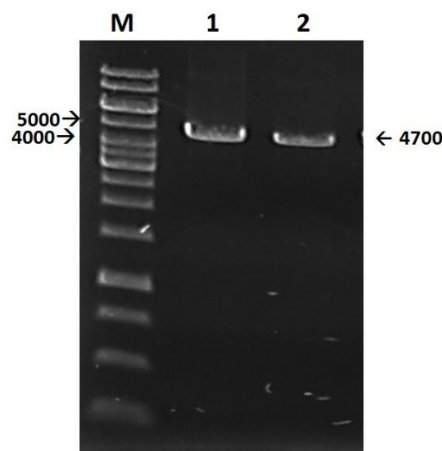
**Figura 3.3:** Análise da detecção do segmento genômico completo do RNA1 de PepRSV isolado CAM, amplificado utilizando a combinação de primers 5End\_PepRSV\_R1\_For e 3End\_PepRSV\_R1\_Rev. M = marcador GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1 = fragmento amplificado do genoma completo do RNA1 isolado CAM (6,8 kb).



**Figura 3.4:** Análise da detecção do segmento genômico completo do RNA2 de PepRSV isolado CAM e LAV, respectivamente, amplificado utilizando a combinação de primers PepRSV\_R2\_35s\_For e PepRSV\_R1/R2\_Rz\_Rev. M = marcador GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1 = fragmento amplificado do genoma completo do RNA2 isolado CAM de 1,7 kb e 2 = fragmento amplificado do genoma completo do RNA2 isolado LAV de 2,0 kb.

### 3.3.2 Construção dos clones infecciosos

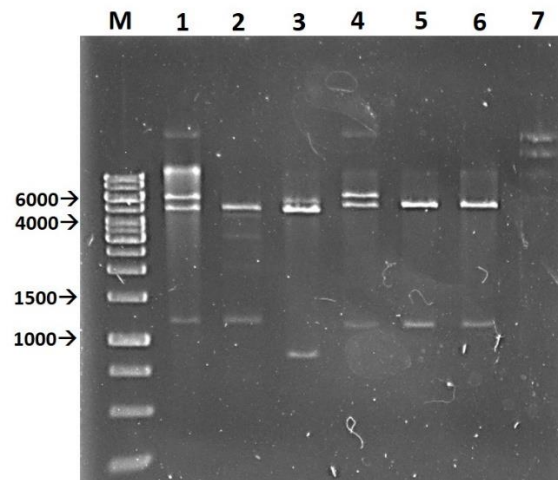
Para a construção dos clones infecciosos o "backbone" do vetor pJL\_89 foi amplificado com os primers contendo as regiões de sobreposição com o RNA1 (isolado CAM), 5End\_pJL\_Rev e 3End\_pJL\_For, resultando na amplificação do fragmento de 4,7 kb (Figura 3.5). A preparação de "backbone" do pJL\_89 por PCR para clonar os fragmentos de RNA2 (tanto para CAM como LAV) foi feita com outro par de primers pJL\_89\_Rev e pJL\_89\_For (Figura 3.5).



**Figura 3.5:** Análise do produto de PCR do vetor binário pJL\_89 utilizado para a construção do clone infeccioso. M = marcador GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1 = fragmento amplificado de 4,7 kb do vetor binário pJL\_89 com os primers 5End\_pJL\_Rev e 3End\_pJL\_For; 2 = fragmento amplificado de 4,7 kb do vetor binário pJL\_89 com os primers pJL\_89\_Rev e pJL\_89\_For.

Os fragmentos do RNA1-CAM, RNA2-CAM e RNA2-LAV foram purificados para a ligação com o "backbone" de pJL\_89 por G.A. e, após a reação, células de *E. coli* foram transformadas com as construções. Os clones obtidos foram analisados pela digestão com a endonuclease *EcoR* I e seus perfis foram avaliados por eletroforese. Para o RNA2 CAM, os clones corretos devem apresentar dois fragmentos, 5,1 kb e 1,3 kb; o RNA2 LAV, dois fragmentos, 5,5 kb e 1,3 kb. A digestão dos clones de RNA2 (CAM) e RNA2 (LAV) mostrou a geração de dois fragmentos para alguns dos clones (Figura 3.6). Os clones RNA2-

CAM1, RNA2-CAM2, RNA2-LAV1, RNA2-LAV2 e RNA2-LAV3 apresentaram o padrão esperado.



**Figura 3.6:** Análise do perfil da digestão com *EcoR* I dos clones do segmento genômico do RNA2 dos isolados CAM e LAV. M = marcador GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), **1** = perfil de restrição para do clone CAM1 RNA2 de PepRSV; **2** = perfil de restrição para do clone CAM3 RNA2 de PepRSV; **3** = perfil de restrição para do clone CAM4 RNA2 de PepRSV; **4** = perfil de restrição para do clone LAV1 RNA2 de PepRSV **5** = perfil de restrição para do clone LAV2 RNA2 de PepRSV e **6** = perfil de restrição para do clone LAV3 RNA2 de PepRSV; **7** = perfil do clone CAM1 RNA2 de PepRSV não digerido.

Para a construção RNA1-CAM foi selecionado o clone 3, para a construção RNA2-CAM o clone 1 e o clone 2 para a construção do RNA2-LAV. Após selecionar os clones, o inserto destes foram sequenciados.

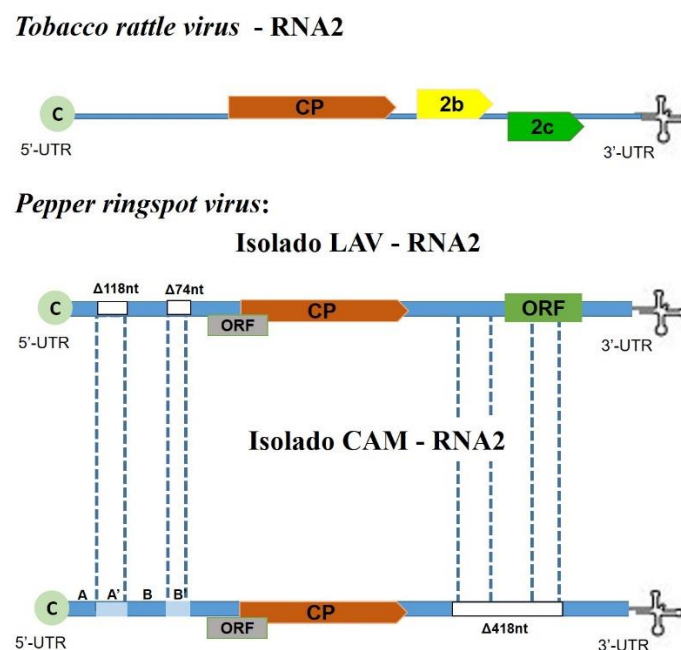
### 3.3.3 Análise da sequência nucleotídica dos clones selecionados dos isolados CAM e LAV de PepRSV

O clone RNA1-CAM3 foi comparado com a sequência do banco de dados NC\_003669 (RNA1 de PepRSV isolado CAM) e apresentou 100% de identidade nucleotídica. Isso mostrou que não foi detectada nenhuma alteração genômica neste isolado.

O clone RNA2-CAM1 foi comparado com a sequência depositada no banco de dados NC\_003670 (RNA2 de PepRSV isolado CAM) e apresentou 97% de identidade

nucleotídica. A ORF CP está mantida nesse clone e as demais estão ausentes (Figura 3.7). O clone RNA2-CAM1 apresentou identidade de sequência de 92% com a sequência de RNA2 do isolado LAV (depositada no banco de dados, AB826686) e também para a sequência do isolado Pivo4 (AB826687).

A sequência do inserto do clone RNA2-LAV2 foi idêntica à sequência AB826686, demonstrando que mutações e alterações na organização genômica não estão presentes no clone em relação à sequência original (Figura 3.7).



**Figura 3.7:** Representação da organização genômica do RNA2 da espécie TRV e da espécie PepRSV dos isolado LAV e CAM (Adaptado de Batista *et al.*, 2014).

### 3.2.5 Avaliação da infectividade dos clones

Foram selecionados os clones RNA1-CAM3, RNA2-CAM1 e RNA2-LAV2 para a agroinfiltração em plantas de *N. benthamiana*.

O efeito de tratamento de indução com acetosiringona para infectividade foi avaliada no ensaio. Para cada combinação de construção foram utilizadas duas plantas de *N. benthamiana*. As plantas foram observadas durante 7 dias após a agroinfiltração.



As plantas agroinoculadas com as construções RNA1-CAM3 e RNA2-CAM1 com indução apresentaram sintomas de bolhosidade e encarquilhamento nas folhas agroinfiltradas com 3 dias após a inoculação. Com 7 dias, as folhas não agroinfiltradas apresentaram sintomas severos de bolhosidade e encarquilhamento (Figura 3.8).

As plantas agroinfiltradas com a construção RNA1-CAM3 e RNA2-LAV2 com indução, apresentaram sintomas de bolhosidade e encarquilhamento nas folhas com 3 dias após a inoculação. Com 7 dias as folhas não agroinfiltradas apresentaram sintomas severos (Figura 3.9). Esse resultado sugeriu que os clones causaram infecção em *N. benthamiana*.

As plantas agroinfiltradas com as construções RNA1-CAM3 e RNA2-CAM1 e a construção RNA1-CAM3 e RNA2-LAV2 apresentaram sintomas semelhantes nas folhas agroinfiltradas e não agroinfiltradas (7 dias após a agroinfiltração), demonstrando que mesmo utilizando a combinação heteróloga de RNA1 e RNA2 de isolados distintos (CAM e LAV) houve infecção e os sintomas foram semelhantes em *N. benthamiana*.

As plantas agroinfiltradas com as construções RNA1-CAM3 e RNA2-CAM1 e a construção RNA1-CAM3 e RNA2-LAV2 sem a indução com acetosiringona apresentaram sintomas severos de bolhosidade e encarquilhamento nas folhas não agroinfiltradas após 7 dias de agroinfiltração (Figura 3.10 e 3.11), mostrando que mesmo sem o procedimento de indução os clones são altamente infecciosos em plantas de *N. benthamiana*.

Pepper ringspot virus: RNA1- CAM3; RNA2-CAM1 (Induzido)



**Figura 3.8:** Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções do segmento genômico RNA1 do isolado CAM clone 3 (RNA1-CAM3) e o segmento genômico do RNA2 do isolado CAM clone 1 (RNA2-CAM1) de PepRSV, induzido com acetosiringona, com sintomas de bolhosidade e encarquilhamento avaliado aos 7 dias após a inoculação.

Pepper ringspot virus: RNA1- CAM3; RNA2-LAV2 (Induzido)



**Figura 3.9:** Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções do segmento genômico RNA1 do isolado CAM clone 3 (RNA1-CAM3) e o segmento genômico do RNA2 do isolado LAV clone 2 (RNA2-LAV2) de PepRSV, induzido com acetosiringona, com sintomas de bolhosidade e encarquilhamento avaliado aos 7 dias após a inoculação.

Pepper ringspot virus: RNA1- CAM3; RNA2-CAM1 (Não induzido)



**Figura 3.10:** Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções do segmento genômico RNA1 do isolado CAM clone 3 (RNA1-CAM3) e o segmento genômico do RNA2 do isolado CAM clone 1 (RNA2-CAM1) de PepRSV, não induzidos com acetosiringona, com sintomas de bolhosidade e encarquilhamento avaliados aos 7 dias após a inoculação.

Pepper ringspot virus: RNA1- CAM3; RNA2-LAV2 (Não induzido)



**Figura 3.11:** Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções do segmento genômico RNA1 do isolado CAM clone 3 (RNA1-CAM3) e o segmento genômico do RNA2 do isolado LAV clone 2 (RNA2-LAV2) de PepRSV, não induzidos com acetosiringona, com sintomas de bolhosidade e encarquilhamento avaliados aos 7 dias após a inoculação.

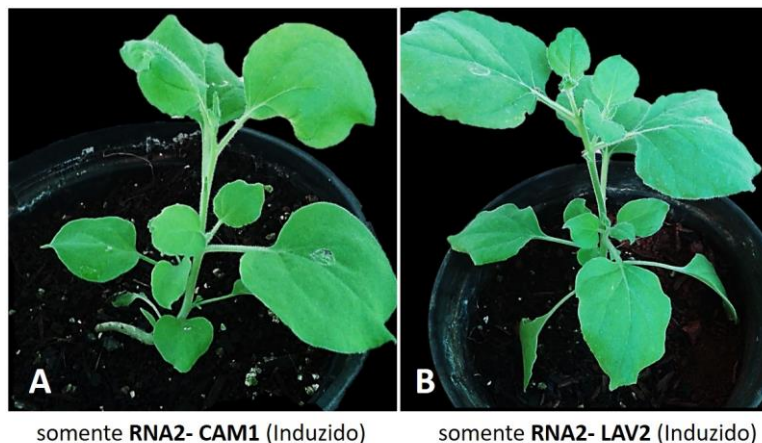
Inoculações com cada segmento, RNA1-CAM3, RNA2-CAM1 e RNA2-LAV2, isoladamente foram realizadas em plantas de *N. benthamiana* para avaliar a infectividade. As plantas agroinfiltradas com a construção RNA1-CAM3 apresentaram sintomas leves de

bolhosidade e encarquilhamento nas folhas agroinfiltradas e não agroinfiltradas (Figura 3.12). As plantas agroinfiltradas com os demais controles RNA2-CAM1 e RNA2-LAV2 não apresentaram sintomas (Figura 3.13).

*Pepper ringspot virus*: somente RNA1-CAM3 (Induzido)



**Figura 3.12:** Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas somente com a construção do segmento genômico RNA1 do isolado CAM clone 3 (RNA1-CAM3) de PepRSV, induzido com acetosiringona, com sintomas de leves de bolhosidade e encarquilhamento avaliado aos 7 dias após a inoculação.



**Figura 3.13:** Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções controle (induzido com acetosiringona) não apresentaram sintomas aos 7 dias após a inoculação. **A:** Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas somente com a construção do segmento genômico RNA2 do isolado CAM clone 1 (RNA2-CAM1) de PepRSV. **B:** Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com a construção do segmento genômico RNA2 do isolado LAV clone 2 (RNA2-LAV2) de PepRSV.

Com 7 dias após a inoculação foram coletadas de uma planta de *N. benthamiana* as folhas agroinfiltradas e não agroinfiltradas para a realização de teste de detecção de PepRSV por dot-ELISA utilizando o antissoro anti-CP produzido (Capítulo 2- item 2.2.6). Os tecidos vegetais de todas as plantas agroinfiltradas utilizadas para a detecção foram armazenados a -80°C. O resultado do dot-ELISA demonstrou detecção positiva de PepRSV em todas as folhas agroinfiltradas (AI) e não-inoculadas (S) para a construção RNA1-CAM3 e RNA2-CAM1 e a construção RNA1-CAM3 e RNA2-LAV2, induzidas e não induzidas (Figura 3.14).

		Amostras				Amostras	
Folhas coletadas	AI		RNA1CAM3; RNA2 CAM1 Induzido	Folhas coletadas	AI		RNA1CAM3; RNA2 CAM1 Não induzido
	S		RNA1CAM3; RNA2 CAM1 Induzido		S		RNA1CAM3; RNA2 CAM1 Não induzido
	AI		RNA1CAM3; RNA2 LAV2 Induzido		AI		RNA1CAM3; RNA2 LAV2 Não Induzido
	S		RNA1CAM3; RNA2 LAV2 Induzido		S		RNA1CAM3; RNA2 LAV2 Não Induzido
		Controles	-		<i>N. benthamiana</i> Controle (-)		
			+		<i>G. globosa</i> Controle (+)		

**Figura 3.14:** Detecção por dot-ELISA das construções dos clones de PepRSV em plantas de *N. benthamiana* após 7 dias de agroinfiltração. RNA1CAM3 = construção do segmento genômico RNA1 do isolado CAM clone 3; RNA2CAM1 = construção do segmento genômico RNA2 do isolado CAM clone 1; RNA2LAV2 = = construção do segmento genômico RNA2 do isolado LAV clone 2; AI = folha agroinfiltrada (não sistêmica); S = folha não agroinfiltrada (sistêmica); induzido e não induzido com acetosiringona. Controles da reação de dot-ELISA (+): controle positivo - amostra de *G. globosa* e (-) controle negativo - amostra de *N. benthamiana*.

As plantas agroinfiltradas com os controles RNA1-CAM3, RNA2-CAM1 ou RNA2-LAV2 foram avaliadas por dot-ELISA, como descrito anteriormente. PepRSV não foi detectado em folhas agroinfiltradas (AI) e nem em folhas não agroinfiltradas (S) de todas as

plantas-controle (Figura 3.15). Entretanto, a possível infecção nas plantas agroinfiltradas somente com RNA1-CAM3, que mostraram sintomas, serão confirmadas por outro teste, por exemplo "Northern Blotting". O resultado negativo nesta planta era esperado, já que a CP é codificada pelo RNA2, ausente na construção. Esses resultados demonstraram a capacidade infectiva dos clones produzidos em plantas de *N. benthamiana*.

		Amostras	
Folhas coletadas	AI		Controle RNA1CAM3
	S		Controle RNA1CAM3
	AI		Controle RNA2CAM1
	S		Controle RNA2CAM1
	AI		Controle RNA2LAV2
	S		Controle RNA2LAV2
Controles	-		<i>N. benthamiana</i> Controle (-)
	+		<i>G. globosa</i> Controle (+)

**Figura 3.15:** Detecção por dot-ELISA das construções individualizadas (controle) dos clones de PepRSV em plantas de *N. benthamiana* após 7 dias de agroinfiltração. RNA1CAM3 = construção do segmento genômico RNA1 do isolado CAM clone 3; RNA2CAM1 = construção do segmento genômico RNA2 do isolado CAM clone 1; RNA2LAV2 = construção do segmento genômico RNA2 do isolado LAV clone 2; AI = folha agroinfiltrada (não sistêmica); S = folha não agroinfiltrada (sistêmica). Controles da reação de dot-ELISA: (+) controle positivo - amostra de *G. globosa* e (-) controle negativo - amostra de *N. benthamiana*.

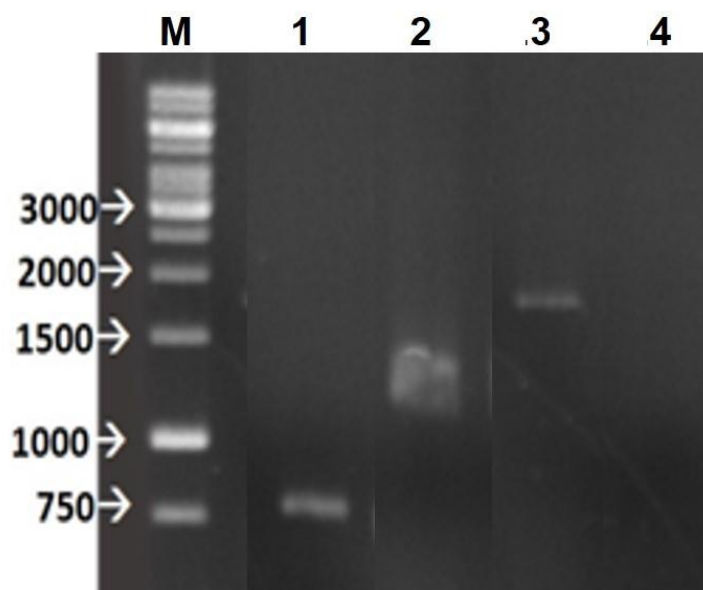
### 3.3.6 Análise do RNA2 do isolado Ag1 de PepRSV

As amostras coletadas em Alexandre Gusmão, DF, com sintomas de anéis e faixas cloróticas em folhas semelhantes aos sintomas de PepRSV foram avaliadas por dot-ELISA e



a infecção por PepRSV foi confirmada (Capítulo 2 – item 2.2.6). A detecção de PepRSV foi confirmada também por RT-PCR. Os primers PepR2\_1198\_Seq\_For e PepR2\_deteccao2\_Rev foram utilizados para detecção por RT-PCR e resultou na amplificação do RNA2 com a produção de um fragmento de 1,8 kb (Poço 1. Figura 3.16). Fragmentos de tamanhos esperados foram obtidos para os isolados CAM (0,75 kb - poços 3 e 4. Figura 3.16) e LAV (1,4 kb - poços 5 e 6. Figura 3.16). Concluiu-se que o isolado Ag1 possui um RNA2 maior que os isolados CAM e LAV.

Não foi possível amplificar o RNA2 completo do isolado Ag1 utilizando os mesmos primers das extremidades para a construção do clone infeccioso. Isso sugeriu que a sequência da porção terminal deste isolado pode ser distinta dos isolados CAM e LAV.



**Figura 3.16:** Análise da amplificação do RNA2 de PepRSV isolado Ag1, CAM e LAV, respectivamente, amplificado utilizando a combinação de primers PepR2\_1198\_Seq\_For e PepR2\_deteccao2\_Rev. M = marcador GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1 = fragmento amplificado do RNA2 de PepRSV isolado CAM (0,75 kb); 2 = fragmento amplificado do RNA2 de PepRSV isolado LAV (1,4 kb); 3 = fragmento amplificado do RNA2 de PepRSV isolado Ag1 (1,8 kb); 4 = controle negativo.

### 3.4 DISCUSSÃO

O genoma completo conhecido do RNA1 de PepRSV isolado CAM é constituído de 6828 nt e o RNA2 de 1699 nt (Macfarlane, 1999). Por RT-PCR, foi possível obter amplificação de fragmentos de DNA de tamanhos compatíveis de 6,8 kb (RNA1) e 1,7 kb (RNA2), que foram direcionados para a construção dos clones infecciosos. O RNA2 genômico do isolado LAV de PepRSV apresentou tamanho aproximado de 2,0 kb, semelhante ao anteriormente sequenciado por Batista *et al.* (2014). Isso indica que o genoma dos isolados CAM e LAV é estável e não houve deleções ou adições visíveis no tamanho total dos segmentos genômicos em relação aos isolados originais.

O segmento genômico responsável pela transmissão por nematoides dos tobrovírus é o RNA2 demonstrado primeiramente através de pseudo-recombinantes com os isolados do tipo NM (somente RNA1) e M (RNA1 e RNA2) de TRV (Ploeg *et al.*, 1993). As proteínas não estruturais necessárias para que ocorra a transmissão foram denominadas 2b e 2c de RNA2 e estão presentes na região 3' terminal do RNA2 de TRV e PEBV (Vassilakos *et al.*, 2001).

O segmento RNA2 de PepRSV apresenta características peculiares e análises biológicas e moleculares aprofundadas são necessárias para a compreensão de mecanismo de transmissão por nematoide desse vírus. O RNA2 do isolado CAM apresenta o tamanho de 1,7 kb apresentando uma deleção de 418nt na região 3' terminal quando comparado com o isolado LAV (Batista *et al.*, 2014). Acredita-se que esta deleção está relacionada à forma de manutenção do isolado durante anos em casa de vegetação por inoculação mecânica (Hernandez *et al.*, 1996). O RNA2 do isolado LAV apresenta uma possível ORF na região 3' terminal após o gene de capa protéica, que pode estar relacionado à transmissão por nematoide, mesmo esta proteína não possuindo homologia com a proteína 2b de TRV e



PEBV (Batista *et al.*,2014). Um dos objetivos de construir os clones infecciosos de CAM e LAV reside no interesse de elucidar o mecanismo de transmissão do vírus por nematoide.

Curiosamente, a amplificação de parte do genoma de um isolado de campo de PepRSV, denominado de Ag1, resultou em um fragmento correspondente ao RNA 2 de tamanho superior àquele dos outros isolados. Devido a esta característica existe a chance deste isolado Ag1 apresentar as ORFs relacionadas à transmissão por nematoide. O isolado Ag1 foi submetido à reação de amplificação do segmento completo do RNA2 com os primers das extremidades utilizados para amplificar o segmento completo dos isolado CAM e LAV, mas não ocorreu a amplificação do fragmento. Isso sugeriu que o isolado Ag1 apresenta diferenças na sequência nucleotídica nas extremidades sendo necessário um futuro trabalho para a determinação de sequências utilizando as técnicas de 5' e 3' RACE.

A estratégia de Gibson Assembly descrita por Blawid & Nagata (2015) foi selecionada para a construção dos clones infecciosos de PepRSV. A grande vantagem desta técnica reside na possibilidade de clonagem de insertos em vetor plasmidial com as extremidades 5'e 3' intacta sem adição de qualquer nucleotídeo extra ao genoma original. A identidade nucleotídica do clone RNA1-CAM3 foi 100 % comparado com a sequência depositada no banco de dados (NC\_003669, RNA1 de PepRSV CAM) demonstrando que não ocorreram mutações entre o isolado CAM original e o CAM atual. O que não aconteceu para a análise comparativa do RNA2. A sequência do RNA2 do isolado CAM atual apresentou 97% de identidade nucleotídica comparado com a sequência depositada (NC\_003670) do RNA2 de PepRSV CAM. Essa diferença de 3% não alterou a expressão dos sintomas quando inoculado com o clone infeccioso em plantas de *N. benthamiana*. Análises detalhadas da infectividade serão realizadas em breve.

Durante o ensaio de avaliação da infectividade dos clones infecciosos foi possível obter sintomas severos de bolhosidade e encarquilhamento a partir de 3 dias após a

inoculação com e sem o procedimento de indução. Isso é indicativo que mesmo sem procedimento de indução com acetoseringona, a expressão de genes *vir* ocorre em nível basal. Pelos nossos ensaios, a indução de genes *vir* com acetoseringona não é essencial para a recuperação de PepRSV por agroinfiltração.

As plantas agroinfiltradas com a construção RNA1-CAM3 e RNA2-LAV2, isto é a combinação de RNA1 e RNA2 heterogêneos (oriundo de isolados diferentes de PepRSV), apresentaram sintomas severos de bolhosidade e encarquilhamento, confirmando a recuperação de vírus quimérico intra-específico. Esta compatibilidade foi esperada, pois a compatibilidade de combinação de RNA1 e RNA2 interespecífico foi demonstrada anteriormente (Angenent *et al.*,1989) e será importante para a realização de trabalhos focados especificamente nas alterações genômicas e biológicas relacionadas apenas ao RNA2 do vírus.

Quando apenas o clone RNA1-CAM3 foi agroinfiltrado, as plantas desenvolveram os sintomas de bolhosidade e encarquilhamento, semelhante ao observado nas plantas inoculadas com as construções com os dois segmentos genômicos (RNA1 e RNA2). A detecção de vírus por dot-ELISA com o antissoro anti-CP foi negativa para estas plantas inoculadas com o clone RNA1 sozinho, pois RNA1 não codifica a capa proteica, mas sim o RNA2. Acredita-se que somente com o RNA 1 o vírus pode estabelecer a infecção em *N. benthamiana*. Já foi demonstrada a infecção sistêmica do TRV em *N. benthamiana* quando somente o segmento genômico do RNA1 foi inoculado (Swanson *et al.* 2002) como a infecção do tipo NM. Mais tarde Swanson *et al.* (2002) demonstraram que na infecção do tipo NM do TRV houve translocação sistêmica do RNA1. Apesar desse exemplo, o estabelecimento de infecção sistêmica somente com RNA1-CAM3 de PepRSV precisa ser demonstrado por Northern blotting ou outro método que detecte a fita de RNA1 nas amostras.

A construção dos clones de PepRSV abre possibilidades para estudar as características biológicas e moleculares desta espécie, que apresenta peculiaridades quando comparado com as espécies TRV e PEBV. Inicialmente, planeja-se estudar a proteína viral envolvida na transmissão por nematoide, inclusive incorporando no estudo o novo isolado Ag1 com o RNA2 maior que o isolado LAV.

### 3.5 CONCLUSÕES

Foi possível amplificar e clonar o RNA1 (6,8 kb - CAM) e RNA2 (1,7 kb – CAM e 2,0 kb – LAV) completo de PepRSV por RT-PCR.

Há 3% de diferença na sequência de nucleotídeos entre o novo clone do RNA2 isolado CAM de PepRSV quando comparado com as sequências (NC\_003670) do RNA2 de PepRSV CAM depositadas em bancos de dados.

Os clones produzidos (RNA1-CAM3 e RNA2-CAM1; RNA1-CAM3 e RNA2-LAV2) de PepRSV são infecciosos e causam sintomas severos de bolhose e encarquilhamento em plantas de *N. benthamiana*.

O RNA2 do isolado LAV é compatível com o RNA1 de CAM, produzindo infecção sistêmica em plantas de *N. benthamiana* inoculadas.

A inoculação de apenas o clone do segmento genômico do RNA1-CAM3 causa sintomas leves em folhas não inoculadas de *N. benthamiana* semelhantes às causadas pelos clones de PepRSV com os dois segmentos genômicos (RNA1 e RNA2).

O novo isolado Ag1 de PepRSV apresenta um RNA2 de 0,4 kb maior que o RNA2 do isolado LAV e 1,05 kb maior que o RNA2 do isolado CAM.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foram elucidadas questões importantes sobre as características biológicas do PepRSV, permitindo a expansão do conhecimento sobre o único tobrovírus relatado no Brasil. Além disso, os estudos possibilitaram o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas que facilitarão os estudos de tópicos ainda não abordados nas pesquisas com o vírus.

Testes sorológicos com o uso de antissoro anti-CP de PepRSV serão especialmente úteis na detecção de PepRSV em amostras de campo, viabilizando a expansão de estudos sobre a epidemiologia da doença e detecção de novos isolados. Exemplo disso foi a detecção do isolado Ag1 de PepRSV em campo de tomateiro. Será de grande interesse estudar o segmento genômico do RNA2 do isolado Ag1 que se distingue dos demais isolados de PepRSV (CAM, LAV e Pivo4).

Está é a primeira produção de clones infecciosos de PepRSV com sucesso. O clone infeccioso poderá ser utilizado para diversos estudos, como aqueles relacionados à transmissão por nematoides, de uso como vetor viral, de translocação do vírus na hospedeira, e muitos outros. A proteína necessária para a transmissão de PepRSV pelos nematoides ainda não foi identificada e poderá ser conhecida utilizando os clones infecciosos produzidos. O vetor TRV é muito utilizado, particularmente como vetor de VIGS, porém, o seu uso não é permitido no Brasil por se tratar de um vírus quarentenário. Assim sendo, o desenvolvimento de um vetor de PepRSV poderá contribuir fortemente para o avanço dos estudos de interação vírus-planta-vetor e nos trabalhos biotecnológicos (vetor de VIGS e de expressão). Ainda permanece em aberto o processo de infecção somente com RNA1, cujo movimento viral sistêmico poderá ser elucidado a partir de trabalhos com os clones infecciosos. O que dizer sobre a interação das partículas virais de PepRSV com as mitocôndrias? Há muito o que fazer!

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.; ANTONIW, J. & KREUZE, J., 2009. Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. *Arch Virol* 154:1967-1972.
- ADAMS, M.J.; HEINZE, C.; JACKSON, A.O.; KREUZE, J.F.; MACFARLANE, S.A. & TORRANCE, L. 2012. Family Virgaviridae. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. *Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. International Union of Microbiological Societies – Virology Division. London: Elsevier, v. 8, p. 1462.
- AHLQUIST, P. & JANDA, M. 1984. cDNA cloning and in vitro transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Molecular and Cellular Biology* 4:2876-2882.
- AHLQUIST, P.; FRENCH, R.; JANDA, M. & LOESCH-FRIES, L. 1984. Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:7066-7070.
- ALLEN, T. C. & DAVIS, J. R. 1982. Distribution of tobacco rattle virus and potato virus x in leaves, roots, and fruits and/or seeds of naturally-infected weeds. *American Journal of Potato Research* 59:149-153.
- ALMEIDA, M. T. S. C. M. & DECRAEMER, W. 2005. Trichodoridae, Família de nematóides vetores de vírus. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.

- & PICININI, E. C. 2005 (eds.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Rapp 13:115-90.
- ALMEIDA, M. T. S. C. M., 2005. Trichodoridae, família de nematóides vetores de vírus. s.l.:RAPP, Volume 13.
- ANGENENT, G. C.; POSTHUMUS, E. & BOL, J. F. 1989. Biological activity of transcripts synthesized in vitro from full-length and mutated DNA copies of tobacco rattle virus RNA 2. *Virology* 173:68-76.
- BATISTA, A. R. S.; NICOLINI, C.; RODRIGUES, K. B.; MELO, F. L.; VASQUES, R. M.; MACÊDO, M. A.; INOUE-NAGATA, A. K. & NAGATA, T. 2014. Unique RNA 2 sequences of two Brazilian isolates of Pepper ringspot virus, a tobnavirus. *Virus Genes* 49:169-173.
- BERGH, S. T.; KOZIEL, M. G.; HUANG, S.-C.; THOMAS, R. A.; GILLEY, D. P. & SIEGEL, A. 1985. The nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA- 2 (CAM strain). *Nucleic Acids Research* 13:8507-8518.
- BLAWID, R. & NAGATA, T. 2015. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. *J. of Virological Methods* 222:11-15.
- BOULTON, R. E. 1996. Pea early-browning tobnavirus. *Plant Pathology* 45: 13–28.

- BRAKKE, M. K. 1967. Density-gradient centrifugation. In: MARAMOROSCH, K. & KOPROWSKI, H. (Eds.), *Methods in Virology* 2:93-118.
- BROWN, D. J. F. & WEICHER, B. 1998. Specificity, exclusivity and complementarity in the transmission of plant viroses by parasitic nematodes: an annotated terminology. *Fund. And Appl. Nematol*, 21:1-11.
- CADMAN, C. H. & HARRISON, B. D. 1959. Studies on the properties of soil-borne viruses of the tobacco-rattle type occurring in Scotland. *Annals of Applied Biology* 47:542-556.
- CHAGAS, C. M. & SILBERSCHMIDT, K. 1972. Vírus da faixa amarela da alcachofra: ocorrência, transmissão e propriedades físicas. *Biológico* 38:35-40.
- CHAGAS, C. M.; COLARICCIO, A.; RIVAS, E. & FERRARI, J.T. 1987. Infecção natural de gérbera por um vírus do grupo "rattle" do fumo. *Fitopatologia brasileira* 12:146.
- COIRO, M.I. & SASANELLI, N. 1994. The life cycle and reproductive potential of individual *Trichodorus sparsus* (Nematoda) on *S. Lucie* cherry. *Nematol. Mediterranea* 22:233-6.
- COSTA, A. S. & KITAJIMA, E. W. 1968. Transmissão do vírus do anel de pimentão através da semente de tomate. 2ª reunião Sociedade Brasileira Fitopatologia, Viçosa 2:25-32.



- CUPERTINO, F. P.; DE SÁ, P. B. & KITAJIMA, E. W. 1991. Propriedades biológicas de um isolado do vírus do anel do pimentão causando faixa amarela em tomateiros no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 16:251-256.
- DALE, M.F.B.; ROBINSON, D.J.; GRIFITHS, D.W.; TODD, D. & BAIN, H. 2000. Effects of tuber-borne M-type strain of tobacco rattle virus on yield and quality attributes of potato tubers of the cultivar Wilja. *Eur. J. Plant Pathol* 106:275–282.
- DECRAEMER, W. 1995. The family Trichodoridae: Stubby root and Virus vector Nematodes. *Developments in Plant Pathology*, volume 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston and London.
- EAMENS, A.; WANG, M. B.; SMITH, N. A. & WATERHOUSE, P. M. 2008. RNA silencing in plants: Yesterday, today and tomorrow. *Plant Physiol* 147:456-68.
- ESAU, K., 1979. Beet yellow stunt virus in cells of *Sonchus oleraceus* L. and its relation to host mitochondria. *Virology* 98:1-8.
- GAMA, M. I. C. S.; KITAJIMA, E. W. & HUANG, C. S. 1983. Infecção natural de patchuli (*Pogostemum patchuli*) pelo vírus do anel do pimentão. *Fitopatologia brasileira* 8:395-401.
- GASPAR, J.; VEGA, J.; CAMARGO, I.; COSTA, A. 1984. An ultrastructural-study of particle distribution during microsporogenesis in tomato plants infected with the

brazilian tobacco rattle virus. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, Ottawa 62:372-378.

GOULDEN, M. G.; LOMONOSSOFF, G. P.; WOOD, K. R. & DAVIES, J. W. 1992. A model for the generation of tobacco rattle virus (TRV) anomalous isolates: pea early-browning virus RNA2 acquires TRV sequences from both RNA1 and RNA2. *Journal of General Virology* 72:1751–1754.

GREEN, M. R. & SAMBROOK, J. 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4rd ed. Plainview, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

HAMILTON, W. D. O. & BAULCOMBE, D. C. 1989. Infectious RNA produced by in vitro transcription of a full-length tobacco rattle virus RNA-1 cDNA. *Journal of General Virology* 70:963-968.

HAMILTON, W. D. O.; BOCCARA, M.; ROBINSON, D. J. & BAULCOMBE, D. C. 1987. The complete nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA- 1. *Journal of General Virology* 68:2563-2575.

HARRISON, B. D. & ROBINSON, D. J. 1978. The tobnaviruses. *Advances in Virus Research* 23:25–77.

HARRISON, B. D. & ROBINSON, D. J. 1986. Tobnaviruses. In *The Plant Viruses*. Edited by M. H. V. van Regenmortel & H. Fraenkel-Conrat. New York: Plenum Press vol. 2, p. 339-369.

- HARRISON, B.; ROBINSON, D. 1986. "Tobraviruses". In: REGENMORTEL, M.H.V.; FRAENKEL-CONRAT, H. (Eds.). *The Plant Viruses - The Rod- Shaped Viruses*, New York: Plenum Press 2:1- 339.
- HARRISON, B.D.; ROBERTSON, W. & TAYLOR, C.E. 1974. Specificity of retention and transmission of viroses by nematodes. *J. of Nematol* 6:155-64.
- HELLENS, R. & MULLINEAUX, P. 2000. A guide to agrobacterium binary Ti vectors *Trends in Plant Science* 10:1360-1385.
- HERNÁNDEZ, C.; MATHIS, A.; BROWN, D. J. F. & BOL, J. F. 1995. Sequence of RNA 2 of a nematode-transmissible isolate of tobacco rattle virus. *Journal of General Virology* 76:2847-2851.
- HERNÁNDEZ, C.; CARETTE, J. E.; BROWN, D. J. F., & BOL, J. F. 1996. Serial passage of tobacco rattle virus under different selection conditions results in deletion of structural and non-structural genes in RNA2. *J. Virol* 70:4933-4940.
- HERNÁNDEZ, C.; VISSER, P. B.; BROWN, D. J. F. & BOL, J. F. 1997. Transmission of tobacco rattle virus isolate PpK20 by its nematode vector requires one of the two non-structural genes in the viral RNA 2. *Journal of General Virology* 78:465-467.

- HERRERA-ESTRELLA, L.; DE BLOCK, M.; MESSENS, E.; HERNALSTEENS, J. P.; VAN MONTAGU, M. & SCHELL, J. 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2:987 -995.
- HEWITT, W.B.; RASKI, D.J & GOHEEN, A.C. 1958. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology* 48:586-95.
- HUGHES, G.; DAVIES, J. W. & WOOD, K. R. 1986. In vitro translation of the bipartite genomic RNA of pea early browning virus. *Journal of General Virology* 67:2125-2133.
- HULL, R. 2014. *Plant Virology*. 5 ed. London: Elsevier.
- HUTVAGNER, G. & ZAMORE, P., 2002. A microRNA in a multiprotein RNAi enzyme complex. *Science* 297:2056-60.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2015. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_%5Bmensal%5D/Fasciculo/2015/lspa\\_201501.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/2015/lspa_201501.pdf)>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017.
- KARANASTASI, E.; DECRAEMER, W. & BROWN, D. 2000. Ultrastructure of the body cuticle of trichodoridae nematodes and comparison with other nematode taxa

(Trichodoridae, Triplenchida). Mededeling van de Faculteit Landbouwkundige en toegepaste biologische wetenschappen. MFLBER 65:515-521.

KARANASTASI, E.; WYSS, U. & BROWN, D. J. F. 2003. Na in vitro examination of the feeding behaviour of *Paratrichodorus anemones* (Nematoda: Trichodoridae), with comments on the ability of the nematode to acquire and transmit Tobravirus particles. *Nematology* 3:421-34.

KITAJIMA, E. & LOVISOLO, O. 1972. Mitochondrial aggregates in *Datura* leaf cells infected with henbane mosaic virus, *Journal of General Virology* 16:265-271.

KITAJIMA, E. W. & COSTA, A. S. 1969. Association of Pepper Ringspot Virus (Brazilian tobacco rattle virus) and host cell mitochondria. *Journal of General Virology, London* 4:177-181.

KITAJIMA, E. W.; MARTINS, C. R. F.; LIMA, M. I. & OLIVEIRA, L. H. R. 1991. Faixa amarela das folhas de bico-de-tucano (*Columnea* sp., Gesneriaceae) associada ao vírus do anel-do-pimentão. *Fitopatologia brasileira*. 16: XXVII.

KITAJIMA, E. W.; OLIVEIRA, A. R.; COSTA, A. S. 1969. Morfologia das partículas do vírus do anel do pimentão. *Bragantia* 28:1-22.

KOONIN, E. V. 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* 72:2197-2206.

- KOONIN, E. V.; BOYKO, V. P. & DOLJA, V. V. 1991. Small cysteine-rich proteins of diferente groups of plant RNA viruses are related to diferente families of nucleic acid-binding proteins. *Virology* 181:395-398.
- LINDBO, J. 2007. TRBO: a high-efficiency Tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiol* 145:1232–1240.
- LIU, Y.; REN, D.; PIKE, S.; PALLARDY, S.; GASSMANN, W. & ZHANG, S. 2007. Chloroplast generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *The Plant Journal, Malden* 51:941-954.
- LOPES, C. A.; REIS, A. & DE ÁVILA, A. C. 2003. Principais doenças do tomate para mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. *Informe Agropecuario, Belo Horizonte* 24:66-78.
- MAAT, D. Z. 1963. Pea early-browning virus and tobacco rattle virus- two different, but serologically related viroses. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 69: 287-293.
- MACFARLANE, S. A. 1997. Natural Recombination among Plant Virus Genomes: Evidence from Tobraviruses. *Seminars in VIROLOGY* 8:25-31.
- MACFARLANE, S. A. 1999. The molecular biology of the tobnaviruses. *Journal of General Virology, London* 80:2799–2807.

MACFARLANE, S. A. 2010. Tobraviruses – plant pathogens and tools for biotechnology. *Molecular Plant Pathology* 11:577-583.

MACFARLANE, S. A.; BROWN, D. J. F. & BOL, J. F. 1995. The transmission by nematodes of tobnaviruses is not determined exclusively by the virus coat protein. *European Journal of Plant Pathology* 101:535-539.

MACFARLANE, S. A.; GILMER, D. & DAVIES, J. W. 1992. Efficient inoculation with CaMV 35S promoter-driven DNA clones of the tobnavirus PEBV. *Virology* 187:829-831.

MACFARLANE, S. A.; WALLIS, C. V. & BROWN, D. J. F. 1996. Multiple virus genes involved in the nematode transmission of pea early browning virus. *Virology* 219:417-422.

MACFARLANE, S. A.; WALLIS, C. V.; TAYLOR, S. C.; GOULDEN, M. G.; Wood, K. R. & DAVIES, J. W. 1991. Construction and analysis of infectious transcripts synthesized from full-length cDNA clones of both genomic RNAs of pea early browning virus. *Virology* 182:124-129.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.  
Instrução Normativa nº 41, de 01 de julho de 2008.

MUHIRE B. M.; VARSANI A. & MARTIN, D. P. 2014. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. PLoS ONE 9:e108277.

MURAI, N. 2013. Review: plant binary vectors in Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* with a broad host-range replicon of pRK2, pRi, pSa, or pVS1. American Journal of Plant Sciences 4:932-39.

NIXON, H.L. & HARRISON, B.D. 1959. Electron microscopic evidence on the structure of the particles of tobacco rattle virus. Journal of General Microbiology, London 21:582-590.

OFFORD, R. E. 1966. Electron microscopic observations on the substructure of tobacco rattle virus. Journal of Molecular Biology 7:370-375.

OTULAK, K.; KOZIEL, E. & GARBACZEWSKA, G. 2015. Ultrastructural impact of Tobacco Rattle Virus on Tobacco and Pepper Ovary and Anther Tissues. Journal of Phytopathology, Poland, Micron 70:7–20.

PITCHER, R..S. 1967. The host-parasitic relations and ecology of *Trichodorus viruliferus* on apple roots, as observed from an underground laboratory. Nematologica 13:547-57.



- PLOEG, A. T.; ASJES, C. J. & BROWN, D. J. F. 1991. Tobacco rattle virus serotypes and associated nematode vector species of Trichodoridae in the bulb-growing areas in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97:311–319.
- PLOEG, A. T.; ROBINSON, D. J. & BROWN, D. J. F. 1993. RNA-2 of tobacco rattle virus encodes the determinants of transmissibility by trichodorid vector nematodes. *Journal of General Virology* 74:1463–1466.
- POLAK, Z.; KRALIK, O. & CECH, M. 1968. A Virus of Tobacco Rattle Group Naturally Occurring in *Plantago* sp. in Czechoslovakia. *Biol. Plant* 10:31-36.
- RIKHVANOV, E. G.; GAMBURG, K. Z.; VARAKINA, N. N.; RUSALEVA, T. M.; FEDOSEEVA, I. V.; TAUSON, E. L.; STUPNIKOVA, I. V.; STEPANOV, A. V.; BOROVSKII, G. B. & VOINIKOV, V. K. 2007. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture. *The Plant Journal, Malden* 52:763-778.
- ROBERTS, D. A. 1964. Local-lesion assay of plant viroses. In: CORBERTT, M. K. & SISLER, H. D. (Eds.), *Plant Virology*: Univ. Florida Press, Gainesville:194-210.
- ROBINSON, D. J. & HARRISON, B. D. 1985. Evidence that broad bean yellow band virus is a new serotype of pea early-browning virus. *Journal of General Virology* 66,2003–2009.
- ROBINSON, D. J. & HARRISON, B. D. 1989. Tobacco rattle virus. *CMI:AAB Descriptions of Plant Viruses*, n.346.

- ROZANOV, M. N.; KOONIN, E. V. & GORBALENYA, A. E. 1992. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the Sindbis-like supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* 73: 2129-2134.
- RUSSO, M. & MARTELLI, G., 1981. The fine structure of *Cymbidium ringspot virus* in host tissues. II. Light and electron microscopy of localized infections. *J Ultrastruct Res* 77:105-118.
- SALOMÃO, T. A.; SILBERSCHMIDT, K. M. & WEIGL, D. R. 1969. Transmissão da doença 'faixa amarela brasileira do tomateiro' pelo solo. *Biológico* 35:79-84.
- SANGER, H. L., 1969. Functions of the Two Particles of Tobacco. *Journal of Virology* 3:304-312.
- SILBERSCHMIDT, K. M. 1963. Studies on a Brazilian tomato ringspot disease. *Phytopath. Z.* 46:209-229.
- SILBERSCHMIDT, K. M.; WEIGL, D. R. & SALOMÃO, T. 1970. Some electron microscopic observation on tobacco cells invaded by the Brazilian tomato yellow band disease virus. *Phytopath. Z.* 68:210-20.
- SILVA, D. M. 1965. Estudos sobre purificação, composição e algumas propriedades do vírus do anel do pimentão. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, E.S.A 'Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1-106.

- SOL, H. H.; VAN HEUVEN, J. C. & SEINHORST, J. W. 1960. Transmission of rattle virus and atropa belladonna mosaic virus by nematodes. *Tijdschrift voor Plantenziekten* 66:228-31.
- SOUZA DIAS, J. A. C.; VEGAS, J.; MALLOZZI, P.; MIRANDA FILHO, H. S.; TEIXEIRA, P. R. M. & COSTA, A. S. 1979. Ocorrência de infecção natural de batata por vírus do grupo do anel do pimentão em São Paulo. *Summa Phytopathol* 5:21.
- SWANSON, M.; BARKER, H. & MACFARLANE, S.A. 2002. Rapid vascular movement of tobamoviruses does not require coat protein:evidence from mutated and wild-type viruses. *Annals of Applied Biology* 141:259–266.
- TAYLOR, C. E. & ROBERTSON, V. M. 1970. Location of Tobacco Rattle Virus in the nematode vector, *Trichodorus pachydermus* Seinhorst. *J. of General Virol.* 6:179-82.
- TOMARI, Y.; MATRANGA, C.; HALEY, B.; MARTINEZ, N. & ZAMORE, P. D. 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306:1377-80.
- UNVER, T. & BUDAK, H. 2009. Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. *Int. J. Plant Genomics* 198680:1-8.
- VAN HOOFF, H. A. 1964. Serial transmission of rattle virus by a single male of *trichodorus pachydermus* seinhorst. *Nematologica* 10:141-144.

VASSILAKOS, E. K.; VELLIOS, E. C.; BROWN, D. J. F. & MACFARLANE S. 2001. A.

Tobravirus 2b protein acts in trans to facilitate transmission by nematodes. *Virology*,  
279:478–487.

ZAMBRYSKI, P.; JOOS H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M. &

SCHELL, J. S. 1983. Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells  
without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2:2143-2150.