

**ANDRÉ DA SILVA XAVIER**

**EFEITO DO SILENCIAMENTO DOS GENES *DnaJ* E *TCTP* NA INFECÇÃO  
DE TOMATEIRO E *Nicotiana benthamiana* PELO POTYVÍRUS *Pepper yellow*  
*mosaic virus* (PepYMV)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

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

T

X3e  
2012

Xavier, André da Silva, 1987-

Efeito do silenciamento dos genes *DnaJ* e *TCTP* na infecção de tomateiro e *Nicotiana benthamiana* pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) / André da Silva Xavier. – Viçosa, MG, 2012.  
ix, 61f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Francisco Murilo Zerbini Junior

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 49-61

1. Vírus de plantas. 2. Potyvírus. 3. Tomate - Doenças e pragas - Aspectos genéticos. 4. Relação hospedeiro-parasita. 5. Genética vegetal. 6. *Pepper yellow mosaic virus*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 632.8

**ANDRÉ DA SILVA XAVIER**

**EFEITO DO SILENCIAMENTO DOS GENES *DnaJ* E *TCTP* NA INFECÇÃO  
DE TOMATEIRO E *Nicotiana benthamiana* PELO POTYVÍRUS *Pepper yellow  
mosaic virus* (PepYMV)**

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

APROVADA: 20 de Julho de 2012

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

---

Profa. Poliane Alfenas Zerbini  
(Coorientadora)

---

Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior  
(Orientador)

*“Elas tem seu mundo particular,  
Trazê-las ao mundo real é uma missão,  
Tê-las por perto é um fenômeno e cuidar é dom,  
Olhar como elas é ver que a beleza não precisa de adornos,  
Sentir como elas é perceber os extremos do mundo:  
O preconceito em sua forma mais radical e o amor em sua forma mais verdadeira.”*  
*À todas crianças especiais (excepcionais), em nome da minha princesinha **Andrielly**  
e à todos os pais e irmãos especiais que receberam o presente de Deus de cultivar essas  
flores, em nome da minha mãe **Linda**, meu pai **José** e meu irmão **Alexandre***

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas lutas e conquistas, pelos pesares e alegrias, mas acima de tudo por estar sempre ao meu lado;

Aos meus pais José e Linda e meus irmãos Alexandre e Andrielly, pelo exemplo de superação, compreensão, dedicação e amor depositado em cada momento da minha vida e sem dúvida por simplesmente serem minha razão de viver;

Às minhas avós Nete e Carminha (*In memorian*), mulheres benditas que perfumavam as enxadas e enchiam de vida a terra arada, pelo exemplo de força, honestidade, coragem, humildade e amor;

Ao meu avô Macelino, pelo seu exemplo, pelo sorriso no rosto a cada fim de tarde e pelas broncas a cada amanhecer, enfim por tudo que contribuiu até aqui;

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Prof. Francisco Murilo Zerbini, pela orientação, oportunidade, amizade e por todos os ensinamentos;

À Prof<sup>a</sup>. Poliane Alfenas-Zerbini eternizada em minha carreira pelos ensinamentos valiosos na enigmática área da interação planta-vírus, pela coorientação, amizade, carinho e compreensão de mãe, sobretudo comigo e com a Fernanda Bruckner;

À Prof<sup>a</sup>. Claudine Márcia, pela colaboração nesta pesquisa e pela amizade;

Às minhas grandes amigas, mães e eternas professoras Rosa Mariano e Elineide Barbosa, pela amizade e conselhos conservados mesmo estando distantes fisicamente;

À família Marenga pelo constante amor em todos os momentos compartilhados e pela torcida na distância;

Aos inesquecíveis Leonardo, José Carlos, Ana Paula, Monaliza e Elisângela, pelo acolhimento após a caída de paraquedas na capital recifense, pelas risadas na escada do Otávio Gomes, pela companhia nas refeições na praça Dois Irmãos e por todos ensinamentos sobre o grande e novo mundo;

Às bacteriologistas Kedma, Juliana, Kátia, Aldenir, Jayne pela amizade e presença de coração nos momentos mais difíceis enfrentados;

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular: Ana, Adriana, Alison, Álvaro, Amanda, David, Diego, Diogo, Fábio Nascimento, Fábio Assad, Joseane, Larissa, Lenin, Marcelo, Márcio, Marcos, Pedro, Roberto, Sílvia, Sarah, Joyce e Tathiana pelos momentos de descontração e amizade em todos os momentos. Em especial agradeço aos amigos Renan, Fernanda, Larissa, César, Chaianne, Diogo e Glória que nos últimos momentos dos meus experimentos fatiaram comigo o peso do trabalho, a vocês meu eterno obrigado;

Aos amigos do Laboratório de Cultura de tecidos, Prof. Wagner Otoni, Andrea, Denise, Marcos, Marcela, Diego, Débora, Evelin, Eliabe, Cris, Virgílio, Lili, Thiago, Márcia, pelos ensinamentos e pela grande força no desempenho das etapas iniciais dessa pesquisa;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial: Eliana, Lisiane, Fernanda, Larissa, Mariane, Rita, Margarete, Samira pelo apoio e companheirismo;

Ao funcionário e amigo Joaquim do DFP pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade;

À todos aqueles que sem dúvida foram meu alicerce e de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente, minha mais que sincera gratidão.

## **BIOGRAFIA**

ANDRÉ DA SILVA XAVIER, filho de José Barbosa Xavier e Lindaci Ferreira da Silva Xavier, nasceu em 17 de Fevereiro de 1987 em Vitória de Santo Antão, Pernambuco.

Em 2005 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), vindo a graduar-se em julho de 2010 e em agosto do mesmo ano ingressou no Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo sua dissertação em Julho de 2012.

## SUMÁRIO

|                                                                                                         |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| RESUMO.....                                                                                             | viii |
| ABSTRACT.....                                                                                           | x    |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                     | 1    |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                           | 4    |
| 2.1. Família <i>Potyviridae</i> .....                                                                   | 4    |
| 2.2. O mosaico amarelo do pimentão e do tomateiro .....                                                 | 6    |
| 2.3. Interação planta-vírus.....                                                                        | 7    |
| 2.4. Proteínas do hospedeiro: papel cognato e na infecção viral.....                                    | 10   |
| 2.4.1. Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP).....                                             | 10   |
| 2.4.2. Proteínas com domínio J (DnaJs) e as chaperonas HSP70 .....                                      | 13   |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                             | 17   |
| 3.1. Isolado viral .....                                                                                | 17   |
| 3.2. Análise da sequência do gene <i>DnaJ</i> .....                                                     | 17   |
| 3.3. Cinética da expressão do gene <i>DnaJ</i> em <i>N. benthamiana</i> infectada pelo<br>PepYMV.....   | 17   |
| 3.4. RT-PCR quantitativo.....                                                                           | 18   |
| 3.5. Efeito do silenciamento do gene <i>DnaJ</i> na infecção pelo PepYMV .....                          | 18   |
| 3.6. Efeito do silenciamento do gene <i>TCTP</i> na infecção pelo PepYMV .....                          | 20   |
| 3.6.1. Transformação genética de tomateiro para silenciamento de TCTP .....                             | 20   |
| 3.6.2. Confirmação da inserção do T-DNA.....                                                            | 21   |
| 3.6.3. Análise da ploidia das plantas transgênicas .....                                                | 22   |
| 3.6.4. Avaliação do nível de expressão do transgene.....                                                | 22   |
| 3.6.5. Extração de proteínas totais e <i>Western blot</i> .....                                         | 22   |
| 3.6.6. Inoculação das plantas transgênicas com o PepYMV .....                                           | 23   |
| 3.7. Localização subcelular de TCTP em plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas<br>pelo PepYMV ..... | 24   |
| 4. RESULTADOS .....                                                                                     | 25   |
| 4.1. Análise da sequência do gene <i>DnaJ</i> .....                                                     | 25   |
| 4.2. Cinética da expressão do gene <i>DnaJ</i> durante a infecção pelo PepYMV .....                     | 25   |
| 4.3. Efeito do silenciamento do gene <i>DnaJ</i> na infecção pelo PepYMV .....                          | 26   |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4. Obtenção e caracterização de plantas transgênicas silenciadas para TCTP .....                                   | 29 |
| 4.5. Efeito do silenciamento do gene <i>TCTP</i> na infecção de tomateiro pelo<br>PepYMV .....                       | 36 |
| 4.6. Localização subcelular da proteína TCTP durante a infecção de <i>N.</i><br><i>benthamiana</i> pelo PepYMV ..... | 41 |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                                                                   | 42 |
| 6. RESUMO E CONCLUSÕES .....                                                                                         | 48 |
| 7. LITERATURA CITADA .....                                                                                           | 49 |

## RESUMO

XAVIER, André da Silva, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2012. **Efeito do silenciamento dos genes *DnaJ* e *TCTP* na infecção de tomateiro e *Nicotiana benthamiana* pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV).** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Coorientadores: Claudine Márcia Carvalho e Poliane Alfenas Zerbini.

Durante a coevolução, os vírus de plantas desenvolveram a capacidade de modular a expressão de alguns genes do hospedeiro, ou alterar a função cognata de proteínas para obter sucesso em sua multiplicação e perpetuação. Essas alterações induzidas pelos vírus podem culminar em elevados níveis de especialização, tornando o vínculo com seus hospedeiros indissociável. O objetivo deste trabalho foi investigar a contribuição de uma *DnaJ* de *Nicotiana benthamiana* homóloga de tomateiro e da proteína *TCTP* de tomateiro durante a infecção pelo potyvírus PepYMV. Esses dois genes foram identificados como diferencialmente expressos em uma biblioteca de cDNA construída a partir de tomateiro infectado pelo PepYMV. Estudos de cinética de expressão do gene *DnaJ* em *N. benthamiana* infectadas pelo PepYMV demonstraram que a indução do gene ocorre 72 horas pós-inoculação (hpi) e aos 14 dias pós-inoculação (dpi). Plantas de *N. benthamiana* silenciadas para *DnaJ* por meio de VIGS e de tomateiro cv. Moneymaker silenciadas por transgenia para o gene *TCTP* foram obtidas e inoculadas mecanicamente com o PepYMV. A infecção viral foi confirmada por ELISA e a carga viral determinada por qRT-PCR. O silenciamento do gene *DnaJ* em *N. benthamiana* interferiu nos estágios iniciais da infecção viral (72 hpi), porém seu efeito em infecções já estabelecidas (14dpi) foi inconclusivo. Plantas não-transformadas de tomateiro exibiram sintomas severos da doença, enquanto as plantas transgênicas silenciadas para o gene *TCTP* apresentaram sintomas muito atenuados ou permaneceram assintomáticas. Nas plantas silenciadas a carga viral foi drasticamente reduzida. A localização subcelular de *TCTP* fusionada à proteína GFP em plantas de *N. benthamiana* sadias ou infectadas pelo PepYMV foi analisada por microscopia confocal. Em plantas sadias a localização de *TCTP* foi nuclear e citoplasmática, porém em plantas infectadas aos 14dpi, a localização de *TCTP* foi exclusivamente citoplasmática. Os resultados obtidos sugerem que tanto *TCTP* quanto *DnaJ* são proteínas que regulam positivamente o ciclo

de infecção do PepYMV, sendo necessárias para o desenvolvimento da doença no caso de TCTP, ou para o rápido estabelecimento da infecção no caso de DnaJ. Estudos posteriores devem ser conduzidos afim de descobrir o mecanismo pelo qual esses fatores do hospedeiro são utilizados em benefício da infecção viral.

## ABSTRACT

XAVIER, André da Silva, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Effect of gene silencing of DnaJ and TCTP in the infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* by the potyvirus Pepper yellow mosaic virus (PepYMV)**. Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-Advisors: Claudine Márcia Carvalho and Poliane Alfenas Zerbini.

During coevolution, plant viruses have developed the ability to modulate the expression of several host genes, or to alter the function of cognate protein to succeed in their multiplication and perpetuation. These virus-induced changes might lead to a high level of dependency, creating an indissoluble link between virus and host. The objective of this study was to investigate the contribution of a DnaJ of *Nicotiana benthamiana* (homologous of the tomato protein) and of the TCTP protein from tomato during PepYMV infection. These two genes were identified as differentially expressed in a cDNA library constructed from tomato plants infected by PepYMV. Kinetic studies of *DnaJ* expression in PepYMV-infected *N. benthamiana* demonstrated that the induction occurs at both 72 hours post-inoculation (hpi) and 14 days post-inoculation (dpi). Plants of *N. benthamiana* silenced for *DnaJ* by means of VIGS and tomato plants cv. Moneymaker silenced by transgenesis for *TCTP* were obtained and mechanically inoculated with PepYMV. Viral infection was confirmed by ELISA and viral load determined by qRT-PCR. Silencing of the *DnaJ* gene in *N. benthamiana* interfered with the early stages of viral infection (72 hpi) but its effect on established infections (14dpi) was inconclusive. Non-transformed tomato plants showed severe symptoms of the disease, while *TCTP*-silenced transgenic plants showed greatly attenuated symptoms or remained asymptomatic. Viral load was dramatically reduced in silenced plants. The subcellular localization of a TCTP-GFP fusion protein in healthy or PepYMV-infected *N. benthamiana* plants was analyzed by confocal microscopy. In healthy plants TCTP was nuclear and cytoplasmic, while in infected plants at 14 dpi, its subcellular localization was exclusively cytoplasmic. Together, these results suggest that both TCTP and DnaJ are proteins which positively regulate the infection cycle of PepYMV, being required for disease development in the case of TCTP or for the rapid establishment of viral infection in the case of DnaJ. Further studies should be conducted

in order to unravel the mechanisms by which these host factors are used to benefit the viral infection.

## 1. INTRODUÇÃO

A família *Potyviridae* é uma das maiores e economicamente mais importantes famílias de vírus que infectam plantas. O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso da família, com mais de 100 espécies descritas, o que corresponde a cerca de 90% das espécies pertencentes à família (Adams *et al.*, 2012).

Perdas econômicas significativas têm sido reportadas em solanáceas, incluindo a batata (*Solanum tuberosum* L.), o pimentão e a pimenta (*Capsicum* spp.), e o tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.), em função de epidemias causadas por potyvírus (Robert *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2001; Kazinczi *et al.*, 2003; Dianese *et al.*, 2008; Khoshkhatti *et al.*, 2009; Arogundade *et al.*, 2012).

O *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) pertence ao gênero *Potyvirus* e é amplamente distribuído no Brasil. Essa espécie foi inicialmente encontrada nos estados de São Paulo e Goiás infectando plantas de pimentão (*Capsicum annum*) (Inoue-Nagata *et al.*, 2002). Desde então sua ocorrência têm sido verificada em diferentes estados em associação com plantios de tomateiro e pimentão (Cunha *et al.*, 2004; Zambolim *et al.*, 2004). Em tomateiro os sintomas tipicamente observados são mosaico amarelo e deformação foliar. Em um levantamento realizado em campos de produção do Distrito Federal, 85,2% de 54 amostras coletadas estavam infectadas pelo PepYMV, demonstrando a alta incidência desse vírus na cultura do tomateiro para esta região (Dianese *et al.*, 2008).

Os vírus que infectam plantas codificam em média de 3 a 10 proteínas, possuindo um genoma pequeno e compacto. Apesar do número reduzido de proteínas de origem viral expressas durante a infecção, os vírus são capazes de causar danos severos em diferentes organismos celulares, sendo responsáveis por uma ampla gama de doenças em diferentes espécies de plantas, causando grandes perdas econômicas e queda na produtividade.

O ciclo de replicação de vírus de plantas envolve as etapas de replicação do genoma viral, movimento célula-a-célula e movimento sistêmico ou vascular (Hull, 2002). Para uma infecção eficiente, as proteínas virais necessitam interagir com fatores da célula hospedeira, manipulando vias metabólicas e coordenando interações bioquímicas e intermoleculares que favorecem a doença. Assim, durante a co-evolução

entre vírus e seus hospedeiros, interações complexas foram estabelecidas envolvendo diversos mecanismos de ataque do patógeno e de defesa do hospedeiro (Pallas e Garcia, 2011).

As estratégias utilizadas pelos vírus para infectar o hospedeiro incluem modificações estruturais na célula hospedeira, supressão do silenciamento gênico pós-transcricional (Endres *et al.*, 2010; Jin e Zhu, 2010), interferência com a regulação do ciclo celular (Laliberté e Sanfaçon, 2010; Lozano-Durán *et al.*, 2011). Em contrapartida, as plantas desenvolveram mecanismos para se proteger da infecção viral, como o silenciamento gênico pós-transcricional (Harvey *et al.*, 2011), ativação de respostas como a hipersensibilidade e a resistência sistêmica adquirida (Komatsu *et al.*, 2010; Baeblér *et al.*, 2011; Jovel *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011), dentre outras. Estas respostas de defesa são acompanhadas por alterações na expressão gênica do hospedeiro que incluem a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR, "pathogenesis-related proteins") e inúmeras proteínas envolvidas na sinalização celular (Guevara-Morato *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011).

Diversas interações entre proteínas virais e fatores do hospedeiro já foram descritas em diferentes sistemas potyvírus-hospedeiro (Cheng *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011), e um exemplo bem caracterizado é a interação entre a proteína VPg e o fator de iniciação da tradução eIF(iso)4E, necessária para infecção de diferentes potyvírus (Wittmann *et al.*, 1997; Léonard *et al.*, 2000).

Recentemente foi demonstrado que a proteína "Translationally controlled tumor protein" (TCTP), membro de uma família proteica amplamente distribuída e conservada entre os eucariotos (Bommer e Thiele, 2004), possui um papel crítico nos estágios iniciais da infecção pelo PepYMV (Bruckner, 2010). Membros desse grupo de proteínas estão envolvidos constitutivamente na regulação de inúmeros processos celulares importantes, tais como crescimento celular, progressão do ciclo celular, proteção das células contra diferentes condições de estresse e apoptose (Berkowitz *et al.*, 2008; Susini *et al.*, 2008; Gnanasekar *et al.*, 2009; Brioudes *et al.*, 2010).

O papel exato da TCTP no ciclo de infecção viral em plantas permanece desconhecido. Estudos de controle do transporte de macromoléculas pelo floema de abóbora mostraram que duas proteínas do floema (CmPP16-1 e CmPP16-2) interagem especificamente com TCTP, regulando o transporte destas proteínas (Aoki *et al.*, 2005). A saída seletiva de macromoléculas dos elementos de tubo crivado já foi relatada para

RNA (Foster *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002) e para proteínas de movimento viral (Itaya *et al.*, 2002). Desta forma é razoável supor que TCTP possa estar envolvida no processo de controle de saída seletivo do floema destas macromoléculas, regulando o transporte viral.

Membros da família HSP40 ("heat-shock protein" 40) de chaperonas pertencentes à subclasse de proteínas com domínio J (DnaJ), frequentemente atuam em conjunto com as chaperonas da classe HSP70, estando esses complexos envolvidos em uma série de processos celulares como enovelamento de proteínas, redobramamento de proteínas desnaturadas, translocação, montagem e desmontagem de complexos proteicos, dentre outros (Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Young *et al.*, 2004; Mayer e Bukau, 2005).

O envolvimento de proteínas homólogas às DnaJ já foi relatado em várias etapas do ciclo de infecção viral em plantas, como a montagem dos complexos de replicação associadas a membranas (Soellick *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 2003), movimento célula-a-célula (Hafren *et al.*, 2010) e replicação (Zylicz *et al.*, 1989). A indução da expressão de proteínas DnaJ foi constatada em plantas de tomateiro infectadas pelo PepYMV e em arroz infectado pelo *Rice dwarf virus* (RDV) (Shimizu *et al.*, 2007; Alfenas-Zerbini *et al.*, 2009).

A capacidade das plantas em montar uma resposta de defesa eficiente depende da capacidade do hospedeiro em reconhecer o patógeno e iniciar um mecanismo de defesa que limite a infecção. Portanto, o conhecimento básico dos mecanismos genéticos, bioquímicos e moleculares que estão envolvidos nas etapas iniciais da interação vírus-hospedeiro torna-se extremamente relevante, pois pode permitir o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle. Este trabalho teve como objetivo a investigação do papel das proteínas TCTP e DnaJ na infecção de tomateiro pelo potyvírus PepYMV.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* é uma das maiores e economicamente mais importantes entre as famílias de vírus que infectam plantas, contendo cerca de 17% das espécies descritas (Roossinck, 2012). Está dividida em sete gêneros (*Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*), de acordo com o agente vetor e a organização do genoma (Adams *et al.*, 2012). Os *Potyviridae* são encontrados em todo o mundo, infectando mais de 2.000 espécies de plantas. Todos os potyvírus formam corpos de inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, também denominadas "cata-ventos", sendo esta uma característica relevante para a identificação de espécies pertencentes à família. Membros dessa família são facilmente transmitidos experimentalmente de plantas infectadas para plantas sadias pela inoculação via extrato vegetal tamponado ou utilizando preparações virais purificadas ou concentradas (Adams *et al.*, 2012).

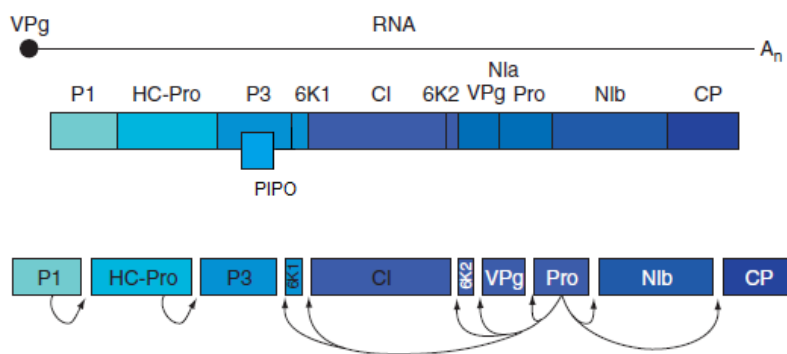
O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso da família *Potyviridae*, com mais de 100 espécies descritas. Em conjunto, essas espécies infectam uma ampla gama de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas em diferentes regiões climáticas, causando grandes danos econômicos em várias culturas. Esses vírus são transmitidos de maneira não-persistente por afídeos. As partículas virais são alongadas, flexuosas, com 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído de uma única molécula de RNA fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos. O RNA genômico é envolto por um capsídeo formado por cerca de 2.000 cópias da proteína capsidial (CP), que possui massa molecular de aproximadamente 34 kDa (Bock e Conti, 1974; Dipiero *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2012).

A proteína capsidial dos potyvírus apresenta uma região amino-terminal altamente variável em tamanho e sequência, uma região central altamente conservada contendo de 215 a 227 aminoácidos, e uma região carboxi-terminal com 18-20 aminoácidos. As regiões amino e carboxi-terminal estão voltadas para o exterior da partícula viral, e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da proteína e, conseqüentemente, da partícula viral (Shukla *et al.*, 1991). O RNA dos potyvírus é covalentemente ligado a uma proteína de origem viral ("genome-linked viral protein",

VPg) em sua extremidade 5' (Riechmann *et al.*, 1989) e apresenta uma cauda poliadenilada de origem viral em sua extremidade 3' (Allison *et al.*, 1986). O RNA genômico apresenta duas fases abertas de leitura (*open reading frames*, ORFs) sobrepostas localizadas entre duas regiões não codificadoras (5'NTR e 3'NTR).

A tradução da ORF maior origina uma poliproteína com peso molecular de aproximadamente 350 kDa (Allison *et al.*, 1986), que é processada por meio da atividade proteolítica de três proteases (P1, HC-Pro e NIa) contidas na própria sequência, dando origem a 8-10 produtos finais (Carrington *et al.*, 1990) (Figura 1).

As proteases P1 e HC-Pro catalisam unicamente suas próprias clivagens em *cis*. A protease NIa, além de catalisar sua própria clivagem em *cis*, catalisa seis clivagens adicionais em *trans* (Daros e Carrington, 1997). A principal consequência desse mecanismo de expressão gênica é que as proteínas virais derivadas da poliproteína são produzidas em quantidades estequiométricas, independentemente da necessidade do vírus de cada proteína em particular. As proteínas produzidas em excesso acumulam na célula infectada na forma de inclusões. Essa estratégia de replicação e expressão gênica é bastante danosa para a célula, implicando em um grande dreno de metabólitos, o que se reflete em sintomas severos na planta infectada.



**Figura 1.** Genoma típico de um potyvírus, indicando a poliproteína formada e as clivagens realizadas para a geração das proteínas maduras. Adaptado de López-Moya (2008).

Uma segunda ORF denominada *pipo* (pretty interesting *Potyviridae* ORF) localiza-se dentro da região codificadora da proteína P3, porém em outra fase de leitura. A tradução desta ORF resulta em um polipeptídeo com peso molecular de aproximadamente 25 KDa, o que é condizente com o esperado para uma fusão entre a porção N-terminal da proteína P3 com a proteína PIPO (Chung *et al.*, 2008). Trabalhos recentes demonstraram o papel da proteína PIPO no movimento viral (Wei *et al.*, 2010; Wen e Hajimorad, 2010; Vijayapalani *et al.*, 2012).

Uma característica das proteínas sintetizadas pelos potyvírus é o seu caráter multifuncional. Cada proteína é geralmente responsável por várias funções durante o ciclo de infecção (revisado por Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Por exemplo, a proteína CI, além de possuir atividade de helicase, possui atividade de ATPase e de ligação a RNA e está envolvida no movimento célula-a-célula via plasmodesmas (Lain *et al.*, 1991; Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995). A protease P1 atua como fator de amplificação do genoma viral (Verchot e Carrington, 1995) e pode estar envolvida na infectividade e acúmulo viral (Rajamaki *et al.*, 2005). A protease HC-Pro é supressora de silenciamento, atua como componente auxiliar na transmissão pelo vetor, no movimento célula-a-célula e no movimento sistêmico. As proteínas VPg e a capsidial também estão envolvidas no movimento viral a curta e longa distância, e esta última ainda atua na transmissão pelo inseto vetor (Dolja *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995; Maia *et al.*, 1996; Kasschau *et al.*, 1997; Schaad *et al.*, 1997; Kasschau *et al.*, 2003).

## **2.2. O mosaico amarelo do pimentão e do tomateiro**

A doença denominada mosaico amarelo do pimentão, causada pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), foi descrita por Inoue-Nagata *et al.* (2002) e vem desde então se disseminando nas culturas do pimentão e do tomateiro (Cunha *et al.*, 2004; Truta *et al.*, 2004; Zambolim *et al.*, 2004). O PepYMV foi relatado na região serrana do estado do Espírito Santo na safra 2002-03, estimando-se perdas de até 100% em alguns campos de tomateiro do híbrido 'Alhambra', que respondia na época a cerca de 70% da área plantada na região (Zambolim *et al.*, 2004). Dianese *et al.* (2008) relataram o PepYMV como o vírus prevalente em plantações de tomateiro do Distrito Federal, demonstrando a ampliação da área de ocorrência deste patógeno. Especula-se que essa recente emergência e o crescente avanço do PepYMV nessa cultura tenha

ligação com a diminuição da importância do *Potato virus Y* (PVY), causada pela introdução de materiais com níveis elevados de resistência a esse vírus (Dianese *et al.*, 2008). A presença de um gene de resistência ao PepYMV com herança monogênica recessiva foi identificada em um acesso de *Lycopersicon hirsutum* do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (Juhasz *et al.*, 2008).

### 2.3. Interação planta-vírus

Pelo fato de codificarem um número reduzido de proteínas, os vírus utilizam algumas estratégias adaptativas para estabelecer-se com sucesso nos organismos hospedeiros. Nos potyvírus, por exemplo, duas aparentes adaptações são a multifuncionalidade das proteínas virais e a integração de fatores do hospedeiro nos processos virais, evitando assim a necessidade de carregar informações genéticas adicionais em seu genoma (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Rajamaki e Valkonen, 2004).

Uma série de alterações no padrão de expressão gênica e no proteoma de plantas e animais são relatadas durante a infecção viral. Esse efeito na fisiologia dos hospedeiros pode ser interpretado como um conjunto de processos que atuam simultaneamente, alguns na defesa antiviral e outros criando um ambiente mais favorável para a replicação e a disseminação do vírus no hospedeiro (Vahey *et al.*, 2002; Whitham *et al.*, 2003; Senthil *et al.*, 2005; Babu *et al.*, 2008).

Estudos que descrevem alterações transcricionais e no perfil proteômico de células infectadas têm contribuído para um aumento significativo do conhecimento sobre os fatores potencialmente envolvidos no processo de infecção de vírus (Whitham *et al.*, 2003; Pompe-Novak *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Agudelo-Romero *et al.*, 2008; Alfenas-Zerbini *et al.*, 2009; Baebler *et al.*, 2009). Entretanto o papel exato de muitos destes fatores no processo infeccioso permanece indeterminado.

Estudando a infecção de *Arabidopsis thaliana* por algumas espécies virais, Whitham *et al.* (2003) constataram alterações no padrão de expressão de genes associados a defesa, identificando respostas específicas e inespecíficas em função da espécie de vírus. Adicionalmente, observaram que genes induzidos inespecificamente possuíam regiões promotoras que sugeriam tal indução incomum.

Diversos genes relacionados a estresses bióticos e abióticos são regulados diferencialmente durante a infecção de *A. thaliana* pelo potyvírus *Tobacco etch virus* (TEV). A expressão de fatores de transcrição é significativamente afetada, e chaperonas

são substancialmente induzidas (Agudelo-Romero *et al.*, 2008). Plantas de batata infectadas pelo potyvírus PVY apresentam alteração na expressão de alguns genes durante a doença. Por meio da análise de folhas não inoculadas aos 14 dias pós-inoculação, constatou-se uma alteração no transcriptoma bem maior do que a observada em folhas inoculadas. Dentre os genes com o padrão de expressão alterado nesse patossistema destacam-se os que codificam chaperonas, catalases e proteínas envolvidas em vias fotossintéticas (Pompe-Novak *et al.*, 2006).

Analizando-se espacialmente a alteração do perfil de expressão gênica nos tecidos de *A. thaliana* infectada pelo potyvírus *Turnip mosaic virus* (TuMV), foi observado que a medida que o vírus acumulava ocorre a indução ou a repressão de alguns genes, independentemente da função do gene. Genes relacionados à atividade dos cloroplastos e assimilação de sulfato foram reprimidos durante a infecção, consistentemente com os sintomas observados de clorose e atrofia do crescimento induzidos pelo vírus (Yang *et al.*, 2007).

O efeito global da infecção pelo potyvírus PepYMV na expressão gênica do tomateiro foi relatado por Alfenas-Zerbini *et al.* (2009). Estes autores verificaram que, 72 horas após a inoculação, genes que codificam proteínas envolvidas na defesa, regulação do ciclo celular, fatores de transcrição, resposta a estresses abióticos (HSP90, DnaJ, HSP70, TCTP, subunidade  $\alpha$  do proteassoma 20S) e ubiquitinas, dentre outras, apresentaram nível de expressão alterado.

Comparando a expressão diferencial de genes entre duas cultivares de batata, contrastantes quanto a resistência, durante as fases iniciais da infecção pela estirpe NTN do PVY, Baebler *et al.* (2009) observaram que na cultivar Igor (suscetível) havia uma alteração superior no padrão de expressão 12 horas pós-inoculação comparado à cultivar Santé (resistente). Os genes com expressão alterada nas duas cultivares, reprimidos na suscetível e induzidos na resistente, estavam envolvidos com a biossíntese de brassinoesteróides, metabólitos secundários e poliaminas, além dos que codificam proteínas PR.

Ao longo da co-evolução vírus-planta, esses patógenos precisam adaptar-se a fim de manipular eficientemente os recursos disponíveis nos diferentes nichos (Rainey e Travisano, 1998). As alterações induzidas nas plantas fazem parte de um nanoambiente de sequestro de funções pelos patógenos em benefício próprio (Scaria *et al.*, 2006). A adaptação é impulsionada por mutações/pressão de seleção sob o genoma desses

patógenos, e o custo adaptativo dessas mudanças determina a fixação ou não dessas características para saltar as barreiras impostas pelos hospedeiros. Na interação entre TEV e *A. thaliana*, foi demonstrado que mutações no genoma desse potyvírus geraram um variante mais adaptado a esse hospedeiro em comparação à estirpe ancestral, e que este mutante alterou o padrão de expressão gênica da planta diferentemente do TEV parental (Agudelo-Romero *et al.*, 2008b).

Modulando recursos da célula, os vírus tem a chance de diversificar funções em seu ciclo. Por exemplo, o potyvírus *Papaya ringspot virus* (PRSV) estabelece interação com a calreticulina, uma proteína conservada que se liga a íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Essa associação ocorre por meio da proteína viral HC-Pro (Shen *et al.*, 2010). A calreticulina é induzida nos primeiros estágios da infecção, possivelmente como parte de uma resposta de defesa envolvendo a sinalização celular mediada por cálcio. É provável que a interação de HC-Pro com a calreticulina interfira negativamente na via de defesa, favorecendo a infecção viral. Além da calreticulina, alguns elementos do citoesqueleto como F-actina, microtúbulos e proteínas MPB2C associadas aos microtúbulos também são relatados em interação com a MP do *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Heinlein *et al.*, 1995; Mclean *et al.*, 1995; Kragler *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005).

Outro exemplo de modulação do hospedeiro pelo vírus reside na interação entre a proteína viral VPg e o eIF4E. Essa interação tem recebido atenção especial desde que constatou-se que a resistência à infecção causada por alguns potyvírus está ligada a alelos desse fator do hospedeiro (Ruffel *et al.*, 2002; Nicaise *et al.*, 2003; Yeam *et al.*, 2005). Em pimentão foi demonstrado que a presença do alelo recessivo *pvr2* tem correlação com a resistência da planta ao PVY. O alelo recessivo codifica um eIF4E que não interage com a VPg do vírus (Ruffel *et al.*, 2002). Da mesma forma, cultivares de alface (*Lactuca sativa*) resistentes ao potyvírus *Lettuce mosaic virus* (LMV) possuem uma isoforma de eIF(iso)4E que não interage com a VPg do LMV, demonstrando que esta interação é essencial para a infectividade viral (Nicaise *et al.*, 2003). Em alguns casos, essa interação conduz a um aumento na taxa de tradução do RNA viral e simultânea diminuição da tradução de mRNAs da planta (Eskelin *et al.*, 2011).

Recentemente foram identificadas duas proteínas, PpDDXL e AtRH8, homólogas a RNA helicases do tipo "DEAD-box", que interagem com a VPg dos potyvírus *Plum pox virus* (PPV) e TuMV em pessegueiro (*Prunus persica*) e *A. thaliana*, respectivamente. Foi verificado que essas proteínas são dispensáveis para o

desenvolvimento das plantas porém necessárias para a infecção pelos potyvírus (Huang *et al.*, 2010).

## **2.4. Proteínas do hospedeiro: papel cognato e na infecção viral**

### **2.4.1. Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP)**

A família de proteínas TCTP é amplamente distribuída e conservada entre os eucariotos (Bommer e Thiele, 2004). TCTP foi isolada inicialmente de células tumorais de humanos (Chitpatima *et al.*, 1988). O gene *TCTP* é regulado em nível pós-transcricional, tendo sido relatada a ocorrência do transcrito do gene na ausência da proteína (revisado por Bommer e Thiele, 2004). A comparação das sequências de aminoácidos (aa) das TCTPs de diferentes organismos mostra um alto nível de conservação entre todos os eucariotos. Em plantas, dos 168 aminoácidos de TCTP, 86 (51%) dos resíduos são totalmente conservados entre as espécies. Por exemplo, as TCTPs de *A. thaliana* e couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) possuem 90% de identidade, e as de ervilha (*Pisum sativum*) e arroz (*Oryza sativa*) possuem 85%. Todas as sequências de TCTPs de plantas já determinadas possuem tirosinas adicionais nas posições 64 e 73. Estes resíduos são conservados exclusivamente em plantas e ausentes nos demais organismos. Estes sítios são alvos de proteínas cinases C (específicas de plantas), sugerindo que TCTP em plantas pode ter funções adicionais que são especificamente reguladas por proteínas cinases C (Venugopal, 2005).

Diversos homólogos de TCTP têm sido clonados e caracterizados em um número cada vez maior de organismos (Wang *et al.*, 2009; Yubero *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2010). Entretanto, apesar da descrição de vários aspectos funcionais, seu modo de ação nos diferentes processos celulares ainda não está totalmente esclarecido.

Em humanos, TCTP é capaz de inibir a apoptose mediada pela proteína Bax. Bax modula a permeabilidade da membrana mitocondrial durante a apoptose por meio da formação de canais que são gerados após sua dimerização. TCTP e Bax não interagem diretamente, entretanto, a ancoragem de TCTP à membrana mitocondrial impede a dimerização de Bax e consequentemente a apoptose é inibida (Susini *et al.*, 2008).

A expressão das TCTPs de humanos e de *Schistosoma mansoni* é aumentada após células serem submetidas a altas temperaturas. Ambas as TCTPs são capazes de ligar-se a proteínas desnaturadas e nativas protegendo-as de danos provocados pelo choque térmico, sugerindo que essas proteínas podem atuar de forma semelhante às chaperonas moleculares (Gnanasekar *et al.*, 2009). Outros resultados sugerem que a TCTP de *Brugia malayi* é capaz de proteger o DNA celular de danos causados por estresse oxidativo (Gnanasekar e Ramaswamy, 2007).

O papel de TCTP na resposta a estresses bióticos também tem sido avaliado. Foi demonstrado que em camarão (*Penaeus monodon*) o produto do gene *TCTP* possui propriedades anti-apoptóticas e está presente em níveis elevados durante o início da infecção pelo *White spot syndrome virus* (WSSV). Os níveis de TCTP aumentam consideravelmente entre 24 e 48 horas após o início da infecção viral. Foi demonstrado que camarões injetados com TCTP recombinante tiveram uma sobrevivência de 80-100%, apresentando baixa taxa de infecção pelo WSSV. Este resultado implica que a injeção de TCTP recombinante diminui a taxa de infecção viral por um mecanismo ainda desconhecido (Tonganunt *et al.*, 2008).

Além disso, foi demonstrado que TCTP interage com os fatores de alongação da tradução eIF1A e eIF1B (Cans *et al.*, 2003). Em eucariotos, a alongação da cadeia peptídica durante a síntese proteica é regulada pela troca GDP/GTP. Em uma interação códon/anti-códon correta, ocorre a hidrólise do GTP ligado ao eIF1A, resultando no complexo GDP-eIF1A. O GDP é então removido pelo eIF1B permitindo a adição de um novo aminoácido à cadeia polipeptídica. Os autores demonstraram que a ligação de TCTP estabiliza o complexo GDP-eIF1A, diminuindo a taxa de síntese proteica (Cans *et al.*, 2003).

Em *A. thaliana*, TCTP é um importante regulador de crescimento e sua inativação resulta em profundas alterações fenotípicas. Linhagens carregando inserções de T-DNA no alelo *TCTP* apresentam forte redução no crescimento do tubo polínico, enquanto linhagens onde TCTP é silenciada apresentam tamanho reduzido em consequência da redução do tamanho celular. Curiosamente, essas mesmas linhagens são pouco sensíveis ao tratamento com auxina exógena e apresentam altos níveis de auxina endógena (Berkowitz *et al.*, 2008).

Em arroz foi observada a superexpressão da TCTP após a exposição das raízes ao alumínio e após tratamento com um elicitor, demonstrando provável atuação na resposta a estresses (Liao *et al.*, 2009).

A TCTP de *A. thaliana* foi relatada como uma reguladora positiva do crescimento mitótico, por controlar especificamente a duração do ciclo celular (Brioude *et al.*, 2010). Em contraste à TCTP de *Drosophila*, a TCTP de *A. thaliana* não está envolvida na regulação do crescimento pós-mitótico. Curiosamente, a TCTP de *Drosophila* é capaz de resgatar completamente a proliferação celular em mutantes de *A. thaliana* nocauteadas para o gene *TCTP*, com atividade recíproca comprovada. Esses resultados sugerem que a função de TCTP em regular a divisão celular é parte de uma via regulatória de crescimento conservada em plantas e animais, e que embora a maquinaria de divisão celular seja compartilhada em todos os organismos multicelulares para controlar o crescimento, a expansão celular pode ser desacoplada da divisão celular em plantas, mas não em animais (Brioude *et al.*, 2010).

Estudos de controle do transporte de macromoléculas pelo floema de abóbora demonstraram que duas proteínas do floema, CmPP16-1 e CmPP16-2, interagem especificamente com TCTP e que essa interação é importante para a regulação do transporte dessas proteínas. Os autores propõem um modelo no qual o destino de macromoléculas é determinado pela saída seletiva da macromolécula do floema, e que o controle desta saída pode ser mediado por TCTP (Aoki *et al.*, 2005). A saída seletiva de macromoléculas dos elementos de tubo crivado já foi relatada para RNA (Foster *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002) e para proteínas de movimento viral (Itaya *et al.*, 2002). Desta forma, é razoável propor que TCTP possa estar envolvida no processo de controle seletivo de saída do floema de RNA e proteínas virais, regulando assim o movimento viral.

Foi proposto ainda que TCTP pode estar envolvida na resposta de defesa mediada por dsRNA. O mRNA de TCTP é altamente estruturado e capaz de ativar uma proteína cinase dependente de dsRNA (PKR) (Bommer *et al.*, 2002), que por sua vez induz uma série de respostas de defesa, incluindo defesa antiviral mediada por interferon em células de mamíferos e diminuição na taxa de síntese proteica do hospedeiro (Schneider e Mohr, 2003; Valchanova *et al.*, 2006). Como estratégia para combater o mecanismo de defesa do hospedeiro mediado por PKR, alguns vírus codificam proteínas que se ligam a dsRNA, e inibem a resposta de defesa mediada por

dsRNA (Child *et al.*, 2004; Child *et al.*, 2006). Vírus que infectam plantas também codificam proteínas capazes de suprimir a resposta de defesa mediada por dsRNA. Recentemente foi demonstrado que ligação a dsRNA pode ser uma estratégia geral de vírus de plantas para suprimir o silenciamento gênico mediado por RNA (Meraí *et al.*, 2006). Desta forma seria plausível considerar o direcionamento de TCTP por proteínas virais de forma direta/indireta, para desestabilização de respostas de defesa da planta mediada por dsRNA.

#### **2.4.2. Proteínas com domínio J (DnaJs) e as chaperonas HSP70**

Os membros da família HSP40 ("heat-shock protein" 40) de chaperonas pertencentes a subfamília das DnaJs são tipicamente compostos pelo domínio denominado J, que se constitui em uma região altamente conservada com aproximadamente 70 aminoácidos (aa) na porção amino-terminal e contém um tripeptídeo conservado histidina-prolina-ácido aspártico (HPD). Outros domínios adicionais são também encontrados neste grupo de proteínas, incluindo: (i) uma região com cerca de 30 resíduos rica em glicina e fenilalanina (domínio Gly/Phe), (ii) um domínio dedo de zinco rico em cisteínas, e (iii) uma região pouco conservada na porção carboxi-terminal contendo 120-170 resíduos (domínio carboxi-terminal) (Bork *et al.*, 1992). Outros membros dessa família podem possuir, além desses quatro domínios, sequências-sinal com direção organelar específica (Kelley, 1998). Quanto à presença dos domínios conservados, essas co-chaperonas podem ser agrupadas em três tipos: tipo I quando apresentam em sua estrutura todos os quatro domínios compartilhados pelos membros típicos dessa subfamília; tipo II quando o domínio dedo de zinco rico em cisteínas está ausente; e tipo III quando as proteínas compartilham apenas o domínio J, localizado não necessariamente na porção N-terminal, neste caso (Cheetham *et al.*, 1992; Kampinga e Craig, 2010).

O domínio J é responsável pela interação com as chaperonas da família HSP70 e por coordenar o reconhecimento e a ligação dessas aos seus substratos específicos desnaturados, permitindo assim que o processo de renaturação ocorra harmoniosamente (Glover e Lindquist, 1998). Além disso as DnaJs também podem atuar independentemente como chaperonas moleculares em uma ampla gama de organismos, desde leveduras até humanos (Cheetham *et al.*, 1992; Berruti *et al.*, 1998).

Foi demonstrado que *A. thaliana* possui um conjunto de proteínas com domínio J (AtERdj2A, AtERdj2B, AtERdj3A, AtERdj3B e AtP58IPK,) ortólogas às encontradas em leveduras, participando de funções específicas do retículo endoplasmático como translocação, enovelamento e controle de qualidade de proteínas, atuando como parceiras da proteína Bip, um tipo de HSP70 (Yamamoto *et al.*, 2008).

As chaperonas moleculares da família HSP70/DnaK são uma classe de proteínas conservadas nos três Domínios, e por estarem envolvidas em uma série de processos celulares são componentes importantes que atuam na homeostase da célula. São responsáveis por funções tais como, dobramento de proteínas recém-sintetizadas, redobramento de proteínas desnaturadas por algum tipo de estresse, translocação organelar, secreção de proteínas, montagem e desmontagem de complexos protéicos, degradação de proteínas e como receptores para sinalização (Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Young *et al.*, 2004; Mayer e Bukau, 2005). A importância dessa classe de chaperonas também reside no papel que desempenham na regulação do ciclo celular, morte celular e manutenção do equilíbrio da célula, sobretudo quando esta se encontra ameaçada por estresses diversos (Helmbrecht e Rensing, 1999; Beere e Green, 2001).

As HSP70s apresentam uma atividade intrínseca para hidrólise de ATP muito baixa, sendo esta drasticamente aumentada pela parceria com co-chaperonas da família HSP40 (DnaJ) (Russell *et al.*, 1999). O sistema HSP70-DnaJ otimiza a transdução de sinais em vias de sinalização, permitindo a rápida modulação de respostas biológicas (Kelley, 1998). Apesar do elevado grau de conservação das HSP70, interações com as variadas proteínas celulares ocorrem em processos mediados pelas DnaJ, que apresentam uma alta diversidade e se encontram em maior número na célula, sendo então as responsáveis por orquestrar a multifuncionalidade dessas chaperonas e direcionar a ligação específica dessas aos substratos alvos (Kampinga e Craig, 2010).

Homólogos das HSP70 celulares (HSP70h) são codificados pelos closterovírus, por exemplo o *Citrus tristeza virus* (CTV), e tem papel importante durante a montagem das partículas virais juntamente com outra proteína viral, p61 (Satyanarayana *et al.*, 2000). Há relatos de co-localização de HSP70h com miosinas vegetais: em *Nicotiana benthamiana*, o direcionamento da HSP70h codificada pelo closterovírus *Beet yellows virus* (BYV) aos plasmodemas ocorre por intermédio de uma miosina da classe VIII, favorecendo o movimento (Avisar *et al.*, 2008).

Comparando as HSP70h e as HSP70 das plantas quanto à translocação de polipeptídeos, é pertinente considerar que essas últimas, dentre outras funções na infecção, se comportam como proteínas de movimento acessórias codificadas pelo genoma do próprio hospedeiro (Avisar *et al.*, 2008). As HSP70 podem desempenhar funções que auxiliam a replicação (Tomita *et al.*, 2003), podem associar-se a proteínas de membrana no hospedeiro e estarem envolvidas com a translocação de proteínas virais (Hofius *et al.*, 2007), bem como regular a montagem ou a desmontagem do capsídeo (Satyanarayana *et al.*, 2000).

Considerando o importante papel das chaperonas da classe HSP70 no funcionamento da célula, não é surpresa que desempenhem funções críticas durante as infecções virais. Um primeiro indício do envolvimento dessas proteínas no processo infeccioso, tanto em animais quanto em plantas, é a indução desses genes em diferentes etapas da doença (Aranda *et al.*, 1996; Whitham *et al.*, 2003; Aparicio *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2009; Padwad *et al.*, 2010; Lahaye *et al.*, 2012).

As proteínas DnaJ foram citadas pela primeira vez em trabalhos com *Escherichia coli*, onde essas co-chaperonas desempenham funções essenciais para a replicação do bacteriófago  $\lambda$ . Em células infectadas da bactéria a interação DnaJ/DnaK estimula a atividade de ATPase da DnaK, otimizando as funções biológicas dessa chaperona. Esse sistema participa da formação do complexo replicativo no ciclo do bacteriófago (Saito e Uchida, 1977; Sunshine *et al.*, 1977; Zylicz *et al.*, 1989).

O domínio J conservado em procariotos e eucariotos também pode ser encontrado em vírus, como é o caso dos poliomavírus, onde foi demonstrada uma função típica atribuída a presença desse domínio, que é o estímulo da atividade de ATPase das chaperonas HSP70. É notável também a presença do tripeptídeo conservado HPD, que permitem a interação com a HSP70 (Decaprio, 1999).

Durante a infecção pelo *Simian virus 40* (SV40) foi proposto que o domínio J participa da oncogênese nas células infectadas, onde por meio da interação com uma chaperona HSC70 ("heat-shock cognate protein" 70) contribui para inativação de proteínas pRB (retinoblastomas), como p130 e p107, supressoras tumorais. Os estudos demonstraram que a meia-vida das retinoblastomas diminui e sua fosforilação é deficiente quando o domínio J está intacto no patógeno, sugerindo o encaminhamento dessas proteínas para uma via de degradação. Outro papel importante atribuído ao domínio J no ciclo do SV40 é a replicação (Decaprio, 1999).

Dufresne *et al.* (2008) demonstraram que uma HSP70 de *A. thaliana* co-localiza em estruturas membranares induzidas pelo potyvírus TuMV durante a replicação, e que essa HSP70 interage com a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) do vírus, sugerindo que a chaperona do hospedeiro deve ser peça chave na replicação desse potyvírus.

Co-chaperonas com domínio J também podem ser induzidas durante a infecção viral (Alfenas-Zerbini *et al.*, 2009). Seria esse evento biológico uma maneira refinada de utilização do recurso HSP70 do hospedeiro em benefício à sobrevivência e propagação dos vírus ? Algo que favorece esse argumento já foi demonstrado por Hofius *et al.* (2007), ao demonstrarem que uma DnaJ de *N. tabacum* interage com a proteína capsidial do PVY e que a perturbação no domínio de interação afeta negativamente o ciclo de infecção viral. Aparentemente essa interação ternária proteína viral-HSP70-DnaJ é fundamental em alguns patossistemas envolvendo vírus.

Em *N. tabacum* foi demonstrado que a proteína NtMPIP1, uma DnaJ, interage com a proteína de movimento do TMV e que essa interação facilita o movimento célula-a-célula (Shimizu *et al.*, 2009).

Contrariamente ao papel difundido das DnaJs, que geralmente regulam positivamente fases do ciclo viral, Sohn *et al.* (2006) relataram um efeito negativo de Hdj1 e hTid1, membros dessa mesma subfamília de proteínas, cujo silenciamento em células de humanos conduziu a um aumento da replicação do *Hepatitis B virus* (HBV).

O conjunto de resultados acerca da atuação das DnaJ na infecção viral em organismos distintos demonstra a complexidade e a diversidade de funções dessas proteínas, que podem desempenhar papéis antagônicos em diferentes interações vírus-hospedeiro.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Isolado viral**

O isolado 3 do PepYMV foi descrito por Truta *et al.* (2004), e vem sendo mantido em plantas de *Nicotiana debneyi* por meio de inoculações sucessivas via extrato vegetal tamponado utilizando-se folhas maceradas em fosfato de potássio 0,2M pH 7,2 com 0,1% de bissulfito de sódio, na proporção de 1 g de folha para 5 ml de tampão. As plantas infectadas são mantidas em casa-de-vegetação.

#### **3.2. Análise da sequência do gene *DnaJ***

As análises foram realizadas a partir da sequência clonada em uma biblioteca subtrativa de cDNA de tomateiro infectado pelo PepYMV (Alfenas-Zerbini *et al.*, 2009). As análises foram realizadas com os programas BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) e Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). A tradução da sequência de nucleotídeos e a busca por domínios conservados foi realizada com auxílio dos programas ORF Finder ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/)) e SMART (Schultz *et al.*, 1998), respectivamente.

#### **3.3. Cinética da expressão do gene *DnaJ* em *N. benthamiana* infectada pelo PepYMV**

O estudo da cinética da expressão do gene *DnaJ* em *N. benthamiana* foi realizado durante diferentes etapas da infecção pelo PepYMV. Cinco plantas foram inoculadas com extrato vegetal tamponado a partir de folhas de *N. debneyi* infectadas pelo PepYMV e cinco plantas apenas com tampão de inoculação, conforme descrito no item 3.1. A inoculação foi realizada no segundo par de folhas verdadeiras. As folhas inoculadas foram coletadas 0, 48, 72, 96 horas e 14 dias após a inoculação. As folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. A infecção viral nas plantas inoculadas foi confirmada por ELISA indireto conforme descrito por Truta *et al.* (2004), aos 14 dias após a inoculação. O nível de expressão do gene *DnaJ* foi determinado por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR).

### 3.4. RT-PCR quantitativo

O RNA total foi extraído a partir de aproximadamente 100 mg de folhas maceradas em nitrogênio líquido, utilizando-se o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) conforme recomendações do fabricante. A qualidade do RNA total extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose (0,8%). O RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Dois microgramas de RNA total foram tratados com DNase I (Promega) e o RNA tratado foi utilizado para síntese de cDNA utilizando-se oligo-d(T) e a enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000.

Nas reações de qRT-PCR foram utilizados 150 ng de cDNA. Todas as análises quantitativas foram realizadas em um termociclador CFX96 Real-Time System (Bio-Rad), utilizando-se Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e a especificidade da amplificação foi confirmada por meio da análise das curvas de dissociação.

A quantificação do nível de expressão do gene *DnaJ* foi realizada pelo método comparativo de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando-se os oligonucleotídeos NbDNAJ-F (5'-GTT GCC ACC AAA ACC CAA AA-3') e NbDNAJ-R (5'-ATG CAA AGT GGT CTC CTC ACA CT-3'). Como normalizador utilizou-se o gene que codifica para a histona H2b2 (Bruckner, 2010).

A determinação da carga viral foi realizada por quantificação absoluta. Foi utilizada uma curva padrão, obtida por meio de diluições seriadas de DNA plasmidial contendo a sequência codificadora da proteína capsidial do PepYMV ( $10^0$  a  $10^6$  cópias do plasmídeo por reação). A curva padrão foi obtida por regressão dos valores de  $C_T$  de cada uma das três repetições de uma dada diluição em relação ao log da quantidade de DNA plasmidial em cada diluição. A carga viral foi determinada por interpolação dos valores de  $C_T$  de cada amostra testada (Rutledge e Cote, 2003).

### 3.5. Efeito do silenciamento do gene *DnaJ* na infecção pelo PepYMV

Para induzir o silenciamento do gene *DnaJ* em *N. benthamiana*, um fragmento de aproximadamente 600 nt foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos NbDNAJ-SalI-F (5'-AAA GTC GAC ATG TTT GGG AGG GCA C-3', sítio de *Sal* I

sublinhado) e NbdNAJ-NotI-R (5'-ATA GCG GCC GCT TAC TGT TGT GCA C-3', sítio de Not I sublinhado). O fragmento foi inserido em um vetor viral baseado no RNA2 do *Tobacco rattle virus* (TRV) (Liu *et al.*, 2002), gerando a construção TRV2-NbDnaJ. Como controle positivo da indução do silenciamento, um fragmento de aproximadamente 400 nt do cDNA do gene *PDS*, que codifica a enzima fitoeno desaturase, foi inserido no vetor viral TRV2, gerando a construção TRV2-PDS. O silenciamento do gene *PDS* leva ao aparecimento de regiões cloróticas nas folhas devido à foto-oxidação da clorofila, um fenótipo facilmente observado. Como controle negativo, um fragmento de 400 nt do gene *GFP*, que não faz parte do genoma da planta, foi clonado e inserido no vetor, gerando a construção TRV2-GFP (Bruckner, 2010). As construções foram transformadas em *A. tumefaciens* estirpe C58C1 por choque térmico (Brasileiro, 1998) e utilizadas para agroinfiltração das plantas de *N. benthamiana*.

Plantas com aproximadamente 15 dias pós-germinação foram transferidas para câmara-de-crescimento com temperatura (22°C) e fotoperíodo (14h) controlados, e foram mantidas nestas condições durante no mínimo cinco dias antes da agroinfiltração. Seis plantas foram agroinfiltradas com cada uma das três construções (TRV-NbDnaJ, TRV-PDS e TRV-GFP), e seis plantas foram mantidas sem infiltração.

As culturas de *A. tumefaciens* transformadas com as diferentes construções foram incubadas até OD<sub>600</sub> de 0,6 e então centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos. As células foram ressuspensas em tampão de agroinfiltração (MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 10 mM, acetoseringona 200 µM) ajustando-se a OD<sub>600</sub> para 1,2, e em seguida foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente. Uma mistura de volumes iguais de uma suspensão de *A. tumefaciens* transformada com o RNA1 do TRV (TRV1) e de outra com o gene clonado em TRV2 foi utilizada para agroinfiltração na face abaxial das folhas, com a utilização de seringas estéreis sem agulha, pressionando-se levemente a epiderme da folha.

Após o aparecimento e estabelecimento do fenótipo de silenciamento, baseado no silenciamento do gene *PDS*, aproximadamente 12 dias após agroinfiltração, as plantas foram inoculadas com o isolado 3 do PepYMV conforme descrito no item 3.1. Tanto nos controles como no tratamento foram mantidas três plantas não inoculadas com o vírus, a fim de diferenciar os sintomas da infecção viral de possíveis fenótipos causados pelo silenciamento do gene *DnaJ*. Foram coletadas folhas inoculadas apenas com tampão e inoculadas com o PepYMV, imediatamente antes da inoculação viral (0

hpi) e 72 horas pós-inoculação viral (72 hpi), e folhas jovens com infecção sistêmica aos 14 dias pós-inoculação viral (14 dpi). O material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. O nível de silenciamento do gene *DnaJ* e a carga viral nas amostras foram analisados por qRT-PCR conforme descrito no item 3.4.

### **3.6. Efeito do silenciamento do gene *TCTP* na infecção pelo PepYMV**

#### **3.6.1. Transformação genética de tomateiro para silenciamento de *TCTP***

Sementes de tomateiro da cultivar Moneymaker foram desinfestadas por imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro ativo, sob agitação, por 20 minutos. As sementes desinfestadas foram lavadas quatro vezes em água Milli-Q autoclavada e, após secagem em papel-filtro estéril, foram depositadas para germinação em recipientes magenta contendo meio de cultura MS meia força (Murashige e Skoog, 1962), mio-inositol a 50 mg/l, sacarose a 10 g/l, ágar-gel a 6 g/l e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962). Durante a fase de germinação foram mantidas em sala de crescimento (26±2°C) por 10 dias sob irradiância de 24  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  e fotoperíodo de 16 horas. Após a germinação, os hipocótilos foram seccionados e pré-cultivados por 48 horas na ausência de luz em meio de regeneração, composto por sais MS força total (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de Nitsch e Nitsch (1969), zeatina a 1 mg/l, sacarose a 2 g/l, e acetoseringona 100  $\mu\text{M}$ . Em seguida realizou-se o co-cultivo, no qual a cultura de *A. tumefaciens* GV3101, contendo a construção pK7WG2-TCTP, que direciona a superexpressão do gene *TCTP* (Cascardo, 2011) foi incubada a 28°C em meio Luria-Bertani (LB) acrescido dos antibióticos espectinomicina, estreptomicina e gentamicina nas concentrações de 300, 100 e 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente. Em seguida as culturas foram centrifugadas a 10.000 *g* por 10 minutos a 22°C e ressuspensas em 10 ml de meio MS líquido acrescido de mio-inositol a 100 mg/l e sacarose a 20 g/l. A densidade ótica das suspensões foi medida em espectrofotômetro e ajustada para 0,4 por meio da adição de meio MS. Os explantes foram imersos por 5 minutos na suspensão de *A. tumefaciens* e em seguida foram secos em papel-filtro estéril e transferidos novamente para o meio de pré-cultivo contendo um papel-filtro autoclavado e estéril disposto sobre o meio, no qual foram

mantidos por mais 2 dias em sala de crescimento ( $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) sob irradiância de  $24\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  e fotoperíodo de 16 horas.

Após o co-cultivo os explantes foram transferidos para meio de regeneração seletivo (MS força total, zeatina a 2 mg/l, timentin a 300 mg/l e canamicina a 100mg/l) no qual permaneceram por um período de 20 dias. Decorrida a etapa de regeneração, os explantes foram transferidos para meio de alongamento (MS força total, zeatina a 1mg/l e os mesmos antibióticos do meio de regeneração), no qual foram mantidos por 30 dias. Brotações diferenciadas e alongadas foram seccionadas e transferidas para meio de enraizamento (MS força total, ácido indolacético a 0,2 mg/l, timentin a 300 mg/l). Todas as etapas foram realizadas em sala de crescimento ( $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) sob irradiância de  $24\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  e fotoperíodo de 16 horas.

Para a pré-aclimatização, as plantas enraizadas foram transferidas para copos descartáveis com água cobertos por sacos plásticos, permanecendo em câmara-de-crescimento ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 15 dias. Os sacos plásticos foram gradativamente abertos a cada dois dias para a realização de trocas gasosas e diminuição da umidade relativa do ar. Em seguida foi acrescido aos copos substrato orgânico, mantendo-se as mesmas condições já citadas acima durante 15 dias. Após essa fase inicial, as plantas foram transplantadas para vasos contendo uma mistura de solo e substrato na proporção 1:1 e transferidas para casa-de-vegetação até a completa adaptação ao novo ambiente.

### 3.6.2. *Confirmação da inserção do T-DNA*

Discos com aproximadamente 1 cm de diâmetro de tecido foliar dos regenerantes foram utilizados para a extração de DNA total (Doyle e Doyle, 1987). Para a confirmação da inserção do T-DNA no genoma do tomateiro realizou-se PCR com o par de oligonucleotídeos p35S-F (5'-GCT CTA CAA ATG CCA TCA-3') e TCTP-R (5'-CCC AAA GCA CGC CAT TCT-3') que amplificam um fragmento de aproximadamente 1.600 nucleotídeos (nt), correspondente à região entre a extremidade 5' do promotor 35S do CaMV e a extremidade 3' do gene *TCTP*. Uma alíquota de 10  $\mu\text{l}$  da reação de PCR foi utilizada para análise dos amplicons por meio de eletroforese em gel de agarose (0,8%).

### 3.6.3. Análise da ploidia das plantas transgênicas

Para determinar o conteúdo de DNA das linhagens transformadas, foram selecionadas folhas da porção mediana das plantas obtidas e dos respectivos controles não transformados.

Aproximadamente 20-30 mg de tecido foliar de cada planta e do padrão interno de referência (tomateiro cv. Stupike, valor  $2C = 1,93$  pg), foram fragmentados na presença de tampão LBO1 para liberação dos núcleos (Dolezel e Bartos, 2005). Essa mistura de tecido vegetal e tampão foi aspirada através de dupla camada de tela metálica com uma pipeta plástica, filtrada através de uma membrana de náilon de 50  $\mu$ m e coletada em um tubo de poliestireno. A suspensão de núcleos foi corada com 25  $\mu$ l de solução de iodeto de propídio a 1 mg/ml, adicionando-se 5  $\mu$ l de RNase a cada amostra. As amostras foram armazenadas a 4°C e analisadas após 2 horas.

Um mínimo de 1.000 núcleos foram analisados para cada amostra, utilizando-se um visor de escala logarítmica em um citômetro Facscalibur (Becton Dickinson). Cada histograma citométrico foi salvo utilizando-se o software Cell Quest e analisado com o software WinMD1 2.8. O conteúdo de DNA nuclear (pg) foi estimado de acordo com a equação descrita em Dolezel e Bartos (2005):

$$\text{Amostra (2C DNA)} = \frac{\text{conteúdo do pico G1 da amostra}}{\text{conteúdo do pico G1 do padrão}} \times \text{conteúdo de DNA do padrão}$$

### 3.6.4. Avaliação do nível de expressão do transgene

O nível de expressão do mRNA do gene *TCTP* nas plantas com inserção do T-DNA confirmada foi determinado por meio de qRT-PCR, 0 horas e 72 hpi e 14 dpi. A extração e quantificação de RNA total, síntese de cDNA, quantificação relativa e carga viral foram realizados conforme descrito no item 3.4. Os oligonucleotídeos para quantificação do nível de expressão do gene *TCTP* foram os mesmos utilizados por Alfenas-Zerbini *et al.* (2009).

### 3.6.5. Extração de proteínas totais e Western blot

O nível de expressão da proteína TCTP foi verificado por *Western blot* (Sambrook e Russel, 2001). Inicialmente 0,3 g de folhas das plantas transformadas e com o nível de mRNA do gene *TCTP* já analisado foram macerados em nitrogênio líquido, adicionando-se 1 ml de tampão de extração (Tris-HCl 150 mM pH 6,8,

$\beta$ -mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%). O extrato foi transferido para um tubo de microcentrífuga e fervido por três minutos. A amostra foi centrifugada a 10.000 g por cinco minutos e 15  $\mu$ l do sobrenadante foram utilizados para eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.

Após a eletroforese, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) por 30 minutos. As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore) utilizando-se o aparelho Mini Trans-Blot Cell (BioRad), conforme as instruções do fabricante.

Após a transferência a membrana foi incubada em leite em pó desnatado 5% em PBS (NaCl 0,15 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM, KCl 2 mM,  $\text{NaN}_3$  3 mM) por duas horas a temperatura ambiente, sob agitação lenta. Em seguida a membrana foi lavada brevemente com PBS-T (PBS acrescido de 0,3% de Tween-20) e incubada em 15 ml de anti-soro específico para TCTP (P. Alfenas-Zerbini, dados não publicados) diluído 1:1.000 em PBS, sob agitação lenta, por 1,5 horas a temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada em PBS-T (duas vezes por 15 minutos) e incubada em 15 ml de conjugado cabra anti-coelho diluído 1:2.000 em PBS, sob agitação lenta, por 1,5 horas a temperatura ambiente. A membrana foi lavada em PBS-T (três vezes por 15 minutos) e incubada em 10 ml de substrato (Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit, BioRad), no escuro, por até 30 minutos, verificando-se o progresso da reação a cada 5 minutos.

#### 3.6.6. Inoculação das plantas transgênicas com o PepYMV

Linhagens com o silenciamento do gene *TCTP* confirmado foram inoculadas com o PepYMV. A inoculação foi realizada via extrato vegetal tamponado, conforme descrito no item 3.1. Seis plantas foram inoculadas para cada linhagem obtida: três apenas com o tampão de inoculação e três com o PepYMV. A infecção viral foi verificada aos 14 dpi por meio de ELISA indireto com anti-soro específico para o PepYMV (Truta *et al.*, 2004), e a carga viral foi determinada por qRT-PCR aos 72 hpi e 14 dpi, conforme descrito no item 3.4.

### 3.7. Localização subcelular de TCTP em plantas de *N. benthamiana* infectadas pelo PepYMV

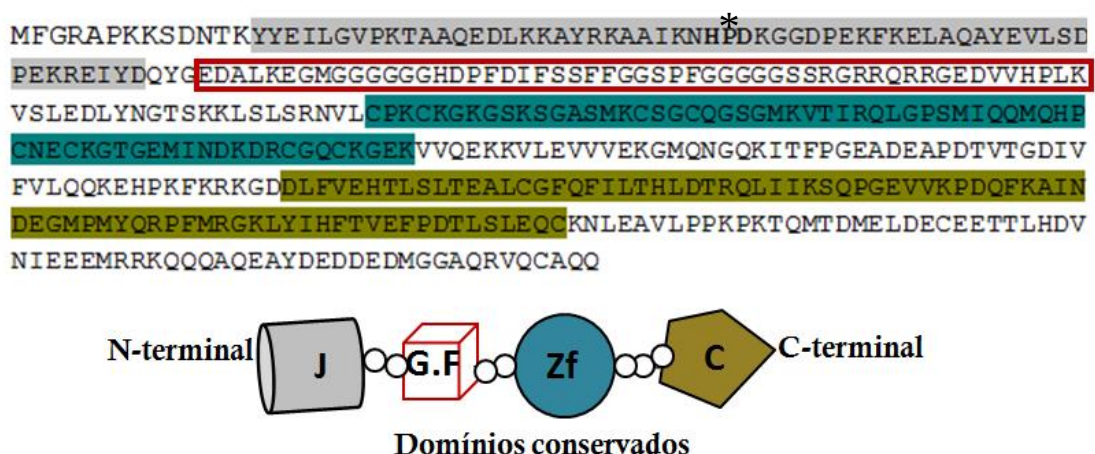
Plantas de *N. benthamiana* foram cultivadas em casa-de-vegetação, e aproximadamente 4 semanas após a germinação foram transferidas para câmara-de-crescimento a 22°C com fotoperíodo de 16 horas, condições nas quais foram mantidas por 10 dias antes da agroinfiltração. A cultura de *A. tumefaciens* GV 3101 contendo a construção pK7WGF2-TCTP (que expressa a proteína TCTP fusionada a GFP) foi incubada a 28°C em 50 ml de meio LB contendo os antibióticos apropriados, até atingir O.D.<sub>600</sub> de 0,6. A cultura foi centrifugada a 6.000 *g* por 10 minutos, e as células foram ressuspendidas em tampão de infiltração (MES 10 mM pH 5,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mM e acetosseringona 200 µM) ajustando-se a O.D.<sub>600</sub> para 0,1. Plantas de *N. benthamiana* com infecção pelo PepYMV já estabelecida (12 dias antes da agroinfiltração) e plantas saudáveis foram agroinfiltradas com a cultura de *A. tumefaciens* contendo a construção descrita.

Transcorridas 48 horas após a agroinfiltração, as folhas foram observadas em microscópio confocal LSM 510 META (Carl Zeiss). A análise foi realizada em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> montados em lâminas com água. Para excitação do fluoróforo foi utilizado comprimento de onda de 488 nm. As imagens foram processadas com o software LSM Image Browser 4 (Carl Zeiss) e com o programa Adobe Photoshop 7.0.1.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise da sequência do gene *DnaJ*

A proteína DnaJ de tomateiro possui 419 aminoácidos e uma massa molecular de 45kDa, e apresenta os quatro domínios típicos de membros da subfamília de proteínas com domínio J. Assim, pertence ao tipo I de DnaJ (Figura 2), e possui o tripeptídeo conservado HPD responsável pela interação com as chaperonas HSP70 na porção N-terminal, especificamente no domínio J. Entretanto, não possui o tetratricopeptídeo conservado (TPR) que corresponde a 34 aminoácidos localizados também no domínio J.

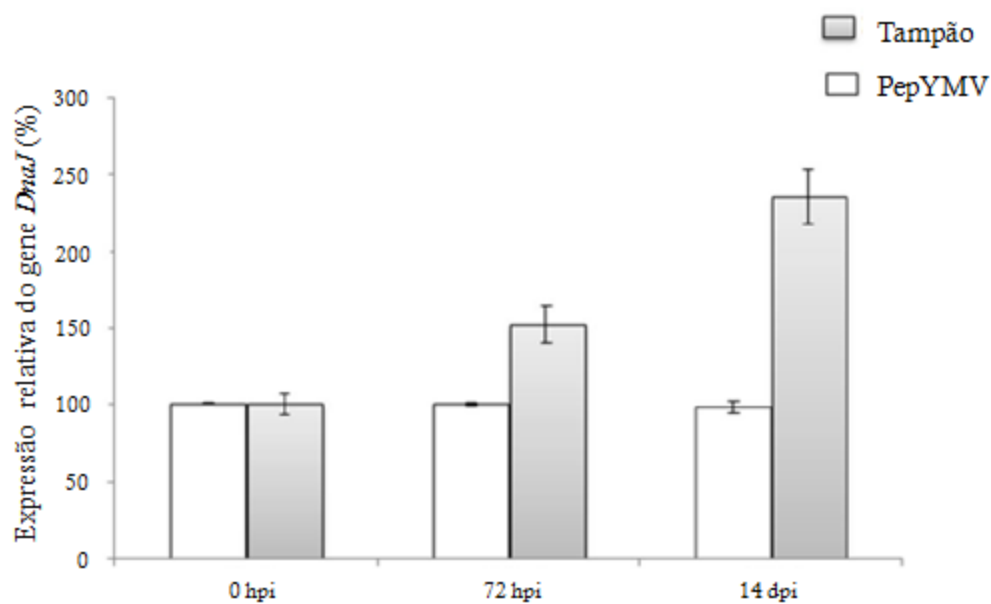


**Figura 2.** Domínios conservados na sequência de aminoácidos da proteína DnaJ de *S. lycopersicum*. Domínio J (cinza); domínio rico em aminoácidos glicina e fenilalanina (marcado em vermelho); domínio dedo de zinco rico em cisteínas (verde) e o domínio carboxi-terminal pouco conservado (mostarda); \* tripeptídeo conservado histidina (H) - prolina (P) - aspartato (D).

### 4.2. Cinética da expressão do gene *DnaJ* durante a infecção pelo PepYMV

O gene de *N. benthamiana* que codifica uma DnaJ homóloga à de tomateiro foi avaliado quanto à cinética da expressão durante o ciclo da infecção viral pelo PepYMV. Verificou-se que ocorre uma indução significativa, em torno de 50%, da expressão

desse gene 72 horas pós-inoculação (hpi) em relação a plantas não infectadas. Aos 14 dias pós-inoculação (dpi) foi detectado um aumento na abundância dos transcritos desse gene superior ao dobro do valor observado em plantas não infectadas, inoculadas apenas com tampão (Figura 3). A análise das plantas infectadas 48 hpi e 96 hpi revelou não haver diferenças significativas na expressão do gene *DnaJ* entre essas e as plantas não infectadas (dados não mostrados).



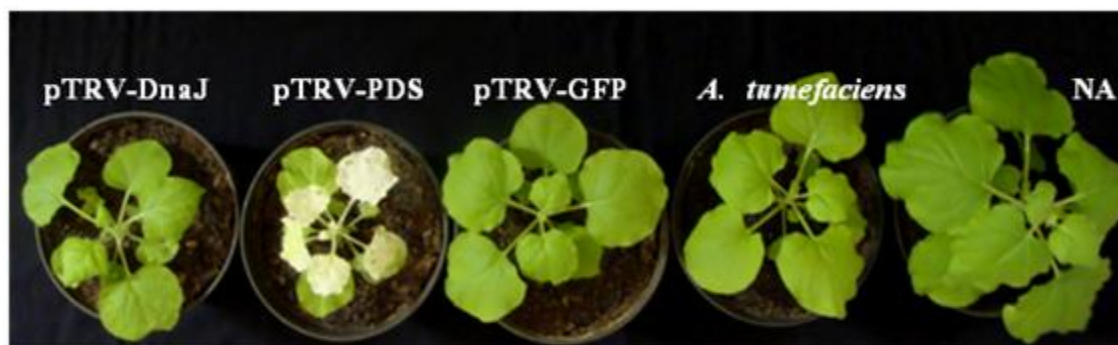
**Figura 3.** Expressão relativa do mRNA do gene *DnaJ* ao longo da infecção pelo potyvírus PepYMV em *N. benthamiana*. **PepYMV**, plantas inoculadas com o vírus. **Tampão**, plantas não infectadas, inoculadas apenas com solução tampão.

#### 4.3. Efeito do silenciamento do gene *DnaJ* na infecção pelo PepYMV

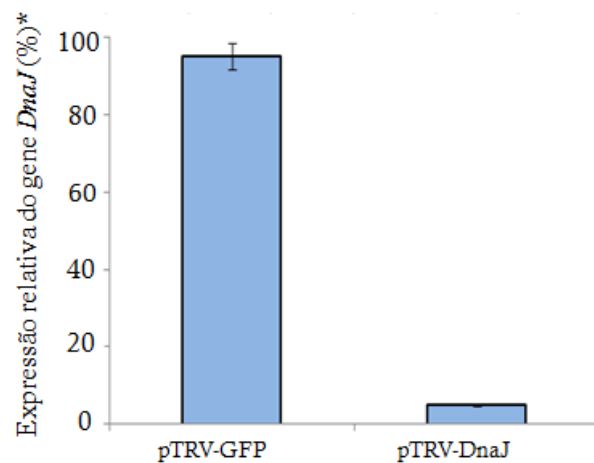
Detectados os picos de superexpressão do gene *DnaJ* durante a infecção viral (72 hpi e 14 dpi), avaliou-se o efeito do silenciamento desse gene durante a doença, como uma forma de inferir se essa proteína atua como um componente da resposta de defesa da planta ou como um fator de suscetibilidade. Além da construção pTRV2-

DnaJ, foram utilizadas também as construções pTRV2-GFP e pTRV2-PDS para co-agroinfiltração com o pTRV1.

A indução do silenciamento do gene *PDS* foi constatada cerca de quatro semanas após a agroinfiltração (Figura 4). Estando todas as plantas silenciadas para o gene *PDS*, assumiu-se que as plantas também estavam efetivamente silenciadas para o gene *DnaJ*. A análise de qRT-PCR confirmou o silenciamento do gene *DnaJ* nas plantas de *N. benthamiana* no tempo 0 hpi, que corresponde ao momento imediatamente anterior à inoculação com o PepYMV (Figura 5). O silenciamento induzido por VIGS resultou em uma redução de 95% nos transcritos do gene *DnaJ*. Esse nível tão elevado de silenciamento afetou a morfologia e o hábito de crescimento, sendo o fenótipo das plantas silenciadas para o *DnaJ* similar ao observado em plantas de *N. benthamiana* naturalmente infectadas pelo PepYMV (Figura 6).



**Figura 4.** Fenótipo das plantas silenciadas para o gene *DnaJ* (pTRV2-DnaJ) e dos controles agroinfiltrados com as construções (pTRV-PDS e pTRV-GFP), quatro semanas após a agroinfiltração. *A. tumefaciens*, planta agroinfiltrada com cultura de *A. tumefaciens* sem plasmídeo. NA, planta não agroinfiltrada.



**Figura 5.** Expressão relativa do mRNA do gene *DnaJ* em plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções pTRV-GFP e pTRV-DnaJ. Média de seis plantas agroinfiltradas com as respectivas construções. \*Valor médio de cinco plantas.



**Figura 6.** Plantas silenciadas para o gene *DnaJ* exibem anormalidades similares a plantas infectadas pelo PepYMV. **pTRV-DnaJ**, planta silenciada para o gene *DnaJ*, não inoculada com o PepYMV. **PepYMV**, planta não silenciada para o gene *DnaJ*, inoculada com o PepYMV. **pTRV-GFP**, planta agroinfiltrada com a construção para silenciamento de GFP, não inoculada com o vírus.

Além do tempo 0 hpi, avaliou-se o silenciamento nos tempos 72 hpi e 14 dpi (Figura 7). O gene *DnaJ* permaneceu silenciado após a inoculação com o PepYMV 72 hpi, porém aos 14 dpi mesmo em plantas silenciadas houve a indução da expressão do gene *DnaJ*. Conforme esperado, observou-se a indução da expressão do gene *DnaJ* a 72 hpi e 14 dpi em plantas infectadas pelo PepYMV.

Verificou-se que o silenciamento do gene *DnaJ* afetou o acúmulo do PepYMV a 72 hpi, com uma redução de aproximadamente 57% das unidades genômicas virais em comparação ao acúmulo do vírus em plantas não silenciadas (agroinfiltradas com a construção pTRV-GFP): o número de cópias do genoma viral foi reduzido de  $4,2 \times 10^7$  em plantas não silenciadas para  $1,8 \times 10^7$  em plantas silenciadas para o gene (Figura 8A). Quando a infecção viral já estava estabelecida (14 dpi), não houve diferença significativa entre a carga viral nas plantas silenciadas e nas plantas não silenciadas para o gene *DnaJ* (Figura 8B), sugerindo um papel crítico para o gene apenas nos estágios iniciais da infecção. Entretanto, sua contribuição em infecções já estabelecidas 14 dpi não pode ser descartada.

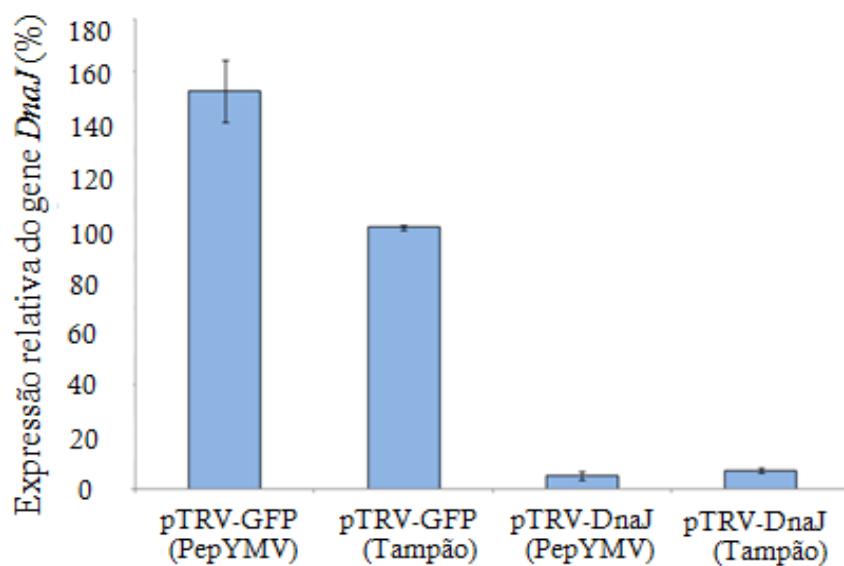
#### **4.4. Obtenção e caracterização de plantas transgênicas silenciadas para TCTP**

Para avaliar o papel da proteína TCTP durante o processo de infecção pelo PepYMV, plantas de tomateiro cv. Moneymaker foram transformadas com a construção pK7WG2-TCTP, que induz a superexpressão do gene *TCTP* (Figura 9).

Um total de 24 linhagens independentes foram regeneradas. Destas, 10 foram confirmadas para a integração do T-DNA no genoma via PCR, por meio da amplificação de um fragmento de aproximadamente 1.600 nt englobando desde a extremidade 5' do promotor 35S até a extremidade 3' do gene *TCTP* (Figura 10). A porcentagem de escapes durante a transformação foi, portanto, superior a 50%.

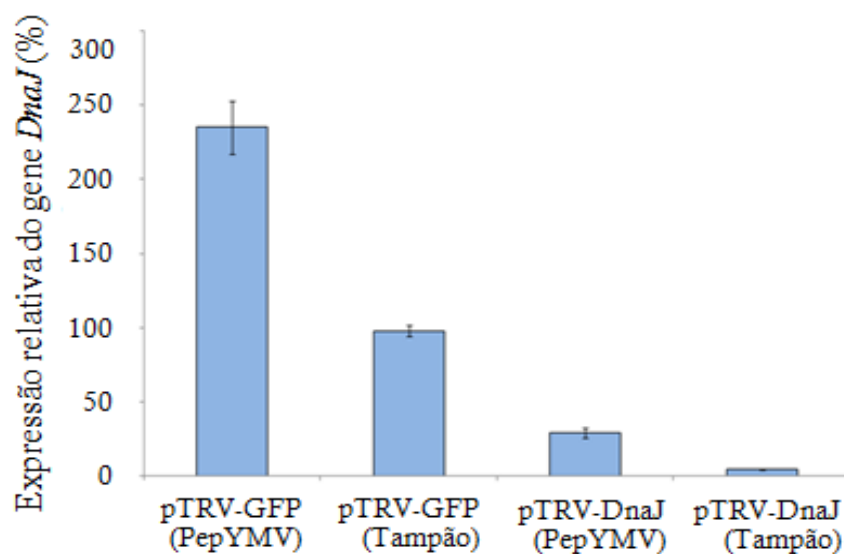
Após a aclimatização, as plantas com a inserção do T-DNA confirmadas foram mantidas em casa-de-vegetação para observação do desenvolvimento e coleta de frutos e sementes. As 10 linhagens confirmadas, denominadas TCTP5, TCTP6, TCTP8, TCTP11, TCTP13, TCTP19, TCTP20, TCTP22, TCTP23 e TCTP26, foram analisadas quanto à estabilidade da ploidia, e esta análise revelou a existência de 5 poliplóides (TCTP8, TCTP13, TCTP19, TCTP20 e TCTP23) (Figura 11; Tabela 1).

**A**



72 hpi

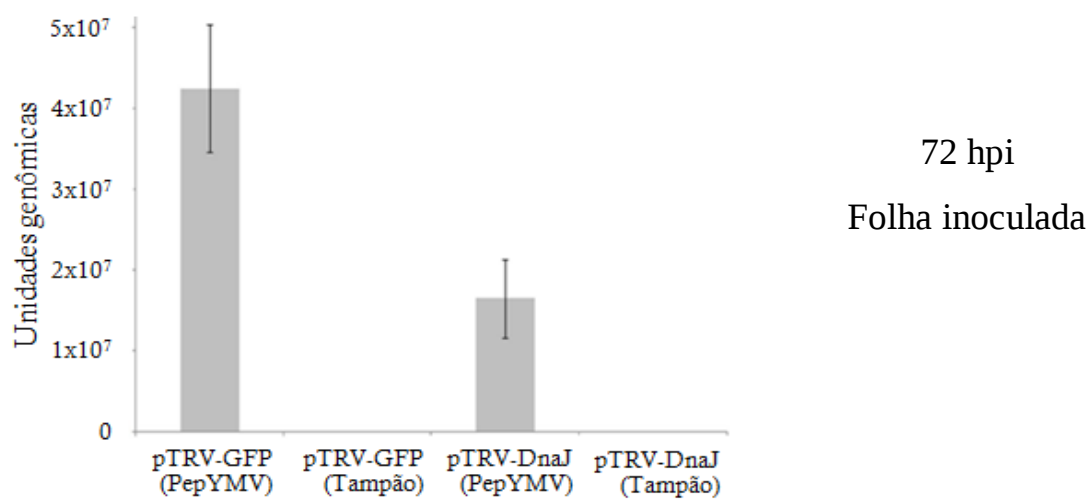
**B**



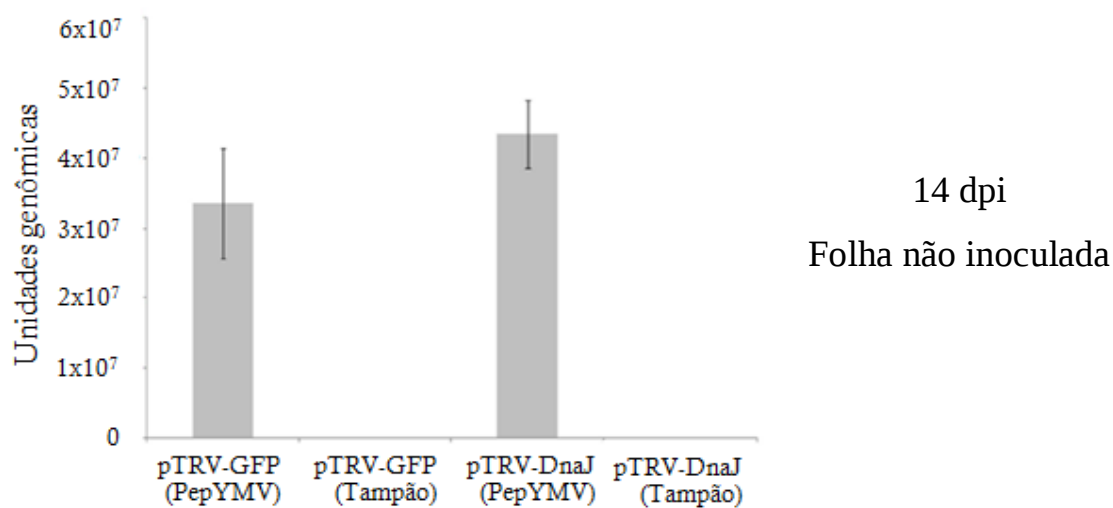
14 dpi

**Figura 7.** Expressão relativa do mRNA do gene *DnaJ* em plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções pTRV-GFP e pTRV-DnaJ, inoculadas com o PepYMV ou apenas com solução tampão, 72 horas pós-inoculação viral (hpi) (**A**) ou 14 dias pós-inoculação viral (dpi) (**B**). Média de três plantas agroinfiltradas com as respectivas construções.

**A**



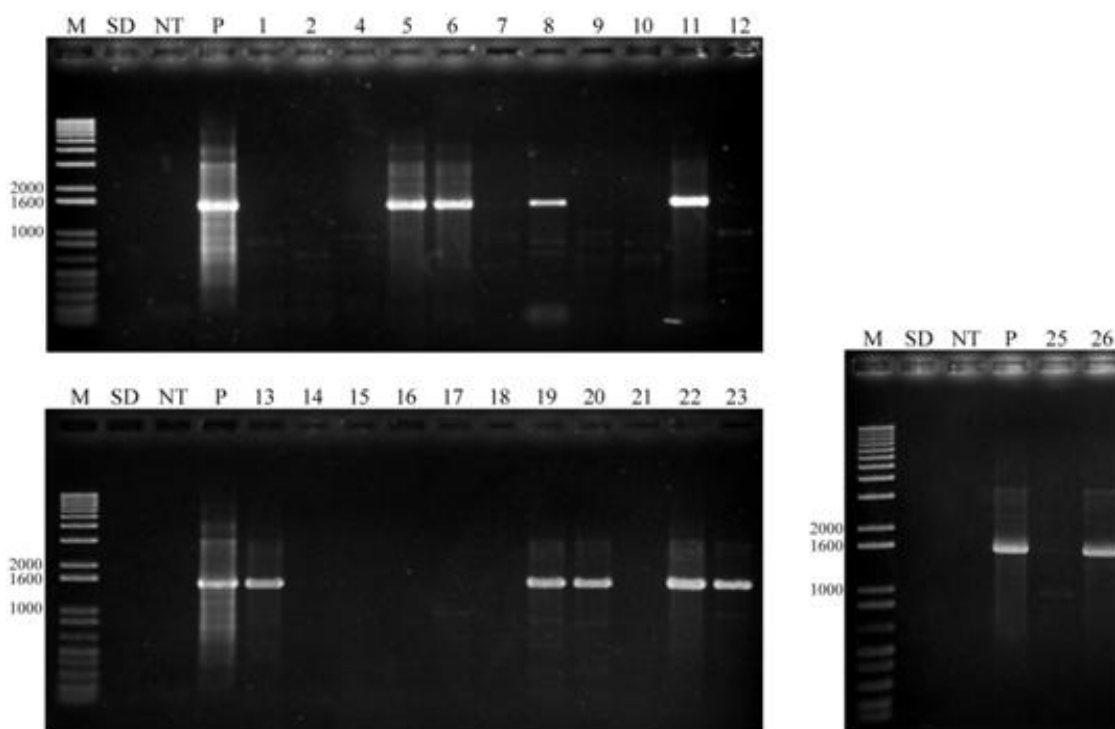
**B**



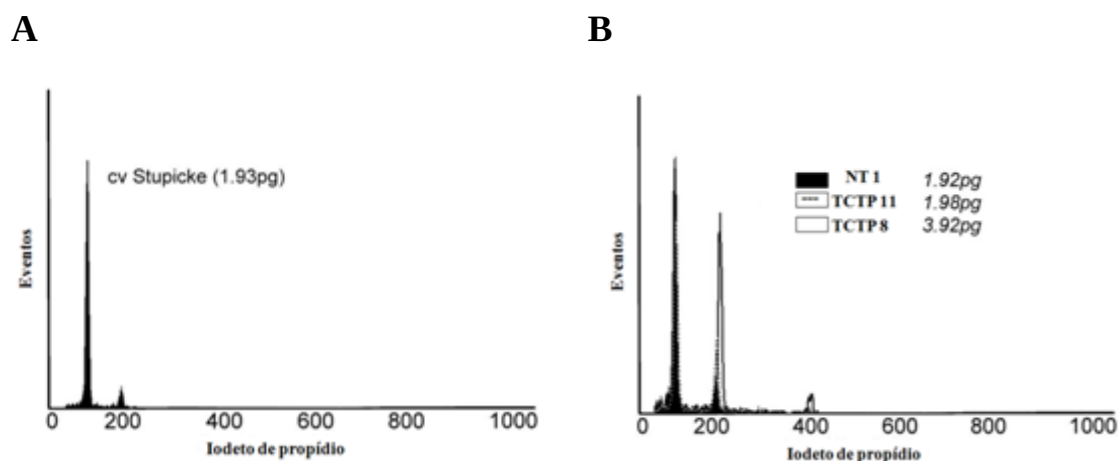
**Figura 8.** Carga viral do PepYMV em plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções pTRV-GFP e pTRV-DnaJ, inoculadas com o PepYMV ou apenas com solução tampão, 72 horas pós-inoculação viral (hpi) (**A**) ou 14 dias pós-inoculação viral (dpi) (**B**). Média de três plantas agroinfiltradas com as respectivas construções.



**Figura 9.** Representação esquemática da construção utilizada para a transformação de plantas de tomateiro com o objetivo de superexpressar o gene *TCTP*. **LB**, borda esquerda do T-DNA; **Kan**, gene de resistência a canamicina; **T35S**, terminador 35S; **attR1** e **attR2**, sítios de recombinação; **p35S**, promotor 35S; **RB**, borda direita do T-DNA. As setas indicam a direção da transcrição.



**Figura 10.** Confirmação da integração do T-DNA nas plantas regeneradas após transformação com a construção pK7WG2-TCTP. **M**, marcador de comprimento (1kb plus DNA ladder, em nt); **SD**, amplificação sem DNA (controle da reação); **NT**, amplificação a partir de planta não transformada (controle negativo); **P**, amplificação a partir de DNA plasmidial da construção pK7WG2-TCTP (controle positivo); **1-26**, amplificação a partir das plantas regeneradas.

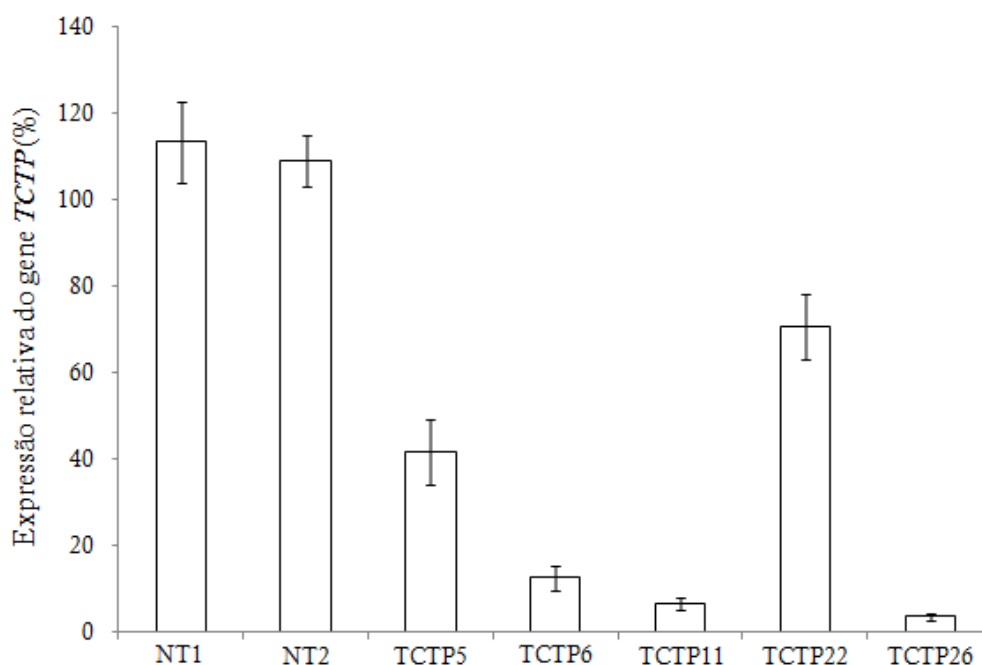


**Figura 11.** Histogramas de citometria de fluxo referentes às plantas transformadas e aos controles não transformados. **A.** Citograma com o padrão interno de tomateiro cv. Stupike (1,93 pg). **B.** Citograma com as quantidades de DNA das plantas transgênicas e do controle não transformado (NT1).

**Tabela 1.** Valores de DNA 2C em picogramas (pg) determinado pela análise de citometria de linhagens transgênicas (TCTP) e dos controles não transformados de tomateiro (cv. Moneymaker e Stupike).

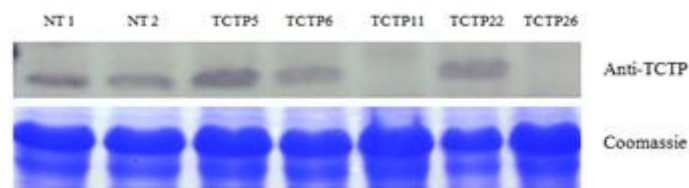
| Linhagem   | Quantidade de DNA (pg) | Ploidia (n) |
|------------|------------------------|-------------|
| Moneymaker | 1,92                   | 2n          |
| Stupike    | 1,93                   | 2n          |
| TCTP5      | 1,93                   | 2n          |
| TCTP6      | 1,95                   | 2n          |
| TCTP8      | 3,92                   | 4n          |
| TCTP11     | 1,93                   | 2n          |
| TCTP13     | 3,90                   | 4n          |
| TCTP19     | 3,93                   | 4n          |
| TCTP20     | 3,91                   | 4n          |
| TCTP22     | 1,99                   | 2n          |
| TCTP23     | 3,92                   | 4n          |
| TCTP26     | 1,96                   | 2n          |

As linhagens TCTP5, TCTP6, TCTP11, TCTP22 e TCTP26, nas quais a estabilidade da ploidia foi confirmada, foram analisadas quanto ao nível de expressão do transgene *TCTP*. Entretanto, ao contrário do esperado, a expressão do transgene foi reduzida (silenciada). O silenciamento foi observado em vários graus, desde plantas fortemente silenciadas até moderadamente silenciadas. As linhagens TCTP5 e TCTP22 apresentaram redução de 58 e 25%, respectivamente, do transcrito do gene *TCTP*, enquanto as linhagens TCTP6, TCTP11 e TCTP26 apresentaram redução de 83, 88 e 95%, respectivamente (Figura 12).



**Figura 12.** Expressão relativa do transgene *TCTP* em plantas das linhagens de tomateiro transformadas com a construção pK7WG2-*TCTP*. NT1 e NT2, plantas não transformadas; TCTPn, Linhagens transgênicas.

O acúmulo da proteína TCTP nas linhagens transformadas foi avaliado por *Western blot*. A análise indicou que a quantidade de proteína nas linhagens TCTP11 e TCTP26 é inferior ao limite de detecção. Nas demais linhagens (TCTP5, TCTP6 e TCTP22) foram detectadas quantidades consideráveis da proteína TCTP, comparáveis às plantas não transformadas (Figura 13).



**Figura 13.** Detecção da proteína TCTP em folhas de tomateiros transformados com a construção pK7WG2-TCTP e silenciados para *TCTP*. Painel superior: *Western blot* com anti-soro específico contra a proteína TCTP. Painel inferior: coloração do gel com Coomassie blue (controle de carregamento).

Fenotipicamente, as linhagens transgênicas TCTP5, TCTP6 e TCTP22 não apresentaram anormalidades acentuadas em comparação à planta não transformada (Figura 14). A linhagem TCTP11 apresentou necrose parcial nas sementes e um desenvolvimento mais lento em comparação à planta não transformada (Figura 14). A linhagem TCTP26 apresentou alteração na morfologia dos frutos, redução no porte da planta, número reduzido de frutos e sementes, alteração no hábito da inflorescência, necrose parcial e abortamento de sementes, e aumento do número de folíolos por folha (Figura 14).



**Figura 14.** Fenótipo das plantas de tomateiro transformadas com a construção pK7WG2-TCTP e silenciadas para *TCTP*. Comparação dos frutos, folhas e sementes das linhagens transgênicas (*TCTP<sub>n</sub>*) com a planta não transformada (*NT1*).

#### 4.5. Efeito do silenciamento do gene *TCTP* na infecção de tomateiro pelo PepYMV

Com a finalidade de investigar o possível envolvimento da proteína TCTP na infecção de tomateiro pelo PepYMV, linhagens de tomateiro silenciadas para o gene *TCTP* e plantas de tomateiro não transformadas (NT) foram propagadas vegetativamente, e inoculadas mecanicamente com o vírus. A infecção viral foi comprovada por ELISA aos 14 dpi em todas as cinco linhagens transgênicas (dados não mostrados).

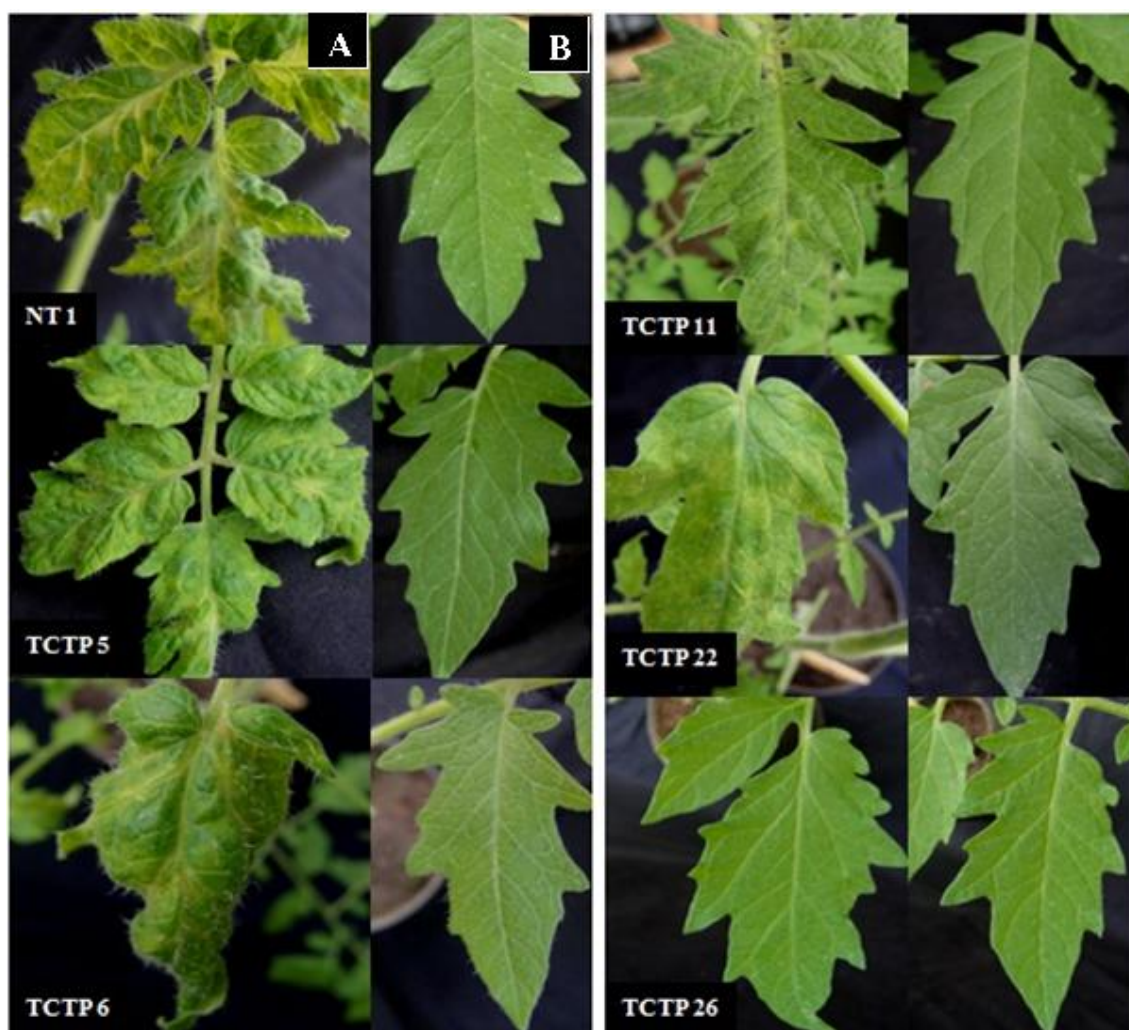
Aos 14 dpi já eram visíveis os sintomas da doença nas plantas não transformadas e também nas linhagens transgênicas TCTP5, TCTP6 e TCTP22, que acumulam a proteína TCTP em quantidade comparável à planta não transformada. As duas linhagens efetivamente silenciadas (TCTP 11 e TCTP26) comportaram-se como resistentes à infecção pelo PepYMV, exibindo apenas pequenas pontuações cloróticas (TCTP11) ou nenhum sintoma (TCTP26) (Figura 15).

A avaliação da expressão de *TCTP* nos tempos 0 hpi, 72 hpi e 14 dpi foi realizada por qRT-PCT em plantas das linhagens TCTP11 e TCTP26 e em plantas não transformadas, sadias ou inoculadas com o PepYMV (Figura 16). Em plantas não transformadas infectadas pelo PepYMV verificou-se, a 72 hpi, um aumento da expressão de *TCTP* de aproximadamente 40% em relação às plantas inoculadas apenas com tampão (Figura 16B). Essa indução foi reduzida pela metade aos 14 dpi (Figura 16C). Nas linhagens transgênicas verificou-se que o transgene e a cópia endógena permaneceram silenciados ao longo de todo o experimento (Figura 16).

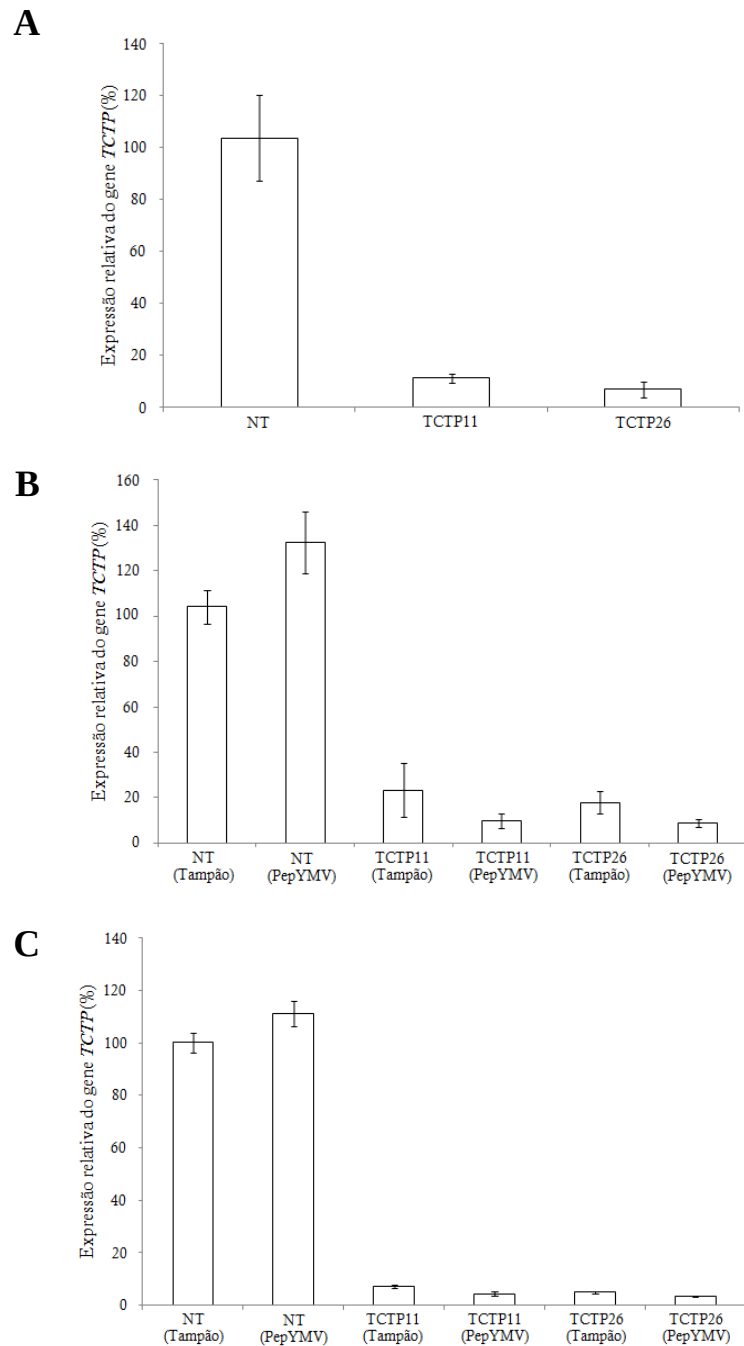
Foi observado que o padrão de expressão do gene *TCTP* nas linhagens transgênicas (silenciadas) infectadas pelo PepYMV diferiu do padrão usualmente exibido pelas plantas não transformadas infectadas (Figura 16B e C). Em plantas não transformadas infectadas há uma indução do gene *TCTP*, porém o inverso é observado quando plantas silenciadas são infectadas pelo PepYMV, havendo uma redução da expressão desse gene.

A carga viral em plantas das linhagens transgênicas TCTP11 e TCTP26 foi analisada por qRT-PCR. Verificou-se uma redução significativa na carga viral aos 72 hpi em plantas infectadas (Figura 17A). Essa redução foi ainda mais drástica aos 14 dpi (Figura 17B).

Observou-se uma correlação positiva entre a intensidade de silenciamento do gene *TCTP*, a redução na carga viral e os sintomas induzidos pelo vírus. Assim, a redução da carga viral em ambos os tempos analisados foi menor em plantas da linhagem TCTP11 (silenciamento em menor nível, sintomas leves de infecção viral) em comparação a plantas da linhagem TCTP26 (silenciamento em maior nível, sem sintomas de infecção viral).

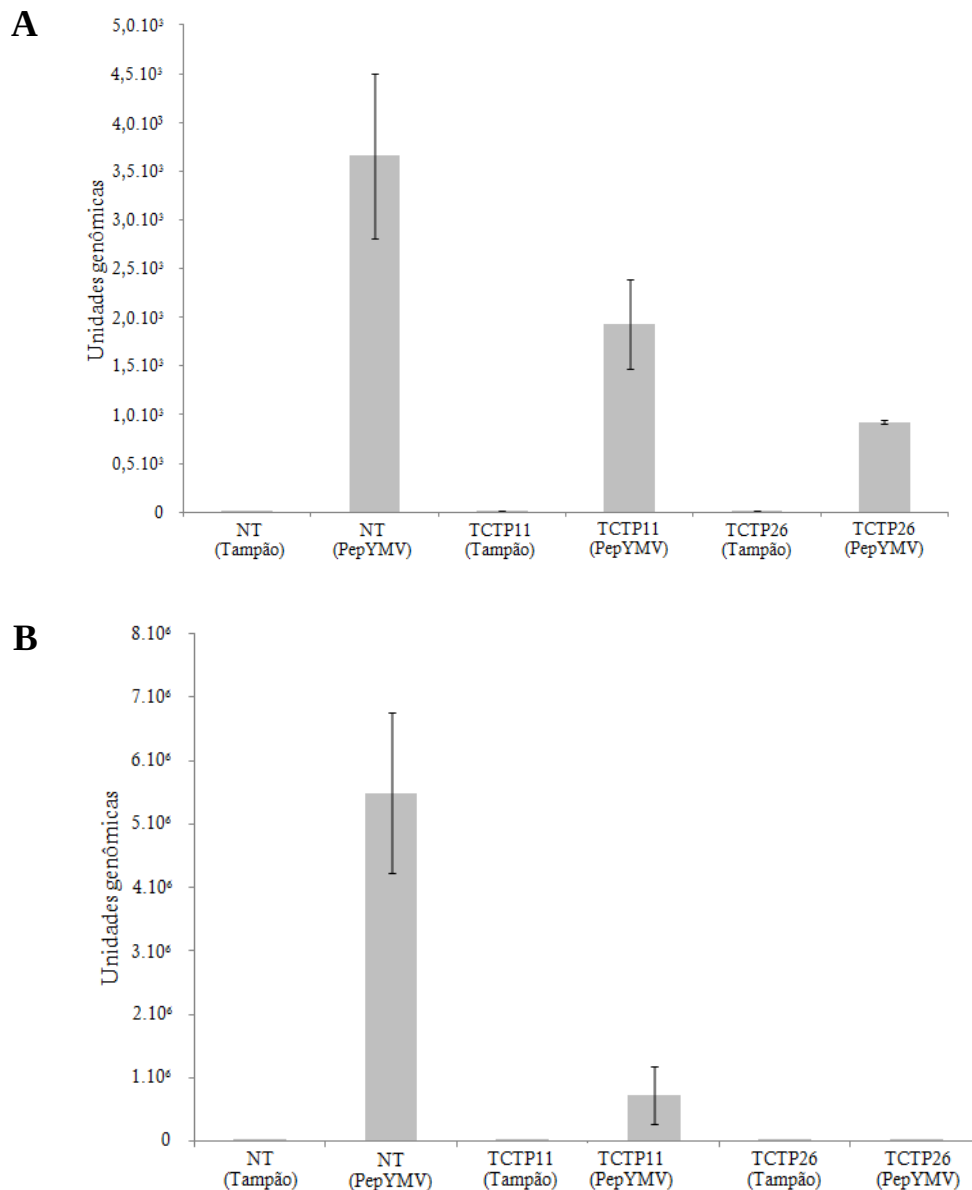


**Figura 15.** Sintomas da infecção pelo PepYMV em linhagens transgênicas silenciadas para o gene *TCTP* (*TCTP<sup>n</sup>*; NT1, planta não transformada), aos 14 dias após a inoculação. **A.** Planta inoculada com o PepYMV. **B.** Planta inoculada apenas com solução tampão.



**Figura 16.** Expressão relativa normalizada do gene *TCTP* em plantas não transformadas e nas linhagens transgênicas TCTP11 e TCTP26, sadias (inoculadas apenas com solução tampão) ou inoculadas com o PepYMV. **A.** 0 horas (imediatamente antes da inoculação). **B.** 72 hpi. **C.** 14 dpi. **NT (Tampão)**, média da expressão relativa de três plantas não transformadas inoculadas apenas com solução tampão; **NT (PepYMV)**, média da expressão relativa de três plantas não transformadas inoculadas com o PepYMV; **TCTP11/26 (Tampão)**, média da expressão relativa de três plantas de cada linhagem transgênica inoculadas apenas com solução tampão; **TCTP11/26 (PepYMV)**,

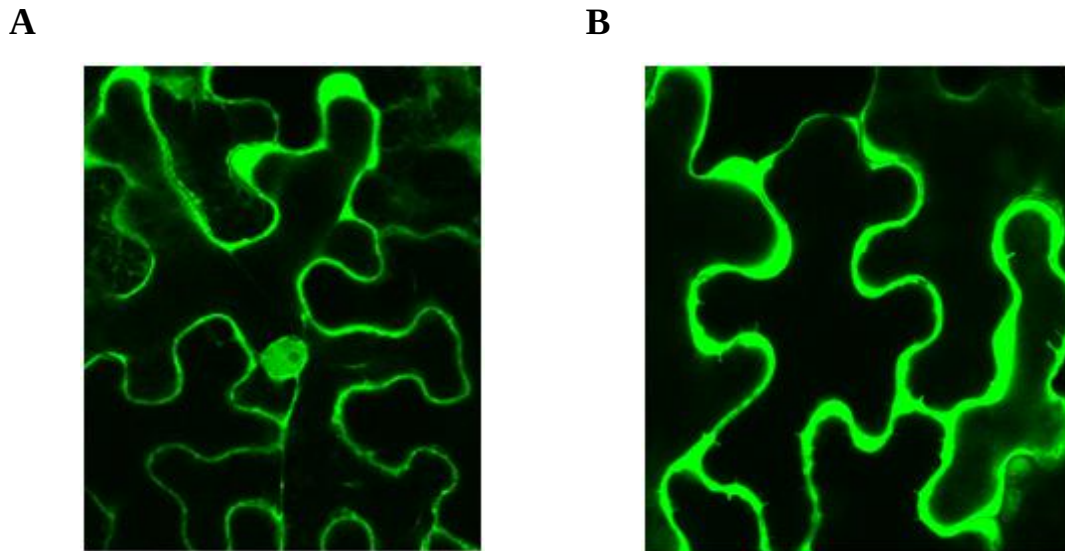
média da expressão relativa de três plantas de cada linhagem transgênica inoculadas com o PepYMV.



**Figura 17.** Quantificação da carga viral do PepYMV em plantas não transformadas e nas linhagens transgênicas TCTP11 e TCTP26, sadias (inoculadas apenas com solução tampão) ou inoculadas com o PepYMV. **A.** 72 hpi; **B.** 14 dpi. **NT (Tampão)**, média da carga viral de três plantas não transformadas inoculadas apenas com solução tampão; **NT (PepYMV)**, média da carga viral de três plantas não transformadas inoculadas com o PepYMV; **TCTP11/26 (Tampão)**, média da carga viral de três plantas de cada linhagem transgênica inoculadas apenas com solução tampão; **TCTP11/26 (PepYMV)**, média da carga viral de três plantas de cada linhagem transgênica inoculadas com o PepYMV.

#### 4.6. Localização subcelular da proteína TCTP durante a infecção de *N. benthamiana* pelo PepYMV

A localização subcelular da proteína TCTP em *N. benthamiana* no contexto da infecção viral pelo PepYMV foi analisada por microscopia confocal, utilizando-se uma fusão de TCTP com GFP. Observou-se que em plantas saudias a proteína apresenta localização citoplasmática e nuclear (Figura 18A). Em plantas infectadas a proteína é redirecionada por completo para o citosol (Figura 18B).



**Figura 18.** Localização subcelular da proteína TCTP fusionada com GFP em células de *N. benthamiana* saudias e infectadas pelo PepYMV. **A.** Célula sadia de *N. benthamiana* agroinfiltrada com a construção pK7WGF2-TCTP. **B.** Célula de *N. benthamiana* infectada pelo PepYMV (14 dpi) agroinfiltrada com a mesma construção.

## 5. DISCUSSÃO

A caracterização da proteína DnaJ de tomateiro permitiu agrupá-la dentre os membros típicos da subfamília de proteínas com domínio J, que compõem a família de co-chaperonas HSP40. Esses resultados permitem inferir que a proteína de tomateiro deve possuir funções celulares relacionadas às já descritas para os homólogos de outras espécies de plantas, tanto em condições normais como adversas (por exemplo, durante a infecção por patógenos) (Zylicz *et al.*, 1989; Kelley, 1998; Shimizu *et al.*, 2009). Assim, postula-se que essa DnaJ pode atuar em conjunto com chaperonas da classe HSP70 otimizando o desempenho de funções celulares do hospedeiro relacionadas a respostas a estresses bióticos e abióticos (Mayer e Bukau, 2005).

A análise da cinética da expressão demonstrou que o gene *DnaJ* é induzido nas plantas infectadas pelo PepYMV. Essa indução ocorreu tanto nas etapas iniciais da infecção (72 hpi) quanto em etapas mais tardias (14 dpi). É possível que a regulação positiva da expressão desse gene seja parte da resposta ao estresse celular ocasionado pela infecção viral. Por outro lado, chaperonas e co-chaperonas são fatores do hospedeiro recrutados por muitos vírus (Saito e Uchida, 1977; Glover e Lindquist, 1998; Hofius *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2009), que necessitam ultrapassar as barreiras impostas pelas respostas de defesa das plantas frente as infecções. Considerando a atuação já descrita dessa subfamília de proteínas em variados processos biológicos, inclusive em patossistemas, considera-se mais provável que a DnaJ seja "sequestrada" pelo PepYMV como um fator acessório à infecção. Portanto, os demais experimentos foram desenhados com o objetivo de verificar se plantas silenciadas para esse gene comportam-se como resistentes ao vírus.

O silenciamento do gene *DnaJ* em plantas de *N. benthamiana* levou ao surgimento de anormalidades fenotípicas, assim como foi observado em plantas de *N. benthamiana* silenciadas para HSP70 e HSP90 (Kanzaki *et al.*, 2003). Proteínas DnaJ podem desempenhar funções como chaperonas independentes, e as alterações observadas podem estar vinculadas à descompensação dessas funções. Alternativamente, o silenciamento pode ter afetado indiretamente a estabilidade funcional de uma HSP70 que porventura interage com a proteína DnaJ. De qualquer forma, o mais interessante é que o fenótipo observado foi semelhante aos sintomas

observados em plantas infectadas pelo PepYMV. Isso sugere que, apesar da indução da expressão do gene *DnaJ* durante a infecção viral, o sequestro da proteína pelo vírus pode impedir que esta atue normalmente em suas funções celulares, e isso seria a causa, pelo menos durante os estágios iniciais da infecção, dos sintomas induzidos pelo vírus.

Analisando o efeito do silenciamento do gene *DnaJ* na infecção pelo PepYMV, constatou-se seu envolvimento nas etapas iniciais da doença, atuando aparentemente como um potencializador para o estabelecimento da infecção. A base para essa proposição é a observada redução do acúmulo viral em plantas silenciadas apenas no tempo 72 hpi. Aos 14 dpi, o acúmulo do vírus é equivalente tanto em plantas silenciadas quanto não silenciadas. Além disso, algumas funções durante a infecção por vírus já foram atribuídas à atividade de proteínas HSP70, DnaJ, ou da interação entre elas (Tomita *et al.*, 2003; Hofius *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2009). Portanto, é razoável supor que na interação entre o PepYMV e *N. benthamiana* a proteína DnaJ, individualmente ou na forma de um complexo HSP70-DnaJ, regule positivamente o ciclo de infecção viral.

A participação de proteínas DnaJ e HSP70 no movimento célula-a-célula já foi relatada para diferentes vírus (Hofius *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2009; Mathioudakis *et al.*, 2012), sabendo-se inclusive que alguns vírus codificam homólogos dessas proteínas que atuam no movimento (Avisar *et al.*, 2008a). Nesse contexto, a proteína DnaJ poderia ser um adaptador entre alguma proteína viral e a HSP70 para otimizar as funções do fator do hospedeiro requerido pelo vírus, que nesse caso seria, na realidade, a HSP70. A função da DnaJ no patossistema estudado, portanto, poderia ser como um fator acessório no movimento célula-a-célula do vírus. Em plantas silenciadas para o gene *DnaJ* a infecção pode ter sido inicialmente retardada devido ao movimento menos eficiente do vírus na ausência da DnaJ. O movimento célula-a-célula mais lento pode ter influenciado negativamente a carga viral do PepYMV nas folhas inoculadas às 72 hpi. Já aos 14 dpi, mesmo com o movimento mais lento, o PepYMV conseguiria atingir um nível de acúmulo em folhas não inoculadas (com infecção sistêmica) similar ao observado em plantas não silenciadas. O silenciamento do gene *DnaJ* aparentemente não afetou o acúmulo viral aos 14 dpi, porém é importante ressaltar que houve uma indução da expressão desse gene mesmo em plantas silenciadas pós-infecção viral. Esse incremento da DnaJ nessas plantas pode ter sido suficiente para essa proteína desempenhar sua função na infecção, portanto não

é possível concluir se a DnaJ é necessária para o ciclo viral em infecções já estabelecidas (14 dpi).

Outra possibilidade seria a atuação direta da DnaJ na replicação do PepYMV, como já foi descrito em diversos patossistemas envolvendo vírus que infectam plantas e animais (revisado por Knox *et al.*, 2011). Especificamente no caso de vírus de plantas, a interação entre DnaJ e a RdRp viral foi relatada em levedura (*S. cerevisiae*) infectada pelo *Brome mosaic virus* (BMV) (Tomita *et al.*, 2003). A atuação também poderia ser indireta, aumentando a atividade de alguma chaperona HSP70 que possivelmente esteja ligada a replicação do PepYMV. Em plantas, HSP70 foi descrita interagindo com a RdRp viral em *A. thaliana* infectada pelo TuMV (Dufresne *et al.*, 2008). Dessa forma duas hipóteses podem ser propostas para explicar o possível papel da DnaJ na replicação viral. Primeiro, um papel direto da DnaJ na montagem ou organização dos complexos de replicação. Esses complexos frequentemente encontram-se associados a membranas (Hsu *et al.*, 2010; Jouvenet e Simon, 2010). Sabe-se que algumas proteínas com domínio J em plantas localizam-se constitutivamente no RE, desempenhando funções como translocação e enovelamento de outras proteínas (Yamamoto *et al.*, 2008). Portanto, durante a infecção pelo PepYMV, é razoável supor que elas sejam candidatas para auxiliar na manutenção da replicação. Um segundo argumento seria o papel indireto na replicação do PepYMV por meio da otimização da atividade de alguma HSP70 que porventura estabeleça interação com a alguma(s) proteína(s) do vírus.

O segundo fator do hospedeiro com possível papel na infecção do tomateiro pelo PepYMV estudado neste trabalho foi a proteína TCTP. A hipótese de trabalho, novamente, foi de que a proteína TCTP seria recrutada pelo vírus para auxiliar em algum ponto do ciclo de infecção. Considerando-se o papel essencial que TCTP desempenha na planta e consequentemente o fenótipo letal de mutantes para esse gene, a ideia inicial era superexpressar o gene e verificar se isso levaria a um aumento da suscetibilidade das plantas à infecção viral. Para isso, plantas de tomateiro foram transformadas com uma construção que deveria levar à produção de grande quantidade de proteína.

O número de plantas regeneradas, porém não transformadas (escapes), foi superior ao esperado, que gira em torno de 10% (Frary e Earle, 1996). Atribui-se esse fato à utilização da canamicina como agente de seleção, considerado um agente seletivo

menos rigoroso que a higromicina (Padilla e Burgos, 2010). Além disso, 50% das linhagens regeneradas e efetivamente transformadas encontravam-se em estado de poliploidia. A obtenção de plantas poliplóides nos eventos de transformação é comum, demonstrando uma forte ligação com a fonte de explante que é utilizada para o processo (hipocótilo ou folha) (Van *et al.*, 2010). Infelizmente em plantas regeneradas a partir de hipocótilos tem sido mencionada uma elevada ocorrência de duplicação cromossômica (Sigareva *et al.*, 2004), porém esse tipo de explante é descrito como o que apresenta maior capacidade de regeneração (Park *et al.*, 2003) em comparação a folhas em protocolos de transformação de tomateiro mediada por *A. tumefaciens*.

Surpreendentemente, as plantas transgênicas obtidas com a construção que deveria induzir a superexpressão da proteína TCTP apresentaram-se silenciadas, provavelmente devido a natureza estrutural do mRNA codificado pelo gene *TCTP*, que apresenta uma forte estrutura secundária (Bommer *et al.*, 2002). Essa característica do mRNA somada a sua superexpressão pode ter ativado a maquinaria de silenciamento da célula. Conforme seria de se esperar, com base no importante papel que a proteína TCTP desempenha em processos celulares como apoptose e ciclo celular, linhagens fortemente silenciadas, como TCTP11 e TCTP26, apresentaram alterações fenotípicas como desenvolvimento mais lento, tamanho reduzido e necrose de sementes (Berkowitz *et al.*, 2008). Outras linhagens nas quais o silenciamento ocorreu em menor grau mostraram-se fenotipicamente normais, provavelmente porque a quantidade de proteína produzida ainda foi suficiente para permitir que suas funções fossem realizadas de forma satisfatória.

A proteína TCTP, assim como a DnaJ, também é induzida a 72 hpi e aos 14 dpi, porém diferentemente da co-chaperona foi possível concluir que TCTP parece desempenhar um papel importante também em etapas mais tardias (14 dpi), quando teoricamente a infecção viral já estaria estabelecida. A análise de plantas transgênicas silenciadas (linhagens TCTP11 e TCTP26) inoculadas com o PepYMV indicou baixíssimo acúmulo viral aos 14 dpi (linhagem TCTP11), ou mesmo a não detecção do acúmulo viral (linhagem TCTP26). O acúmulo viral nas folhas 72 hpi (folha inoculada) maior comparado às folhas 14 dpi (folhas infectadas sistemicamente) pode estar vinculado à detecção adicional de inóculo remanescente na folha. Mesmo assim parece sugestivo considerar que TCTP pode desempenhar alguma função na replicação do PepYMV e consequentemente no movimento viral.

Assim, TCTP parece ser um verdadeiro fator de suscetibilidade do tomateiro ao PepYMV, pois a ausência dessa proteína praticamente impediu a infecção viral. Foi observado que em plantas silenciadas para o gene *TCTP* ocorre uma redução adicional da expressão desse gene quando essas plantas são desafiadas pelo PepYMV, contrariamente ao padrão usual de expressão. Esse comportamento inesperado das linhagens transgênicas infectadas pelo PepYMV provavelmente deve estar vinculado ao efeito indireto do silenciamento de *TCTP*, que pode ter desregulado alguns processos celulares e/ou rotas metabólicas onde essa proteína atuaria, dada sua natureza multifuncional (Foster *et al.*, 2002; Cans *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2005; Berkowitz *et al.*, 2008). É proposto então que essa perturbação ampla gerada no ambiente celular foi responsável pela inversão do padrão de expressão desse gene durante a infecção.

Em animais é conhecido que TCTP pode estar associada à resposta de defesa antiviral mediada por dsRNA, por meio da ativação de uma proteína cinase dependente de dsRNA (PKR) (Bommer *et al.*, 2002; Schneider e Mohr, 2003; Valchanova *et al.*, 2006). Em plantas, uma defesa eficiente contra a infecção viral também mediada por dsRNA consiste no silenciamento gênico, porém os vírus desenvolveram proteínas com potencial para suprimir esse mecanismo (Meraí *et al.*, 2006).

Proteínas do hospedeiro frequentemente são manipuladas por patógenos virais em benefício próprio. Um exemplo marcante dessa modulação acontece com a proteína RAV2 de *N. tabacum* durante a infecção pelo potyvírus TEV (Endres *et al.*, 2010). Esse fator de transcrição está envolvido na indução de genes relacionados a respostas a estresses bióticos e abióticos, e faz parte da via de defesa mediada por etileno. A proteína HC-Pro dos potyvírus aparentemente subverte esse fator de transcrição para induzir a expressão de genes associados com a resposta mediada por etileno, o que interfere com a via de silenciamento relacionada com a defesa antiviral (a via dos siRNAs) sem interferir com vias não relacionadas (p.ex., a via dos miRNAs) (Taliensky *et al.*, 2004).

Assim como RAV2, TCTP também é induzida pelo hormônio etileno e é responsiva a diversos estresses (Gepstein *et al.*, 2003; Tonganunt *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2009). É possível que a indução de TCTP durante a infecção pelo PepYMV atue negativamente de forma direta/indireta para o hospedeiro. No ambiente celular a disponibilidade de TCTP durante a infecção, conduziria à sua integração no processo

infeccioso, quer desestabilizando respostas de defesa do hospedeiro, quer participando do ciclo biológico do patógeno (movimento, replicação, etc).

Uma segunda hipótese para explicar o papel de TCTP na infecção pelo PepYMV, considerando sua capacidade de interagir com proteínas que se ligam a dsRNA, em animais, e de translocar proteínas floemáticas em *Cucurbita maxima*, seria sua atuação no movimento viral, provavelmente através de uma interação indireta com fatores do hospedeiro que apresentem capacidade de ligação ao genoma viral de RNA (Aoki *et al.*, 2005). Além disso, a saída seletiva de macromoléculas dos elementos de tubo crivado já foi relatada para RNA (Foster *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002) e para proteínas de movimento viral (Itaya *et al.*, 2002).

TCTP foi redirecionada para o citosol em células de *N. benthamiana* durante a infecção pelo PepYMV, sugerindo que nesse evento a proteína é estimulada a cumprir funções em compartimentos celulares ainda não identificados fora do núcleo. Unindo as hipóteses já apresentadas anteriormente sobre o seu suposto papel no movimento do PepYMV (Foster *et al.*, 2002; Itaya *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2005), pode-se sugerir que TCTP pode estar localizada em estruturas citosólicas também vinculadas ao transporte de macromoléculas, como é o caso do citoesqueleto. Já foi demonstrado que TCTP possui função na estabilização de microtúbulos (Yarm, 2002), e não seria destoante considerar que durante o movimento viral poderia atuar como complemento viral facilitando a translocação.

As diversas especulações para integrar a proteína TCTP no contexto da infecção pelo PepYMV sugerem diversos caminhos para experimentos futuros que possam levar à elucidação do papel específico dessa proteína na doença, na qual a suscetibilidade mostrou ser TCTP-dependente.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

As análises realizadas permitiram concluir que as proteínas TCTP e DnaJ de *Solanum lycopersicum* (tomateiro) e *Nicotiana benthamiana*, respectivamente, regulam positivamente o ciclo de infecção do potyvírus PepYMV, demonstrando serem importantes fatores de suscetibilidade. Foi demonstrado que TCTP é requerida tanto nos estágios iniciais quanto tardios da infecção. Já a proteína DnaJ atua nos estágios iniciais (72 hpi), e o seu papel em infecções já estabelecidas (14 dpi) não foi esclarecido. Com base nos resultados aqui apresentados ainda não é possível apresentar um modelo de como esses fatores são subvertidos pelo PepYMV para aumentar a severidade da doença, necessitando-se de experimentos adicionais que esclareçam suas funções nesse patossistema.

## 7. LITERATURA CITADA

- ADAMS, M.J.; ZERBINI, F.M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D.C.; VALKONEN, J.P.T. Family *Potyviridae*. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (Ed.). *Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier Academic Press, 2012. p. 1069-1089.
- AGUDELO-ROMERO, P.; CARBONELL, P.; DE LA IGLESIA, F.; CARRERA, J.; RODRIGO, G.; JARAMILLO, A.; PEREZ-AMADOR, M.A.; ELENA, S.F. Changes in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana* after infection with *Tobacco etch virus*. *Virology Journal*, v. 5, p. 92, 2008a.
- AGUDELO-ROMERO, P.; CARBONELL, P.; PEREZ-AMADOR, M.A.; ELENA, S.F. Virus adaptation by manipulation of host's gene expression. *PLoS One*, v. 3, p. e2397, 2008b.
- ALFENAS-ZERBINI, P.; MAIA, I.G.; FÁVARO, R.D.; CASCARDO, J.C.M.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; ZERBINI, F.M. Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 22, p. 352-361, 2009.
- ALFENAS, P.F. *Identificação de genes potencialmente envolvidos na interação tomateiro - Potyvirus*. Tese D.S. Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 86 p., 2006.
- ALLISON, R.; JOHNSTON, R.E.; DOUGHERTY, W.G. The nucleotide sequence of the coding region of *Tobacco etch virus* genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology*, v. 154, p. 9-20, 1986.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AOKI, K.; SUZUI, N.; FUJIMAKI, S.; DOHMAE, N.; YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; FUJIWARA, T.; HAYASHI, H.; YAMAYA, T.; SAKAKIBARA, H. Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. *Plant Cell*, v. 17, p. 1801-1814, 2005.
- APARICIO, F.; THOMAS, C.L.; LEDERER, C.; NIU, Y.; WANG, D.; MAULE, A.J. Virus induction of heat shock protein 70 reflects a general response to protein accumulation in the plant cytosol. *Plant Physiology*, v. 138, p. 529-536, 2005.
- ARANDA, M.A.; ESCALER, M.; WANG, D.; MAULE, A.J. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 93, p. 15289-15293, 1996.
- AROGUNDADE, O.; BALOGUN, O.S.; KAREEM, K.T. Occurrence and distribution of *Pepper veinal mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* in pepper in Ibadan, Nigeria. *Virology Journal*, v. 9, p. 79, 2012.

- AVISAR, D.; PROKHNEVSKY, A.I.; DOLJA, V.V. Class VIII myosins are required for plasmodesmatal localization of a closterovirus Hsp70 homolog. *Journal of Virology*, v. 82, p. 2836-2843, 2008a.
- AVISAR, D.; PROKHNEVSKY, A.I.; MAKAROVA, K.S.; KOONIN, E.V.; DOLJA, V.V. Myosin XI-K is required for rapid trafficking of Golgi stacks, peroxisomes, and mitochondria in leaf cells of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology*, v. 146, p. 1098-1108, 2008b.
- BABU, M.; GAGARINOVA, A.G.; BRANDLE, J.E.; WANG, A. Association of the transcriptional response of soybean plants with *Soybean mosaic virus* systemic infection. *Journal of General Virology*, v. 89, p. 1069-1080, 2008.
- BAEBLER, S.; KRECIC-STRES, H.; ROTTER, A.; KOGOVSEK, P.; CANKAR, K.; KOK, E.J.; GRUDEN, K.; KOVAC, M.; ZEL, J.; POMPE-NOVAK, M.; RAVNIKAR, M. PVY(NTN) elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular Plant Pathology*, v. 10, p. 263-275, 2009.
- BAEBLER, S.; STARE, K.; KOVAC, M.; BLEJEC, A.; PREZELJ, N.; STARE, T.; KOGOVSEK, P.; POMPE-NOVAK, M.; ROSAHL, S.; RAVNIKAR, M.; GRUDEN, K. Dynamics of responses in compatible potato-*Potato virus Y* interaction are modulated by salicylic acid. *PLoS One*, v. 6, p. e29009, 2011.
- BEERE, H.M.; GREEN, D.R. Stress management - Heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, v. 11, p. 6-10, 2001.
- BERKOWITZ, O.; JOST, R.; POLLMANN, S.; MASLE, J. Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, v. 20, p. 3430-3447, 2008.
- BERRUTI, G.; PEREGO, L.; BORGONOVO, B.; MARTEGANI, E. MSJ-1, a new member of the DNAJ family of proteins, is a male germ cell-specific gene product. *Experimental Cell Research*, v. 239, p. 430-441, 1998.
- BOCK, K.R.; CONTI, M. *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, v. 134, 1974.
- BOMMER, U.A.; BOROVJAGIN, A.V.; GREAGG, M.A.; JEFFREY, I.W.; RUSSELL, P.; LAING, K.G.; LEE, M.; CLEMENS, M.J. The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *RNA*, v. 8, p. 478-496, 2002.
- BOMMER, U.A.; THIELE, B.J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, p. 379-385, 2004.
- BORK, P.; SANDER, C.; VALENCIA, A.; BUKAU, B. A module of the DnaJ heat shock proteins found in malaria parasites. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 17, p. 129, 1992.
- BRASILEIRO, A.C.M. Neomicina fosfotransferase II (*nptII*). In: BRASILERO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 1998. p. 143-154.
- BRIOUDES, F.; THIERRY, A.M.; CHAMBRIER, P.; MOLLEREAU, B.; BENDAHDANE, M. Translationally controlled tumor protein is a conserved

- mitotic growth integrator in animals and plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, v. 107, p. 16384-16389, 2010.
- BRUCKNER, F.P. *Silenciamento gênico induzido por vírus dos genes TCTP, SNF1 e Suba: análise por RT-PCR quantitativo e efeito na infecção de N. benthamina pelo PepYMV*. Monografia de graduação. Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2010.
- CANS, C.; PASSER, B.J.; SHALAK, V.; NANCY-PORTEBOIS, V.; CRIBLE, V.; AMZALLAG, N.; ALLANIC, D.; TUFINO, R.; ARGENTINI, M.; MORAS, D.; FIUCCI, G.; GOUD, B.; MIRANDE, M.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, v. 100, p. 13892-13897, 2003.
- CARRINGTON, J.C.; FREED, D.D.; OH, C.-S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. EMBO Journal, v. 9, p. 1347-1353, 1990.
- CARVALHO, C.M.; FONTENELLE, M.R.; FLORENTINO, L.H.; SANTOS, A.A.; ZERBINI, F.M.; FONTES, E.P.B. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. Plant Journal, v. 55, p. 869-880, 2008.
- CASCARDO, R.S. *Estudo do envolvimento das proteínas Sl-Gal83 e TCTP na infecção da hospedeiros suscetíveis pelo potyvírus Pepper yellow mosaic virus (PepYMV)*. Dissertação MS (Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2011.
- CHEETHAM, M.E.; BRION, J.P.; ANDERTON, B.H. Human homologues of the bacterial heat-shock protein DnaJ are preferentially expressed in neurons. Biochemistry Journal, v. 284, p. 469-476, 1992.
- CHEN, M.H.; TIAN, G.W.; GAFNI, Y.; CITOVSKY, V. Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. Plant Physiology, v. 138, p. 1866-1876, 2005.
- CHEN, Z.R.; ZHOU, T.; WU, X.H.; HONG, Y.G.; FAN, Z.F.; LI, H.F. Influence of cytoplasmic heat shock protein 70 on viral infection of *Nicotiana benthamiana*. Molecular Plant Pathology, v. 9, p. 809-817, 2008.
- CHENG, Y.Q.; LIU, Z.M.; XU, J.; ZHOU, T.; WANG, M.; CHEN, Y.T.; LI, H.F.; FAN, Z.F. HC-Pro protein of *Sugar cane mosaic virus* interacts specifically with maize ferredoxin-5 in vitro and in planta. Journal of General Virology, v. 89, p. 2046-2054, 2008.
- CHILD, S.J.; HAKKI, M.; DE NIRO, K.L.; GEBALLE, A.P. Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. Journal of Virology, v. 78, p. 197-205, 2004.
- CHILD, S.J.; HANSON, L.K.; BROWN, C.E.; JANZEN, D.M.; GEBALLE, A.P. Double-stranded RNA binding by a heterodimeric complex of murine cytomegalovirus m142 and m143 proteins. Journal of Virology, v. 80, p. 10173-10180, 2006.
- CHITPATIMA, S.T.; MAKRIDES, S.; BANDYOPADHYAY, R.; BRAWERMAN, G. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide

- that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Research*, v. 16, p. 2350, 1988.
- CHUNG, B.Y.W.; MILLER, W.A.; ATKINS, J.F.; FIRTH, A.E. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 105, p. 5897-5902, 2008.
- CUNHA, L.C.V.; RESENDE, R.O.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A.K. Distinct features of *Pepper yellow mosaic virus* isolates from tomato and sweetpepper. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 663-667, 2004.
- DAROS, J.A.; CARRINGTON, J.C. RNA binding activity of Nla proteinase of tobacco etch potyvirus. *Virology*, v. 237, p. 327-336, 1997.
- DECAPRIO, J.A. The role of the J domain of SV40 large T in cellular transformation. *Biologicals*, v. 27, p. 23-28, 1999.
- DIANESE, E.C.; RESENDE, R.O.; INOUE-NAGATA, A.K. High incidence of *Pepper yellow mosaic virus* in tomatoes in productive areas of Brazil's Federal District. *Tropical Plant Pathology*, v. 33, p. 67-68, 2008.
- DIPIERO, R.M.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; PASCHOLATI, S.F.; DELFINO, M.A. Transmissão do *Passionfruit woodiness virus* por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. *Neotropical Entomology*, v. 35, p. 139-140, 2006.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, v. 95, p. 99-110, 2005.
- DOLJA, V.V.; HALDEMAN CAHILL, R.; MONTGOMERY, A.E.; VANDENBOSCH, K.A.; CARRINGTON, J.C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology*, v. 206, p. 1007-1016, 1995.
- DOLJA, V.V.; HALDEMAN, R.; ROBERTSON, N.L.; DOUGHERTY, W.G.; CARRINGTON, J.C. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of *Tobacco etch potyvirus* in plants. *EMBO Journal*, v. 13, p. 1482-1491, 1994.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11-15, 1987.
- DUFRESNE, P.J.; THIVIERGE, K.; COTTON, S.; BEAUCHEMIN, C.; IDE, C.; UBALIJORO, E.; LALIBERTE, J.F.; FORTIN, M.G. Heat shock 70 protein interaction with *Turnip mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology*, v. 374, p. 217-227, 2008a.
- DUFRESNE, P.J.; UBALIJORO, E.; FORTIN, M.G.; LALIBERTE, J.F. *Arabidopsis thaliana* class II poly(A)-binding proteins are required for efficient multiplication of *Turnip mosaic virus*. *Journal of General Virology*, v. 89, p. 2339-2348, 2008b.
- ENDRES, M.W.; GREGORY, B.D.; GAO, Z.; FOREMAN, A.W.; MLOTSHWA, S.; GE, X.; PRUSS, G.J.; ECKER, J.R.; BOWMAN, L.H.; VANCE, V. Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathogens*, v. 6, p. e1000729, 2010.

- ESKELIN, K.; HAFREN, A.; RANTALAINEN, K.I.; MAKINEN, K. Potyviral VPg enhances viral RNA translation and inhibits reporter mRNA translation in plant. *Journal of Virology*, v. 85, p. 9210-9221, 2011.
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANIHOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 1259 p. 2005.
- FOSTER, T.M.; LOUGH, T.J.; EMERSON, S.J.; LEE, R.H.; BOWMAN, J.L.; FORSTER, R.L.; LUCAS, W.J. A surveillance system regulates selective entry of RNA into the shoot apex. *Plant Cell*, v. 14, p. 1497-1508., 2002.
- FRARY, A.; EARLE, E.D. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Reports*, v. 16, p. 235-240, 1996.
- GEPSTEIN, S.; SABEHI, G.; CARP, M.J.; HAJOUJ, T.; NESHER, M.F.; YARIV, I.; DOR, C.; BASSANI, M. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant Journal*, v. 36, p. 629-642, 2003.
- GLOVER, J.R.; LINDQUIST, S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, v. 94, p. 73-82, 1998.
- GNANASEKAR, M.; DAKSHINAMOORTHY, G.; RAMASWAMY, K. Translationally controlled tumor protein is a novel heat shock protein with chaperone-like activity. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*, v. 386, p. 333-337, 2009.
- GNANASEKAR, M.; RAMASWAMY, K. Translationally controlled tumor protein of *Brugia malayi* functions as an antioxidant protein. *Parasitology Research*, v. 101, p. 1533-1540, 2007.
- GUEVARA-MORATO, M.A.; DE LACOBIA, M.G.; GARCIA-LUQUE, I.; SERRA, M.T. Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L3 plants with dual RNase and DNase activities. *Journal of Experimental Botany*, v. 61, p. 3259-3271, 2010.
- HAFREN, A.; HOFIUS, D.; RONNHOLM, G.; SONNEWALD, U.; MAKINEN, K. HSP70 and its cochaperone CIP promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions. *Plant Cell*, v. 22, p. 523-535, 2010.
- HARTL, F.U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, v. 295, p. 1852-1858, 2002.
- HARVEY, J.J.; LEWSEY, M.G.; PATEL, K.; WESTWOOD, J.; HEIMSTADT, S.; CARR, J.P.; BAULCOMBE, D.C. An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One*, v. 6, p. e14639, 2011.
- HEINLEIN, M.; EPEL, B.L.; PADGETT, H.S.; BEACHY, R.N. Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science*, v. 270, p. 1983-1985, 1995.
- HELMBRECHT, K.; RENSING, L. Different constitutive heat shock protein 70 expression during proliferation and differentiation of rat C6 glioma cells. *Neurochemical Research*, v. 24, p. 1293-1299, 1999.

- HOFIUS, D.; MAIER, A.T.; DIETRICH, C.; JUNGKUNZ, I.; BORNKE, F.; MAISS, E.; SONNEWALD, U. Capsid protein-mediated recruitment of host DnaJ-like proteins is required for *Potato virus Y* infection in tobacco plants. *Journal of Virology*, v. 81, p. 11870-11880, 2007.
- HSU, N.Y.; ILNYTSKA, O.; BELOV, G.; SANTIANA, M.; CHEN, Y.H.; TAKVORIAN, P.M.; PAU, C.; VAN DER SCHAAR, H.; KAUSHIK-BASU, N.; BALLA, T.; CAMERON, C.E.; EHRENFELD, E.; VAN KUPPEVELD, F.J.M.; ALTAN-BONNET, N. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell*, v. 141, p. 799-811, 2010.
- HUANG, T.-S.; WEI, T.; LALIBERTÉ, J.F.; WANG, A. A host RNA helicase-like protein, AtRH8, interacts with the potyviral genome-linked protein, VPg, associates with the virus accumulation complex, and is essential for infection. *Plant Physiology*, v. 152, p. 255-266, 2010.
- HULL, R. *Matthew's Plant Virology*. 4a ed. Londres, Inglaterra: Academic Press, 2002.
- INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; MONTE, D.C.; DUSI, A.N.; ÁVILA, A.C.; VAN DER VLUGT, R.A.A. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. *Archives of Virology*, v. 147, p. 849-855, 2002.
- ITAYA, A.; MA, F.S.; QI, Y.J.; MATSUDA, Y.; ZHU, Y.L.; LIANG, G.Q.; DING, B. Plasmodesma-mediated selective protein traffic between "symplasmically isolated" cells probed by a viral movement protein. *Plant Cell*, v. 14, p. 2071-2083, 2002.
- JIN, H.; ZHU, J.K. A viral suppressor protein inhibits host RNA silencing by hooking up with Argonautes. *Genes & Development*, v. 24, p. 853-856, 2010.
- JOUVENET, N.; SIMON, S.M. Viral houseguests undertake interior redesign. *Cell*, v. 141, p. 754-756, 2010.
- JOVEL, J.; WALKER, M.; SANFACON, H. Salicylic acid-dependent restriction of *Tomato ringspot virus* spread in tobacco is accompanied by a hypersensitive response, local RNA silencing, and moderate systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 24, p. 706-718, 2011.
- JUHASZ, A.C.P.; DA SILVA, D.J.H.; ZERBINI, F.M.; CARNEIRO, P.C.S.; SOARES, B.O.; CRUZ, C.D. Resistance genetic basis of a wild tomato access to *Pepper yellow mosaic virus*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 43, p. 713-720, 2008.
- KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology*, v.11, n.8, Aug, p.579-92. 2010.
- KANZAKI, H.; SAITOH, H.; ITO, A.; FUJISAWA, S.; KAMOUN, S.; KATOU, S.; YOSHIOKA, H.; TERAUCHI, R. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology*, v.4, n.5, Sep 1, p.383-91. 2003.
- KASSCHAU, K.D.; CRONIN, S.; CARRINGTON, J.C. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of *Tobacco etch potyvirus* helper component-proteinase. *Virology*, v. 228, p. 251-262, 1997.

- KASSCHAU, K.D.; XIE, Z.; ALLEN, E.; LLAVE, C.; CHAPMAN, E.J.; KRIZAN, K.A.; CARRINGTON, J.C. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell*, v. 4, p. 205-217, 2003.
- KAZINCZI, G.; KOVACS, J.; TAKACS, A.P.; HORVATH, J.; GABORJANYI, R. Susceptibility of *Capsicum* breeding lines to NTN strain of *Potato virus Y* (PVY(NTN)) and *Obuda pepper virus* (ObPV). *Communications in Agricultural Applied Biological Sciences*, v. 68, p. 555-559, 2003.
- KELLEY, W.L. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 23, p. 222-227, 1998.
- KHOSHKHATTI, N.; HABIBI KOOHI, M.; MOSAHEBI, G. Occurrence and distribution of *Potato virus Y* strain N (PVY(N)) on celery in Iran. *Communications in Agricultural Applied Biological Sciences*, v. 74, p. 849-852, 2009.
- KLEIN, P.G.; KLEIN, R.R.; RODRÍGUEZ-CEREZO, E.; HUNT, A.G.; SHAW, J.G. Mutational analysis of the *Tobacco vein mottling virus* genome. *Virology*, v. 204, p. 759-769, 1994.
- KNOX, C.; LUKE, G.A.; BLATCH, G.L.; PESCE, E.R. Heat shock protein 40 (Hsp40) plays a key role in the virus life cycle. *Virus Research*, v. 160, p. 15-24, 2011.
- KOMATSU, K.; HASHIMOTO, M.; OZEKI, J.; YAMAJI, Y.; MAEJIMA, K.; SENSU, H.; HIMENO, M.; OKANO, Y.; KAGIWADA, S.; NAMBA, S. Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 23, p. 283-293, 2010.
- KRAGLER, F.; CURIN, M.; TRUTNYEVA, K.; GANSCH, A.; WAIGMANN, E. MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of *Tobacco mosaic virus* movement protein. *Plant Physiology*, v. 132, p. 1870-1883, 2003.
- LAHAYE, X.; VIDY, A.; FOUQUET, B.; BLONDEL, D. Hsp70 protein positively regulates rabies virus infection. *Journal of Virology*, v. 86, p. 4743-4751, 2012.
- LAÍN, S.; MARTIN, M.T.; RIECHMANN, J.L.; GARCÍA, J.A. Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection - nucleic acid-stimulated ATPase activity of the *Plum pox potyvirus* helicase-like protein. *Journal of Virology*, v. 65, p. 1-6, 1991.
- LALIBERTE, J.F.; SANFACON, H. Cellular remodeling during plant virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, v. 48, p. 69-91, 2010.
- LÉONARD, S.; PLANTE, D.; WITTMANN, S.; DAIGNEAULT, N.; FORTIN, M.G.; LALIBERTÉ, J.-F. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*, v. 74, p. 7730-7737, 2000.
- LI, C.; QIU, L.; NING, X.; CHEN, A.; QIN, S.; WU, H.; ZHAO, J. The first molluscan TCTP in *Venerupis philippinarum*: Molecular cloning and expression analysis. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 29, p. 530-533, 2010.
- LIAO, M.; LI, Y.; WANG, Z. Identification of elicitor-responsive proteins in rice leaves by a proteomic approach. *Proteomics*, v. 9, p. 2809-2819, 2009.

- LIN, L.; LUO, Z.; YAN, F.; LU, Y.; ZHENG, H.; CHEN, J. Interaction between potyvirus P3 and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) of host plants. *Virus Genes*, v. 43, p. 90-92, 2011.
- LIU, H.; REAVY, B.; SWANSON, M.; MACFARLANE, S.A. Functional replacement of the *Tobacco rattle virus* cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses. *Virology*, v. 298, p. 232-239., 2002.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LÓPEZ-MOYA, J.J., GARCÍA, J. A. Potyviruses. *Encyclopedia of Virology*: Oxford: Elsevier, 2008.
- LOZANO-DURAN, R.; ROSAS-DIAZ, T.; LUNA, A.P.; BEJARANO, E.R. Identification of host genes involved in geminivirus infection using a reverse genetics approach. *PLoS One*, v. 6, p. e22383, 2011.
- LU, L.M.; DU, Z.G.; QIN, M.L.; WANG, P.; LAN, H.H.; NIU, X.Q.; JIA, D.S.; XIE, L.Y.; LIN, Q.Y.; XIE, L.H.; WU, Z.J. Pc4, a putative movement protein of *Rice stripe virus*, interacts with a type I DnaJ protein and a small Hsp of rice. *Virus Genes*, v. 38, p. 320-327, 2009.
- MAIA, I.G.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *Journal of General Virology*, v. 77, p. 1335-1341, 1996.
- MATHIOUDAKIS, M.M.; VEIGA, R.; GHITA, M.; TSIKOU, D.; MEDINA, V.; CANTO, T.; MAKRIS, A.M.; LIVIERATOS, I.C. *Pepino mosaic virus* capsid protein interacts with a tomato heat shock protein cognate 70. *Virus Research*, v. 163, p. 28-39, 2012.
- MAYER, M.P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, p. 670-684, 2005.
- MCLEAN, B.G.; ZUPAN, J.; ZAMBRYSKI, P.C. *Tobacco mosaic virus* movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell*, v. 7, p. 2101-2114, 1995.
- MERAI, Z.; KERENYI, Z.; KERTESZ, S.; MAGNA, M.; LAKATOS, L.; SILHAVY, D. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology*, v. 80, p. 5747-5756, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NICAISE, V.; GERMAN-RETANA, S.; SANJUAN, R.; DUBRANA, M.P.; MAZIER, M.; MAISONNEUVE, B.; CANDRESSE, T.; CARANTA, C.; LEGALL, O. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. *Plant Physiology*, v. 132, p. 1272-1282, 2003.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. *Science*, v. 163, p. 85-87, 1969.
- PADILLA, I.M.; BURGOS, L. Aminoglycoside antibiotics: Structure, functions and effects on *in vitro* plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports*, v. 29, p. 1203-1213, 2010.

- PADWAD, Y.S.; MISHRA, K.P.; JAIN, M.; CHANDA, S.; GANJU, L. Dengue virus infection activates cellular chaperone Hsp70 in THP-1 cells: downregulation of Hsp70 by siRNA revealed decreased viral replication. *Viral Immunology*, v. 23, p. 557-565, 2010.
- PALLAS, V.; GARCIA, J.A. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology*, v. 92, p. 2691-2705, 2011.
- PARK, S.H.; MORRIS, J.L.; PARK, J.E.; HIRSCHI, K.D.; SMITH, R.H. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *Journal of Plant Physiology*, v. 160, p. 1253-1257, 2003.
- POMPE-NOVAK, M.; GRUDEN, K.; BAEBLER, S.; KRECIC-STRES, H.; KOVAC, M.; JONGSMA, M.; RAVNIKAR, M. *Potato virus Y*-induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 67, p. 237-247, 2006.
- QIN, X.; GAO, F.; ZHANG, J.; GAO, J.; LIN, S.; WANG, Y.; JIANG, L.; LIAO, Y.; WANG, L.; JIA, Y.; TANG, L.; XU, Y.; CHEN, F. Molecular cloning, characterization and expression of cDNA encoding translationally controlled tumor protein (TCTP) from *Jatropha curcas* L. *Molecular Biology Reports*, 2010.
- RAINEY, P.B.; TRAVISANO, M. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature*, v. 394, p. 69-72, 1998.
- RAJAMAKI, M.L.; KELLONIEMI, J.; ALMINAITE, A.; KEKARAINEN, T.; RABENSTEIN, F.; VALKONEN, J.P.T. A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. *Virology*, v. 342, p. 88-101, 2005.
- RAJAMAKI, M.L.; VALKONEN, J.P.T. Detection of a natural point mutation in *Potato virus A* that overcomes resistance to vascular movement in *Nicandra physaloides*, and studies on seed-transmissibility of the mutant virus. *Annals of Applied Biology*, v. 144, p. 77-86, 2004.
- RIECHMANN, J.L.; LAIN, S.; GARCIA, J.A. The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of *Plum pox potyvirus*. *Journal of General Virology*, v. 70, p. 2785-2789, 1989.
- ROBERT, Y.; WOODFORD, J.A.T.; BOURDIN-DUCRAY, D.G. Some epidemiological approaches to the control of aphid-borne virus diseases in seed potato crops in northern Europe. *Virus Research*, v. 71, p. 33-47, 2000.
- ROMERO, A.; BLANCO-URGOITI, B.; SOTO, M.J.; FERERES, A.; PONZ, F. Characterization of typical pepper isolates of PVY reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. *Virus Research*, v. 79, p. 71-80, 2001.
- ROOSSINCK, M.J. Plant virus metagenomics: Biodiversity and ecology. *Annual Review of Genetics*, v.46, p. 357-367, 2012.
- RUFFEL, S.; DUSSAULT, M.H.; PALLOIX, A.; MOURY, B.; BENDAHDANE, A.; ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. A natural recessive resistance gene against *Potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant Journal*, v. 32, p. 1067-1075, 2002.

- RUSSELL, R.; WALI KARZAI, A.; MEHL, A.F.; MCMACKEN, R. DnaJ dramatically stimulates ATP hydrolysis by DnaK: Insight into targeting of Hsp70 proteins to polypeptide substrates. *Biochemistry*, v. 38, p. 4165-4176, 1999.
- RUTLEDGE, R.G.; COTE, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, v. 31, p. e93, 2003.
- SAITO, H.; UCHIDA, H. Initiation of the DNA replication of bacteriophage lambda in *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Biology*, v. 113, p. 1-25, 1977.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3<sup>a</sup> ed.)*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SATYANARAYANA, T.; GOWDA, S.; MAWASSI, M.; ALBIACH-MARTI, M.R.; AYLLON, M.A.; ROBERTSON, C.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O. *Closterovirus* encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology*, v. 278, p. 253-265, 2000.
- SCARIA, V.; HARIHARAN, M.; MAITI, S.; PILLAI, B.; BRAHMACHARI, S.K. Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology*, v. 3, p. 68, 2006.
- SCHAAD, M.C.; JENSEN, P.E.; CARRINGTON, J.C. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: Role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO Journal*, v. 16, p. 4049-4059, 1997.
- SCHNEIDER, R.J.; MOHR, I. Translation initiation and viral tricks. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 28, p. 130-136, 2003.
- SCHULTZ, J.; MILPETZ, F.; BORK, P.; PONTING, C.P. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 95, p. 5857-5864, 1998.
- SENTHIL, G.; LIU, H.; PURAM, V.G.; CLARK, A.; STROMBERG, A.; GOODIN, M.M. Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses. *Journal of General Virology*, v. 86, p. 2615-2625, 2005.
- SHEN, W.; YAN, P.; GAO, L.; PAN, X.; WU, J.; ZHOU, P. Helper component-proteinase (HC-Pro) protein of *Papaya ringspot virus* interacts with papaya calreticulin. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, p. 335-346, 2010.
- SHIMIZU, T.; SATOH, K.; KIKUCHI, S.; OMURA, T. The Repression of Cell Wall- and Plastid-Related Genes and the Induction of Defense-Related Genes in Rice Plants Infected with *Rice dwarf virus*. *Molecular Plant Microbe-Interactions*, v.20, p.247-254. 2007.
- SHIMIZU, T.; YOSHII, A.; SAKURAI, K.; HAMADA, K.; YAMAJI, Y.; SUZUKI, M.; NAMBA, S.; HIBI, T. Identification of a novel tobacco DnaJ-like protein that interacts with the movement protein of *Tobacco mosaic virus*. *Archives of Virology*, v. 154, p. 959-967, 2009.
- SHUKLA, D.D.; FRENKEL, M.J.; WARD, C.W. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 13, p. 178-191, 1991.

- SIGAREVA, M.; SPIVEY, R.; WILLITS, M.G.; KRAMER, C.M.; CHANG, Y.F. An efficient mannose selection protocol for tomato that has no adverse effect on the ploidy level of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, v. 23, p. 236-245, 2004.
- SOELLICK, T.; UHRIG, J.F.; BUCHER, G.L.; KELLMANN, J.W.; SCHREIER, P.H. The movement protein NSm of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 97, p. 2373-2378, 2000.
- SOHN, S.Y.; KIM, S.B.; KIM, J.; AHN, B.Y. Negative regulation of *Hepatitis B virus* replication by cellular Hsp40/DnaJ proteins through destabilization of viral core and X proteins. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 1883-1891, 2006.
- SUNSHINE, M.; FEISS, M.; STUART, J.; YOCHER, J. A new host gene (groPC) necessary for lambda DNA replication. *Molecular and General Genetics*, v. 151, p. 27-34, 1977.
- SUSINI, L.; BESSE, S.; DUFLAUT, D.; LESPAGNOL, A.; BEEKMAN, C.; FIUCCI, G.; ATKINSON, A.R.; BUSO, D.; POUSSIN, P.; MARINE, J.C.; MARTINO, J.C.; CAVARELLI, J.; MORAS, D.; AMSON, R.; TELERMAN, A. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death and Differentiation*, v. 15, p. 1211-1220, 2008.
- TALIANSKY, M.; KIM, S.H.; MAYO, M.A.; KALININA, N.O.; FRASER, G.; MCGEACHY, K.D.; BARKER, H. Escape of a plant virus from amplicon-mediated RNA silencing is associated with biotic or abiotic stress. *Plant Journal*, v. 39, p. 194-205, 2004.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TOMITA, Y.; MIZUNO, T.; DIEZ, J.; NAITO, S.; AHLQUIST, P.; ISHIKAWA, M. Mutation of host DnaJ homolog inhibits *Brome mosaic virus* negative-strand RNA synthesis. *Journal of Virology*, v. 77, p. 2990-2997, 2003.
- TONGANUNT, M.; NUPAN, B.; SAENGSAKDA, M.; SUKLOUR, S.; WANNA, W.; SENAPIN, S.; CHOTIGEAT, W.; PHONGDARA, A. The role of Pm-fortilin in protecting shrimp from *White spot syndrome virus* (WSSV) infection. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 25, p. 633-637, 2008.
- TRUTA, A.A.C.; SOUZA, A.R.R.; NASCIMENTO, A.V.S.; PEREIRA, R.C.; PINTO, C.M.F.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 160-168, 2004.
- URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Research*, v. 74, p. 157-175, 2001.
- VAHEY, M.T.; NAU, M.E.; JAGODZINSKI, L.L.; YALLEY-OGUNRO, J.; TAUBMAN, M.; MICHAEL, N.L.; LEWIS, M.G. Impact of viral infection on the gene expression profiles of proliferating normal human peripheral blood

- mononuclear cells infected with HIV type 1 RF. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 18, p. 179-192, 2002.
- VALCHANOVA, R.S.; PICARD-MAUREAU, M.; BUDT, M.; BRUNE, W. Murine cytomegalovirus m142 and m143 are both required to block protein kinase R-mediated shutdown of protein synthesis. *Journal of Virology*, v. 80, p. 10181-10190, 2006.
- VAN, D.T.; FERRO, N.; JACOBSEN, H.J. Development of a simple and effective protocol for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disc transformation of commercial tomato cultivars. *GM Crops*, v. 1, p. 312-321, 2010.
- VENUGOPAL, T. Evolution and expression of Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP) of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, v. 142, p. 8-17, 2005.
- VERCHOT, J.; CARRINGTON, J.C. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology*, v. 69, p. 3668-3674, 1995.
- VIJAYAPALANI, P.; MAESHIMA, M.; NAGASAKI-TAKEKUCHI, N.; MILLER, W.A. Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathogens*, v. 8, 2012.
- WANG, S.; ZHAO, X.F.; WANG, J.X. Molecular cloning and characterization of the translationally controlled tumor protein from *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Biology Reports*, v. 36, p. 1683-1693, 2009.
- WEI, T.; ZHANG, C.; HONG, J.; XIONG, R.; KASSCHAU, K.D.; ZHOU, X.; CARRINGTON, J.C.; WANG, A. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens*, v. 6, p. e1000962, 2010.
- WEN, R.H.; HAJIMORAD, M.R. Mutational analysis of the putative pipo of *Soybean mosaic virus* suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology*, v. 400, p. 1-7, 2010.
- WHITHAM, S.A.; QUAN, S.; CHANG, H.S.; COOPER, B.; ESTES, B.; ZHU, T.; WANG, X.; HOU, Y.M. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Journal*, v. 33, p. 271-283, 2003.
- WITTMANN, S.; CHATEL, H.; FORTIN, M.G.; LALIBERTE, J.F. Interaction of the viral protein genome linked [proteinase] of *Turnip mosaic potyvirus* with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology*, v. 234, p. 84-92, 1997.
- YAMAMOTO, M.; MARUYAMA, D.; ENDO, T.; NISHIKAWA, S. *Arabidopsis thaliana* has a set of J proteins in the endoplasmic reticulum that are conserved from yeast to animals and plants. *Plant Cell Physiology*, v. 49, p. 1547-1562, 2008.
- YANG, C.; GUO, R.; JIE, F.; NETTLETON, D.; PENG, J.; CARR, T.; YEAKLEY, J.M.; FAN, J.-B.; WHITHAM, S.A. Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 20, p. 358-370, 2007.

- YARM, F.R. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Molecular and Cellular Biology*, v. 22, p. 6209-6221, 2002.
- YEAM, I.; KANG, B.C.; LINDEMAN, W.; FRANTZ, J.D.; FABER, N.; JAHN, M.M. Allele-specific CAPS markers based on point mutations in resistance alleles at the *pvr1* locus encoding eIF4E in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 112, p. 178-186, 2005.
- YOUNG, J.C.; AGASHE, V.R.; SIEGERS, K.; HARTL, F.U. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology*, v. 5, p. 781-791, 2004.
- YU, L.; YE, L.; ZHAO, R.; LIU, Y.F.; YANG, S.J. HSP70 induced by Hantavirus infection interacts with viral nucleocapsid protein and its overexpression suppresses virus infection in Vero E6 cells. *American Journal of Translational Research*, v. 1, p. 367-380, 2009.
- YUBERO, N.; ESTESO, G.; CARDONA, H.; MORERA, L.; GARRIDO, J.J.; BARBANCHO, M. Molecular cloning, expression analysis and chromosome localization of the *Tpt1* gene coding for the pig translationally controlled tumor protein (TCTP). *Molecular Biology Reports*, v. 36, p. 1957-1965, 2009.
- ZAMBOLIM, E.M.; COSTA, H.; CAPUCHO, A.S.; ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; KITAJIMA, E.W. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 325-327, 2004.
- ZHANG, W.; YANG, X.; QIU, D.; GUO, L.; ZENG, H.; MAO, J.; GAO, Q. PeaT1-induced systemic acquired resistance in tobacco follows salicylic acid-dependent pathway. *Molecular Biology Reporter*, v. 38, p. 2549-2556, 2011.
- ZHU, S.; JEONG, R.D.; VENUGOPAL, S.C.; LAPCHYK, L.; NAVARRE, D.; KACHROO, A.; KACHROO, P. SAG101 forms a ternary complex with EDS1 and PAD4 and is required for resistance signaling against turnip crinkle virus. *PLoS Pathogens*, v. 7, p. e1002318, 2011.
- ZHU, Y.; QI, Y.; XUN, Y.; OWENS, R.; DING, B. Movement of *Potato spindle tuber viroid* reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiology*, v. 130, p. 138-146, 2002.
- ZYLICZ, M.; ANG, D.; LIBEREK, K.; GEORGOPOULOS, C. Initiation of lambda DNA replication with purified host- and bacteriophage-encoded proteins: The role of the *dnaK*, *dnaJ* and *grpE* heat shock proteins. *EMBO Journal*, v. 8, p. 1601-1608, 1989.