

DIÊGO RODRIGUES SOARES NOGUEIRA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTI-SORO POLICLONAL VISANDO A
DETECÇÃO DO Pepper yellow mosaic virus**

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
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

N778p
2014

Nogueira, Diêgo Rodrigues Soares, 1988-
Produção e avaliação de anti-soro policlonal visando a
detecção do potyvirus Pepper yellow mosaic virus / Diêgo
Rodrigues Soares Nogueira. – Viçosa, MG, 2014.
ix, 34f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.25-34.

1. Fitopatologia. 2. Hortaliças - Doenças e pragas. 3.
Pepper yellow mosaic virus. 4. Pimentão - Doenças e pragas.
5. Tomate - Doenças e pragas. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

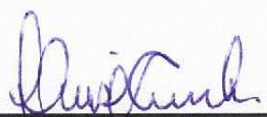
CDD 22. ed. 632.8

DIÊGO RODRIGUES SOARES NOGUEIRA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTI-SORO POLICLONAL VISANDO A
DETECÇÃO DO *Pepper yellow mosaic virus***

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*.

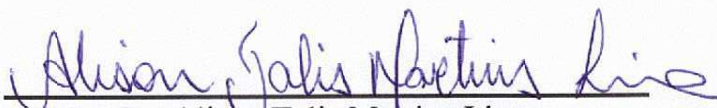
APROVADA: 11 de março de 2014



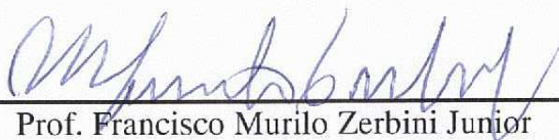
Prof. Luis Cláudio Vieira da Cunha



Profa. Poliane Alfenas Zerbini
(Coorientadora)



Dr. Alison Talis Martins Lima



Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior
(Orientador)

À Vozinha Luci, à minha mãe Alzenir;
À minha noiva Leidiane;
Aos meus irmãos Diogo, Jhonatas e Luciana;
À minha sobrinha Ana Júlia e à minha afilhada Ester.

DEDICO

"Seja um estudante, não um seguidor. Não vá simplesmente fazer o que alguém diz. Tenha interesse pelo que alguém diz, então debata, pondere e considere de todos os ângulos."
(Jim Rohn)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, oportunidades a mim oferecidas e por estar sempre ao meu lado quando precisei.

À Vozinha (Luci), pelo exemplo de vida, carinho, amor, incentivo, torcida e educação.

Aos meus Pais Alzenir e Luciano (In memoriam) pela inspiração e apoio em todas as etapas de minha vida.

À minha noiva (Leidiane Albuquerque) pelo incentivo, companheirismo, carinho e auxílio, principalmente nos momentos mais difíceis, muito obrigado! Essa vitória também é sua!

Aos meus irmãos Diogo, Jhonatas e Luciana, pelos momentos de descontração.

À minha sobrinha Ana Júlia e a minha afilhada Ester pelos momentos de alegria que vocês, mesmo sem entenderem, me proporcionaram nestes dois anos.

Aos meus tios, principalmente a tio Ricardo pelo exemplo paternal e torcida.

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

Ao Departamento de Fitopatologia, pela formação e oportunidades proporcionada.

Ao Departamento de Microbiologia Agrícola, por proporcionar a estrutura para elaboração desta pesquisa.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudo.

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

À Prof^a. Poliane Alfenas-Zerbini pela orientação, conselhos, valiosos ensinamentos e confiança a mim depositados, muito obrigado.

Ao prof. Luis Cláudio e ao Dr. Alison Martins pela disponibilidade em participar da banca e pelas sugestões.

Ao prof. e amigo Rui Sales Júnior (UFERSA), pelo incentivo, ensinamento e referência de profissional.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) pela disponibilização do espectrômetro de massas tipo MALDI TOF/TOF.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa em virologia (Laboratório de Virologia Vegetal Molecular e Laboratório de Microbiologia Industrial): Ana, Adriana, Alison, Camila, César, Chaianne, Daniel, Diogo, Fábio Assad, Fernanda Silva, Flávia, João Paulo, Joseane, Karel, Laiane, Larissa, Lina, Márcio, Osvaldo, Pedro, Sílvia, Talita e Vitor pelos momentos de descontração e amizade em todos os momentos. Em especial agradeço aos amigos Fábio Nascimento, Fernanda Bruckner, Marcos e David pelos valiosos ensinamentos e incentivo durante minha pesquisa.

Ao amigo André Xavier, não só pelos valiosíssimos ensinamentos, mas pelo companheirismo, pelas discussões, pelas noites no laboratório, pela torcida, em fim, por ter se tornado um irmão. Meu muito obrigado meu irmão.

Aos funcionários Joaquim, Renan, Rita, Seu Paulo e Hugo pelo imprescindível apoio nas pesquisas e convivência.

Aos amigos da Microbiologia Merielle, Fernando e Priscila, obrigado pelos momentos felizes que vocês me proporcionaram.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de tecidos sob a coordenação do Prof. Wagner Otoni. Meu muito obrigado pelo apoio.

Aos amigos Hugo, Jaime, Roberto e à República JOIN-US: Danilo, Hamilton, Tadeu, Athus, Leandro e Helton pela convivência, momentos de distração e conversas produtivas. Sem vocês minha estadia Viçosa não teria sido a mesma.

Aos colegas de Mestrado: Ana Lúcia, Cecília, Deco, Elder, Fernanda, Izaías, Leonardo, Lílian, Tiago, Nilmara, Priscilla, Rosemeire, Wanderson e em especial à Inorbert, Sara, Borel e Raul pela amizade, companhia, conselhos e por transformarem os momentos estressantes em momentos divertidos.

Ao “Grupo”: Adans e Renata pela amizade, cumplicidade e momentos felizes que vivemos.

À República “ARS MENINAS”: Julliany, Gigi, Diana, Joyce, Carol, obrigado pelo apoio em meu início em Viçosa.

A todos que diretamente ou indiretamente participaram deste trabalho.

Muito Obrigado!

BIOGRAFIA

DIÊGO RODRIGUES SOARES NOGUEIRA, filho de Antônio Luciano Soares Nogueira (In memorian) e Alzenir Rodrigues Soares Nogueira, nasceu em 17 de Maio de 1988 em Mossoró, Rio Grande do Norte.

Em 2007 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), vindo a graduar-se em fevereiro de 2012 e em março do mesmo ano ingressou no Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo sua dissertação em março de 2014.

Em março de 2014 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia na UFERSA.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Família Potyviridae e o gênero Potyvirus	3
2.3. O mosaico amarelo do pimentão e do tomateiro	9
2.4. Anti-soro na detecção viral	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Isolados virais	12
3.2. Extração de RNA total	12
3.3. RT-PCR e clonagem em vetor de expressão	12
3.4. Expressão, extração e purificação da CP recombinante do PepYMV	13
3.5. Caracterização da CP recombinante	13
3.6. Imunização dos coelhos e coleta dos anti-soros	14
3.7. Avaliação do anti-soro	14
3.7.1. Western blot	14
3.7.2. ELISA indireto	15
4. RESULTADOS	16
4.1. RT-PCR e clonagem em vetor de expressão	16
4.2. Expressão, extração e purificação da CP recombinante do PepYMV	16
4.3. Caracterização da CP recombinante	17
4.4. Produção e avaliação do anti-soro	18
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÕES	24
7. LITERATURA CITADA	25

RESUMO

NOGUEIRA, Diêgo Rodrigues Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2014. **Produção e avaliação de anti-soro policlonal visando a detecção do Pepper yellow mosaic virus.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Coorientadora: Poliane Alfenas Zerbini.

O Pepper yellow mosaic virus (PepYMV), agente causal do mosaico amarelo do pimentão e do tomateiro, desde seu primeiro relato no Brasil no ano de 2002 em Brasília, DF, vem se disseminando em regiões produtoras de pimentão e tomate causando perdas substanciais aos produtores dessas culturas. Para identificação dessa enfermidade algumas ferramentas são utilizadas, dentre elas, podemos destacar os métodos moleculares e sorológicos, sendo estes últimos mais utilizados por apresentarem alta especificidade e sensibilidade, além de possuir um custo relativamente baixo. Para a produção de anti-soro, tradicionalmente, utilizam-se partículas virais concentradas como imunógenos. No entanto, o processo de purificação é muito trabalhoso e pode apresentar pureza e concentrações insatisfatórias. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi produzir um anti-soro policlonal, a partir da proteína capsidial recombinante do PepYMV, que permita sua utilização tanto para diagnose quanto para estudos de interação da proteína capsidial do PepYMV com outras proteínas virais e fatores do hospedeiro. A sequência do gene da proteína capsidial do PepYMV foi clonada em vetor de expressão (pRSET-A) e transformada em *Escherichia coli*, linhagem BL21::DE3, para expressão *in vitro*. A proteína expressa fusionada a uma cauda de histidina foi purificada sob condições desnaturantes por cromatografia de afinidade em coluna de resina Ni-NTA. Em seguida a proteína purificada foi dialisada sob condições renaturantes e sua integridade e identidade foram confirmadas por gel de poliacrilamida a 12% e análise de espectrometria de massa. Dois coelhos da raça Nova Zelândia foram imunizados com quantidades crescentes da proteína recombinante dialisada adicionados do adjuvante de Freud incompleto na proporção 1:1. A sensibilidade e a especificidade do anti-soro foram testados por Western blot e ELISA indireto. O anti-soro produzido apresentou boa especificidade e sensibilidade, provando ser uma ferramenta confiável para a diagnose do PepYMV.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Diêgo Rodrigues Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2014. **Production and evaluation of polyclonal antisera for the detection of Pepper yellow mosaic virus.** Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-Advisor: Poliane Alfenas Zerbini.

Pepper yellow mosaic virus (PepYMV) naturally infects sweet pepper and tomato plants, leading to severe losses since its first report in Brazil (Brasília, DF, 2002). Molecular and serological methods can be used to detect the pathogen. Serological methods for viral detection require the use of a high quality antiserum, offering good sensitivity and specificity. Traditionally, purified viral particles are used as immunogens. However, the purification process is very laborious and the final preparation may have unsatisfactory purity and/or concentration. Thus, the aim of this work was to produce a polyclonal antiserum against the recombinant capsid protein (CP) of PepYMV to allow its use both for diagnosis and for studies of the interaction of the PepYMV CP with other viral proteins and host factors. The coding sequence of the capsid protein gene of PepYMV was cloned into an expression vector (pRSET-A) and transformed into *Escherichia coli* strain BL21::DE3 for *in vitro* expression. The recombinant protein, fused to a histidine tag, was purified under denaturing conditions by affinity chromatography using a Ni-NTA column. The purified recombinant protein was dialyzed under renaturing conditions. Its integrity and identity were confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometer analyses. New Zealand rabbits were immunized with increasing amounts of the recombinant protein. The sensitivity and specificity of the antisera were analyzed by Western blot and indirect ELISA assays. The antisera raised against the recombinant CP showed good specificity and sensibility, proving to be a reliable tool for the detection of PepYMV.

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, com mais de 100 espécies descritas, o que corresponde a cerca de 83% das espécies pertencentes a esta 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 annuum*) (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 (Truta et al., 2004; Dianese et al., 2008; Moura et al., 2012b).

A detecção de fitopatógenos é uma etapa crítica no controle de doenças e é desejável que os métodos de diagnose sejam precisos, rápidos e de baixo custo. Existem diversos métodos utilizados para a detecção de vírus que infectam plantas, dentre eles a gama de hospedeiros, ELISA, PCR, RT-PCR, qPCR, amplificação por círculo rolante (RCA), ELISA/q-PCR multiplex, hibridização e microscopia eletrônica (Boonham et al., 2003; Rezende e Kitajima, 2012; Kaur et al., 2013; Taskin et al., 2013; Zhang et al., 2013; Boonham et al., 2014). Tradicionalmente a detecção de potyvírus tem sido realizada por ELISA (Basso et al., 2010; Carvalho et al., 2013) embora RT-PCR e qPCR também sejam utilizados (Hayashi et al., 2013; Boonham et al., 2014).

Apesar do desenvolvimento de técnicas moleculares baseadas na detecção do RNA viral, o método ELISA ainda é o mais utilizado, por oferecer vantagens como utilização em larga escala, simplicidade, reprodutibilidade dos resultados e apresentar baixo custo (Calegario, 2009; Basso et al., 2010; Carvalho et al., 2013; Boonham et al., 2014). Para a detecção baseada por ELISA é necessário a utilização de anti-soro, que

pode ser produzido a partir de partículas virais purificadas ou a partir de proteínas virais sintetizadas *in vitro* (Truta et al., 2004; Basso, 2010; Gibbs e Ohshima, 2010). Sistemas de expressão de proteínas recombinantes em procariotos, principalmente os que utilizam *Escherichia coli* como célula hospedeira, tem sido amplamente utilizados devido à facilidade e baixo custo de cultivo, reprodutibilidade, abundância de proteína produzida e facilidade de extração (Nascimento et al., 2003; Alkowni et al., 2011). Além disso, esse sistema permite que modificações nos vetores e nas linhagens de *E. coli* sejam realizadas com o intuito de aumentar a eficiência e versatilidade do sistema original (Colinet et al., 1994; Hull, 2002; Nascimento et al., 2003; Alkowni et al., 2011; Balzer et al., 2013; Corchero et al., 2013; Waegeman et al., 2013).

O anti-soro, além da diagnose, pode ser utilizado em estudos de interação entre as proteínas virais e proteínas do hospedeiro, transmissão por vetor, dentre outras. Uzest et al. (2007) e Calegario (2009) utilizaram anti-soro para detectar partículas virais em insetos vetores. Ala-Poikela et al. (2011) utilizaram anti-soros para detectar a interação entre a HC-Pro e os fatores de iniciação da tradução eIF(iso)4E e eIF4E. Para identificar a localização da proteína P1 do PVY em células infectadas, Arbatova et al. (1998) utilizaram um anti-soro fusionado a partículas de ouro e observaram a associação da P1 com as inclusões citoplasmáticas.

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi a obtenção de um anti-soro policlonal, a partir da proteína capsidial (CP) recombinante do PepYMV, que permita sua utilização tanto para diagnose quanto para estudos de interação da CP com outras proteínas virais e fatores do hospedeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Potyviridae e o gênero Potyvirus

A família Potyviridae é uma das maiores e economicamente mais importantes famílias de vírus que infectam plantas, contendo cerca de 15% das espécies descritas (ICTV, 2014). Atualmente, possui 176 espécies distribuídas em oito gêneros (Brambyvirus, Bymovirus, Ipomovirus, Macluravirus, Poacevirus, Potyvirus, Rymovirus e Tritimovirus) (ICTV, 2014). As espécies são classificadas nos gêneros de acordo com o agente vetor e a organização do genoma (Adams et al., 2012).

Os membros da família Potyviridae estão distribuídos em todo o mundo, infectando mais de 2.000 espécies de plantas. Todas as espécies classificadas dentro desta família formam corpos de inclusões do tipo cata-vento no citoplasma de células infectadas. Membros dessa família são transmitidos naturalmente por afídeos, ácaros, moscas-branca ou fungo, ou experimentalmente por inoculação de extrato vegetal tamponado utilizando preparações virais purificadas ou concentradas (Adams et al., 2012).

O gênero Potyvirus é o mais numeroso da família Potyviridae, com 146 espécies descritas até o momento (ICTV, 2014) o que corresponde a aproximadamente 83% das espécies descritas na família. Em conjunto, essas espécies infectam uma ampla gama de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas em diferentes regiões climáticas, causando significativos danos econômicos em várias culturas (Nair, 2012; Alam et al., 2013; Spadotti et al., 2013). Esses vírus são transmitidos de maneira não-persistente por afídeos (DiPiero et al., 2006; Adams et al., 2012).

As partículas do potyvírus são alongadas, flexuosas, com 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído por 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).

O genoma dos membros do gênero Potyvirus está 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. A protease NIa-Pro é a responsável pela maior parte das clivagens, dando origem a 8-10 produtos finais (Carrington e Dougherty, 1988; Carrington et al., 1990) (Figura 1). As proteases P1 e HC-Pro catalisam suas próprias clivagens em cis e a protease NIa-Pro, além de catalisar sua própria clivagem em cis, catalisa seis clivagens adicionais em trans (Daros e Carrington, 1997).

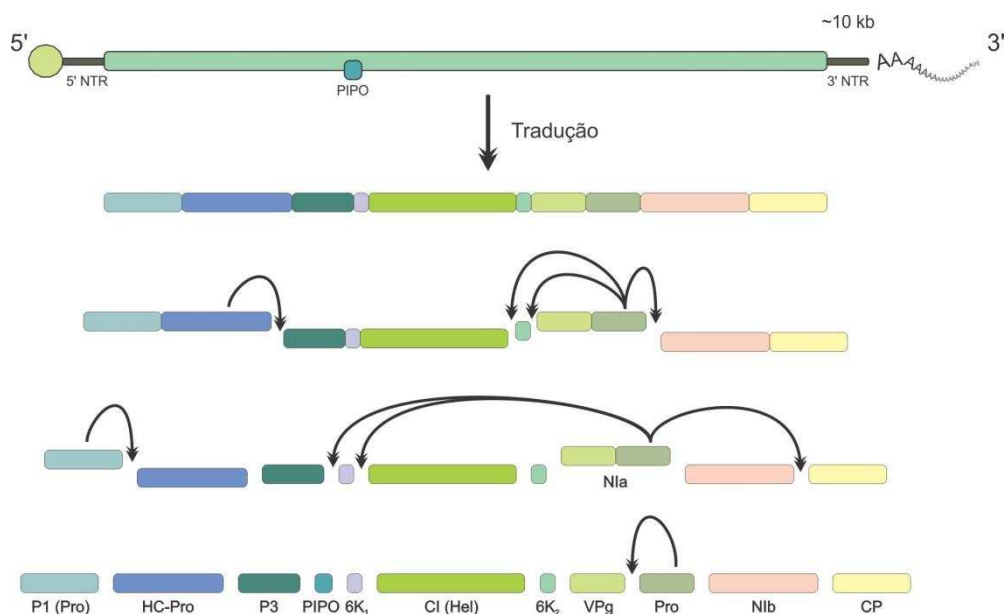


Figura 1. Representação esquemática da organização e expressão do genoma de um potyvírus. O ssRNA genômico (linha preta) está ligado covalentemente à VPg (esfera verde) em sua extremidade 5' e a uma cauda poliadenilada em sua extremidade 3'. A ORF principal (retângulo verde sobrepondo ao ssRNA), quando traduzida, origina uma poliproteína que sofre autoclivagem por proteases tanto em cis (P1, HC-Pro e NIa-Pro) quanto em trans (NIa-Pro), dando origem às proteínas maduras. Em alguns potyvírus a proteína 6K₁ fica fusionada à proteína P3. A segunda ORF (PIPO), sobreposta à região codificadora da P3 (quadro azul), é traduzida por meio de mudança de fase.

A principal consequência desse mecanismo de expressão gênica é que as proteínas virais derivadas da poliproteína são produzidas em quantidades equimolares, independente da necessidade do vírus por cada proteína em particular. As proteínas produzidas em excesso acumulam na célula infectada na forma de inclusões (Adams et al., 2012). 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 (Zerbini e Zambolim, 1999).

A segunda ORF, denominada pipo (pretty interesting Potyviridae ORF), está localizada dentro da região codificadora da proteína P3, porém em outra fase de leitura (+2 em relação a poliproteína). 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 uma função da proteína PIPO no movimento viral (Wei et al., 2010; Wen e Hajimorad, 2010; Vijayapalani et al., 2012).

Após a entrada do vírus na célula, ocorre sua desencapsidação e o RNA viral atua como um RNA mensageiro. O RNA viral não é capeado, portanto sua tradução ocorre de forma independente desta estrutura (Carrington et al., 1990). Dois elementos regulatórios fundamentais para a tradução independente de CAP (cap-independent regulatory elements, CIRES) foram identificados na região 5'NTR atuando em conjunto na tradução do RNA viral (Niepel e Gallie, 1999). No Tobacco etch virus (TEV), as regiões 5' e 3' do genoma viral, incluindo a cauda poli-A, agem de forma sinérgica na regulação da tradução, ou seja, a tradução é estimulada pela presença da cauda poli-A (Gallie et al., 1995). Dois mecanismos de iniciação da tradução da poliproteína foram detectados entre os potyvírus: a iniciação interna (Basso et al., 1994), onde o ribossomo se acopla ao RNA viral sem a necessidade do reconhecimento da capa na extremidade 5', e o leaky scanning (Simón-Buela et al., 1997), onde o ribossomo não reconhece/ignora o primeiro códon de iniciação da tradução, iniciando no códon subsequente. É possível que potyvírus distintos utilizem estratégias diferentes para a tradução do genoma, ou que ambas as estratégias sejam utilizadas em conjunto. Já foi demonstrada também a interação entre a VPg e o fator de iniciação da tradução eIF(iso)4E, onde esta interação aumenta a taxa de tradução das proteínas virais (Lellis et al., 2002).

O processo de replicação viral envolve a maioria das proteínas dos potyvírus, de maneira direta ou indireta. Inicialmente, uma fita de RNA negativo é sintetizada a partir da extremidade 3' do RNA viral. Esta fita negativa serve de molde para a replicação de várias fitas de RNA sentido positivo que constituem novos RNAs virais. As extremidades 5'NTR e 3'NTR são essenciais para a replicação, uma vez que possuem as sequências promotoras para a síntese de RNA viral. Estruturas secundárias presentes na região 3'NTR e na sequência codificadora da proteína capsidial são essenciais para o reconhecimento pela proteína NIb, que é uma RNA polimerase dependente de RNA viral (Hong e Hunt, 1996), e consequentemente para a replicação viral (Haldeman-Cahill et al., 1998; Teycheney et al., 2000).

Uma característica das proteínas codificadas pelos potyvírus é o seu caráter multifuncional. Cada proteína é geralmente responsável por várias funções durante o ciclo de infecção, incluindo replicação, movimento e transmissão pelo vetor. As proteínas produzidas pelos potyvírus e suas principais funções estão sintetizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Proteínas produzidas pelos potyvírus e suas funções.

Proteína	Massa molecular	Funções	Referência
P1	60-63 kDa	Protease, amplificação do genoma, ativadora ou regulador da replicação e pode estar envolvida na infectividade e acúmulo viral.	Carrington et al. (1990); Verchot e Carrington (1995); Arbatova et al. (1998); Merits et al. (1999); Rajamaki et al. (2005); Rohožková e Navrátil (2011).
HC-Pro	50-53 kDa	Protease, replicação viral, processamento e transporte do RNA viral, movimento célula-a-célula, movimento a longa distância, aquisição e transmissão via inseto vetor, supressora do silenciamento gênico.	Carrington et al. (1990); Klein et al. (1994); Cronin et al. (1995); Kasschau e Carrington (1995); Kasschau et al. (1997); Rojas et al. (1997); Anandalakshmi et al. (1998); Mallory et al. (2002); Dunoyer et al. (2004); Ebhardt et al. (2005); Ruiz-Ferrer et al. (2005); López-Moya e García (2008).
P3	~ 42 kDa	Ativador ou regulador da replicação.	Rodriguez-Cerezo et al. (1993); Merits et al. (1999); Vijayapalani et al. (2012).
P3N-PIPO	25 kDa	Movimento a longa distância.	Wen e Hajimorad (2010); Vijayapalani et al. (2012).
6K1	6 kDa	Relacionada com a severidade dos sintomas (em conjunto com a P3) e adaptação ao hospedeiro (em conjunto com a CI).	Lalić et al. (2010); Rohožková e Navrátil (2011); Calvo et al. (2014).
CI	~ 70 kDa	Helicase, ATPase, ligação a RNA e movimento célula-a-célula.	Laín et al. (1991); Rojas et al. (1997); Adams et al. (2012).

Tabela1 (cont.)

Proteína	Peso Molecular	Funcionalidade	Referência
6K2	6 kDa	Ancoragem do complexo de replicação a membranas (indução de vesículas de replicação).	Restrepo-Hartwig e Carrington (1994); Schaad et al. (1997); Grangeon et al. (2013).
NIa-VPg	~ 21 kDa	Iniciação da tradução, movimento célula-a-célula e movimento a longa distância.	Carrington et al. (1990); Murphy et al. (1996); Nicolas et al. (1997); Schaad et al. (1997); Adams et al. (2012).
NIa-Pro	~ 27 kDa	Protease.	
NIb	~ 57 kDa	RNA polimerase dependente de RNA.	Hajimorad et al. (1996); Hong e Hunt (1996); Urcuqui-Inchima et al. (2000); Rajamäki e Valkonen (2009)
CP	30-47 kDa	Encapsidação do RNA genômico, replicação viral, movimento célula-a-célula, movimento a longa distância, aquisição e transmissão viral pelo inseto vetor.	Shukla et al. (1991); Dolja et al. (1994); Dolja et al. (1995); Mahajan et al. (1996); Rojas et al. (1997); Andersen e Johansen (1998); Urcuqui-Inchima et al. (2000); López-Moya e García (2008); Adams et al. (2012); Guaragna et al. (2013); Kaur et al. (2013)

2.3. 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; Dianese et al., 2008; Lima et al., 2010; Moura et al., 2011; Moura et al., 2012b). 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 tenham ligação com a introdução de materiais com níveis elevados de resistência ao Potato virus Y (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).

O genoma completo do PepYMV, isolado de plantas de pimentão infectadas no Distrito Federal, foi sequenciado e a análise da sequência mostrou uma organização genômica típica de potyvírus, com uma ORF principal codificando uma poliproteína que sofre autoclivagem resultando em 10 peptídeos maduros, e a ORF PIPO. A análise filogenética agrupou o PepYMV dentro do grupo do PVY, mais relacionado ao Pepper mottle virus (PepMoV), como comumente ocorre com potyvírus da América do Sul (Lucinda et al., 2012).

2.4. Anti-soro na detecção viral

A sorologia consiste no uso de anti-soros para a detecção de antígenos (suspensão de bactérias, partículas virais, proteínas) (Romeiro, 2001; Langham, 2010; Rezende e Kitajima, 2012). Tradicionalmente, partículas virais purificadas são utilizadas como imunógeno na produção de anti-soro visando a diagnose de viroses em plantas. O animal comumente utilizado é o coelho, por proporcionar um manejo fácil e produzir uma boa quantidade de anti-soro (Romeiro, 2001; Langham, 2010; Rezende e Kitajima, 2012). Entretanto, a purificação viral normalmente é um processo trabalhoso, que frequentemente resulta em preparações com pureza e concentrações insatisfatórias, comprometendo a qualidade do anti-soro a ser produzido (Basso, 2010; Carvalho et al.,

2013). Alternativamente, na produção de anti-soros, o vírus purificado pode ser substituído por proteínas virais expressas in vitro, sendo estas utilizadas como antígenos (Zerbini et al., 2002).

A utilização de proteínas estruturais (como por exemplo a CP) para produção de anti-soro, com fins de diagnóstico, costuma ser mais frequente do que outras proteínas virais não estruturais. Isto se deve ao fato da maioria dos anti-soros produzidos utilizarem partículas virais purificadas como imunógenos. Como a CP é a proteína que reveste os vírions, é normalmente a proteína expressa em maior quantidade na planta infectada, facilitando sua detecção (Truta et al., 2004; Calegario, 2009; Basso et al., 2010).

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).

Anti-soros produzidos a partir da expressão da proteína capsidial in vitro tendem a ser mais específicos, minimizando a ocorrência de reações cruzadas (Basso, 2010). Barbieri et al. (2004) demonstraram, pelos testes de ELISA, Western blot e imunodifusão, que um anti-soro produzido contra a CP expressa do potyvírus Watermelon mosaic virus (WMV) mostrou-se mais específico do que o produzido a partir de suas partículas virais purificadas, o qual apresentou reação sorológica cruzada com outro potyvírus (ZYMV).

Métodos alternativos de detecção, tais como as técnicas moleculares (RT-PCR, hibridização, qPCR) oferecem resultados mais rápidos e sensíveis. Entretanto, o emprego destes em indexação em larga escala, por exemplo, em levantamento de ocorrência de viroses, não é amplamente utilizado, em função principalmente dos custos, da complexidade de execução e pelo fato de requererem equipamentos mais sofisticados. Tradicionalmente, o teste ELISA tem sido utilizado na detecção e diagnóstico de vírus de plantas em maior número de amostras, por reunir sensibilidade, praticidade e baixo custo (Basso, 2010; Carvalho et al., 2013).

Para o PepYMV, além do ELISA, já foram utilizadas para detecção viral o Dot-ELISA, Western blot e RT-PCR (Cunha et al., 2004; Truta et al., 2004; Dianese et al., 2008; Moura et al., 2012a; Moura et al., 2012b; Quezado-Duval et al., 2013). Entretanto, conforme referido anteriormente, essas técnicas ainda são muito onerosas,

dificultando a diagose a partir de uma quantidade elevada de plantas (Basso et al., 2010; Carvalho et al., 2013).

O ELISA tem sido o método mais utilizado para diagnose do PepYMV, com a utilização de anti-soros produzidos a partir de partículas virais purificadas (Cunha et al., 2004; Truta et al., 2004). Recentemente, um anti-soro comercial para o PepYMV foi lançado pelo Leibniz-Institut DSMZ na Alemanha. Devido ao fato de não ser produzido no Brasil, o custo do de sua utilização é elevado, além de haver a possibilidade de não ser capaz de identificar isolados locais.

Um anti-soro produzido a partir da proteína capsial recombinante do PepYMV expressa in vitro pode ser uma alternativa mais rápida e eficiente para produção de anti-soros capazes de realizar a diagnose do PepYMV e para uso em estudos de interação da CP com outras proteínas virais e fatores do hospedeiros.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi produzir um anti-soro policlonal por expressão em *E. coli* da CP recombinante do PepYMV, e avaliar sua especificidade e sensibilidade na detecção viral em diferentes hospedeiros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados virais

Os isolados 3 e 19 do PepYMV foram descritos por Truta et al. (2004), e vem sendo mantido em plantas de *Nicotiana debneyi* por meio de inoculações sucessivas via extrato vegetal tamponado (fosfato de potássio 0,2 M pH 7,2 com 0,1 % de bissulfito de sódio) na proporção de 1 g de folha para 5 mL de tampão, em casa-de-vegetação.

3.2. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de aproximadamente 100 mg de folhas de *N. debneyi*, infectadas com o isolado 3 do PepYMV, utilizando o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), sua qualidade foi verificada pela razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm e sua integridade foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. 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.

3.3. RT-PCR e clonagem em vetor de expressão

Oligonucleotídeos para amplificar a região codificadora da CP do PepYMV foram desenhados baseados na sequência do isolado 3 obtida Truta et al. (2004). O gene da CP do Isolado 3 do PepYMV foi amplificado por RT-PCR utilizando os primers CP-PepYMV-BamHI (5' AAA GGA TCC GCG GAT GAG AAG T 3') e o CP-PepYMV-XhoI (5' CCC CTC GAG CTA CAT ATT TCT CAC C 3').

O cDNA (150 ng) foi amplificado por PCR utilizando-se a enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) nas seguintes condições: 94 °C por 1 minuto (desnaturação), 50 °C por 1 minuto (anelamento), 72 °C por 1 minuto (extensão). O amplicon foi purificado utilizando-se o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), digerido com as enzimas BamHI e XhoI e ligado ao vetor de expressão pRSET-A (Invitrogen), previamente digerido com as mesmas enzimas. Células competentes de *Escherichia coli* estirpe DH-5 α foram transformadas por choque térmico (Sambrook e Russel, 2001). A clonagem foi confirmada por PCR com os oligonucleotídeos descritos anteriormente e sequenciamento.

3.4. Expressão, extração e purificação da CP recombinante do PepYMV

Para a expressão transiente da CP do PepYMV, a construção pRSET-A/CP-PepYMV foi transferida para *E. coli* estirpe BL21::DE3 pelo método do choque térmico. Uma colônia foi crescida em 200 mL do meio Luria Bertani (LB) líquido contendo ampicilina (100 µg/mL) a 37°C a 250 rpm até atingir OD₆₀₀ de aproximadamente 0,5. A indução da expressão foi realizada com a adição de IPTG na concentração final de 1 mM. Aproximadamente 5 horas após a adição de IPTG, as células foram centrifugadas a 4000 g por 10 min e armazenadas a -80°C.

A extração das proteínas totais foi realizada de acordo com Noueir et al. (1994) seguindo um protocolo não desnaturante envolvendo a ressuspensão do pellet em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM EDTA 2 mM, pH 8,0), tratamento com lisozima (0,5 mg/mL) e sonicação para promover a lise celular. Ao final, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de tampão N (NaHCO₃ 100 mM, pH 9,0) com concentração final de SDS até 1% (p/v).

A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA (Qiagen) sob condições desnaturantes, de acordo com as instruções do fabricante. As frações da purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As frações contendo a proteína purificada foram dialisadas em condições renaturantes conforme descrito por Carvalho et al. (2013). Após a diálise, a proteína foi analisada por SDS-PAGE e quantificada pelo método de Bradford utilizando-se o Dc Protein Assay kit (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante.

3.5. Caracterização da CP recombinante

Para caracterização da proteína expressa foi realizada uma análise por espectrometria de massa. Para isso, a proteína expressa e purificada foi submetida a SDS-PAGE e corada com azul de coomassie R250 (Bio-Rad). A banda com a massa correspondente à proteína capsidial do PepYMV foi excisada do gel e descorada por 12 horas em uma solução de acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio (25 mM, pH 8,8). A banda descorada foi submetida a digestão triptica conforme descrito por Shevchenko et al. (2006), utilizando-se a enzima Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade (Promega). Após 12 h de tripsinação, a amostra foi concentrada a 10 µL em SpeedVac (Eppendorf) e a remoção dos sais foi realizada utilizando-se Zip Tip C18 pipette tips (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante.

O mapeamento da massa dos peptídeos foi realizado por espectrometria de massa acoplada a HPLC (nanoAcquity), utilizando-se um espectrômetro Ultraflex III (Bruker Daltonics). Os peptídeos identificados foram analisados utilizando o programa MASCOT MS/MS Ions Search (disponível em <http://www.matrixscience.com>) utilizando-se como banco de dados o NCBI.

3.6. Imunização de coelhos e coleta dos anti-soros

Para a produção do anti-soro foram imunizados dois coelhos da raça Nova Zelândia, com 60 dias de idade. Foram administradas quatro injeções intramusculares em intervalos semanais, com 100, 200, 200 e 400 µg da proteína no coelho 1 (nomeado CP-I) e 200, 400, 400 e 800 µg de proteína no coelho 2 (nomeado CP-II). Para estimular a resposta imune dos coelhos foi utilizado o adjuvante incompleto de Freund na proporção 1:1. Foram realizadas três sangrias com intervalos quinzenais, quinze dias após a última injeção. O sangue coletado foi incubado a 42°C por 1 h e logo em seguida incubado a 4°C por 12 horas. O soro foi coletado, aliquoteado e armazenado a -20°C.

3.7. Avaliação do anti-soro

A especificidade e a sensibilidade do anti-soro produzido foram avaliadas por meio de Western blot e ELISA indireto. O Western blot foi realizado de acordo com Sambrook e Russel (2001) e o ELISA indireto de acordo com Clark et al. (1986). O título do anti-soro foi determinado por ELISA indireto.

3.7.1. Western blot

Um total de 250 mg de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1,5 mL de tampão de extração (Tris-HCl 0,15 M, pH 6,8, glicerol 10%, betamercaptoetanol 5%, SDS 2%). O extrato foi fervido durante 3 min e em seguida centrifugado por 5 min a 10000 g. O sobrenadante foi separado por SDS-PAGE.

Para avaliar a sensibilidade do anti-soro em reconhecer a CP do PepYMV foi realizado um teste com diferentes concentrações da CP recombinante purificada (1:50, 1:100, 1:1000, 1:2000, e 1:5000 v/v). Como controle negativo foi utilizado extrato de proteínas totais obtidos de culturas bacterianas transformadas com vetor pRSET-A vazio (1:0; 1:10 e 1:100 v/v). O anti-soro foi utilizado na diluição 1:1000.

A capacidade do anti-soro em reconhecer a CP a partir de plantas infectadas foi avaliada utilizando-se extrato de proteínas totais de plantas (*Capsicum annuum* e *Nicotiana debneyi*) sadias e infectadas com o PepYMV. Como controle positivo foram

utilizados 5 µL da CP recombinante purificada e dialisada, na diluição 1:1000 (concentração inicial: 119 ng) e 5 µL de minipurificado viral do PepYMV. O minipurificado utilizado foi obtido por Cascardo (2010). Como controle negativo foram utilizados o extrato de proteínas totais de culturas bacterianas transformadas com pRSET-A vazio e o minipurificado de planta sadia. O anti-soro foi utilizado na diluição 1:1000.

Para avaliar o grau de sensibilidade do anti-soro em relação à detecção viral, foi realizado um ensaio de Western blot com extratos de proteínas totais extraídas de plantas (*N. debneyi*) sadias e infectadas com o PepYMV. As diluições do anti-soro testadas foram 1:1000, 1:3000 e 1:5000.

3.7.2. ELISA indireto

O título do anti-soro foi determinado por ELISA indireto. Para isso foram preparadas diluições do anti-soro a 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000 e 1:10000. Foram utilizadas folhas de *N. debneyi*, sadias e infectadas com o PepYMV. As plantas foram consideradas infectadas quando a razão da absorbância (OD_{405}) do extrato das folhas de plantas infectadas/sadias foi maior ou igual a 2 (Gillett et al., 1986).

A especificidade do anti-soro foi avaliada por meio de ELISA indireto utilizando-se plantas infectadas com vírus relacionados ou não relacionados ao PepYMV. Os vírus relacionados ao PepYMV foram o Potato virus Y (PVY, gên. Potyvirus) em *N. benthamiana* e Cowpea aphid-borne mosaic virus (CaBMV, Potyvirus) em *Passiflora* sp. Os vírus não relacionados foram o Papaya lethal yellowing virus (PLYV, gên. Sobemovirus) em *Carica papaya* e Cucumber mosaic virus (CMV, Cucumovirus) em *Musa* sp..

Determinados o título e a especificidade, o anti-soro foi testado na detecção do PepYMV em diferentes hospedeiros (*N. benthamiana*, *N. debneyi* e *C. annuum*).

4. RESULTADOS

4.1. RT-PCR e clonagem em vetor de expressão

Um fragmento de 834 pb, compreendendo o gene da proteína capsidial do Pepper yellow mosaic virus (PepYMV), foi amplificado por RT-PCR. Este fragmento foi purificado, digerido com as enzimas BamHI e XhoI e clonado no vetor de expressão pRSET-A.

4.2. Expressão, extração e purificação da CP recombinante do PepYMV

O antígeno foi produzido em células de *E. coli* (Estirpe BL21::DE3) transformadas com o vetor recombinante (pRSET-A/CP-PepYMV). As diferentes frações da extração da proteína foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 2). Uma banda com a massa aproximada de 36 kDa (correspondendo a CP do PepYMV fusionada à cauda de histidina em sua porção N-terminal) foi observada (Figura 2, linha 4), confirmando a expressão da proteína capsidial. Não foi observada a expressão de nenhuma proteína nas amostras transformadas com o vetor vazio (Figura 2, linhas 5 a 8).

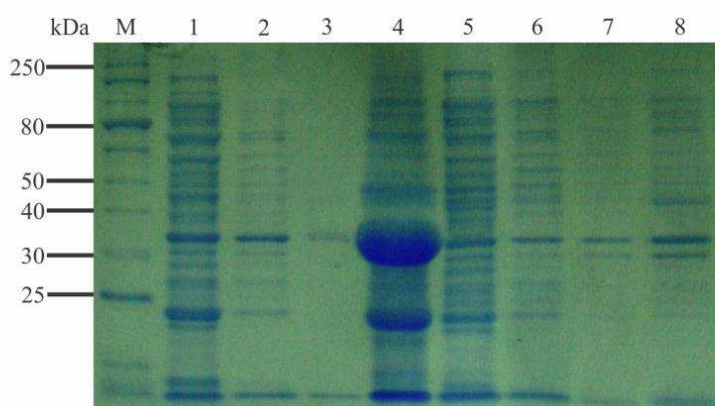


Figura 2. Análise por SDS-PAGE das frações da extração da proteína capsidial do PepYMV expressa em *E. coli* (BL21::DE3). **M**, marcador de massa molecular. **1-3**, frações solúveis de proteínas totais extraídas das células bacterianas transformadas com o vetor recombinante; **4**, fração insolúvel de proteínas totais extraídas de células bacterianas. **5-7**, frações solúveis de proteínas totais extraídas de *E. coli* transformadas com vetor vazio (pRSET-A); **8**, fração insolúvel de proteínas totais extraídas de *E. coli* transformadas com vetor vazio. Foram aplicados 5 μ L de cada amostra.

Foi possível recuperar a proteína expressa de forma bastante eficiente (Figura 3A, linhas 1-4) por meio de cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA. Para a recuperação da forma nativa, a proteína purificada foi dialisada em condições renaturantes e a integridade da proteína foi verificada por SDS-PAGE (Figura 3B). A

proteína purificada e dialisada foi quantificada e o rendimento total foi de 3,57 mg (1,19 mg/mL).

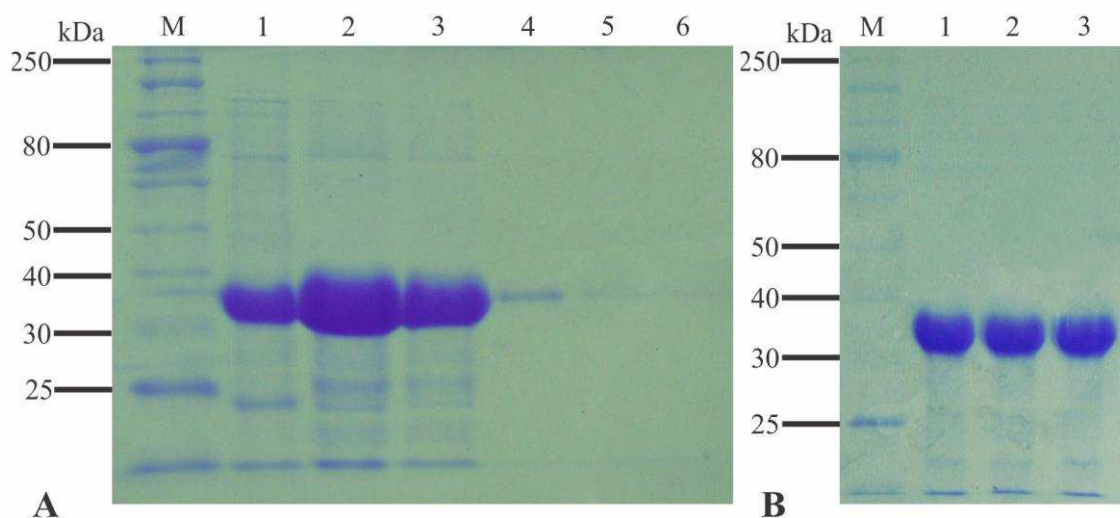


Figura 3. Análise por SDS-PAGE das etapas de purificação e diálise da proteína capsidial do PepYMV expressa em *E. coli* (BL21::DE3). **A.** CP-PepYMV purificada em condições desnaturantes por cromatografia de afinidade. **M**, marcador de massa molecular; **1-6**, frações após o processo de purificação da proteína. **B.** CP-PepYMV após a diálise (**1-3**) em condições renaturantes. **M**, marcador de massa molecular. Foram aplicados 5 μ L de cada amostra.

4.3. Caracterização da CP recombinante

Para confirmar a natureza da proteína expressa e purificada foi realizada análise em espectrômetro de massa. O espectro gerado (Figura 4) foi contrastado com espectros de digestão trípica preditos a partir das sequências de aminoácidos de proteínas virais depositadas no NCBI. A busca identificou com maior score (90) a poliproteína gerada pela tradução do genoma completo do PepYMV (Tabela 2). Avaliando-se apenas os aminoácidos correspondentes à CP foi observado que, dos 278 aminoácidos da proteína, 131 estavam presentes nos peptídeos gerados, correspondendo a uma cobertura de 47,12 % da sequência proteica. Este resultado proporcionou confiabilidade para que a CP fosse utilizada como antígeno.

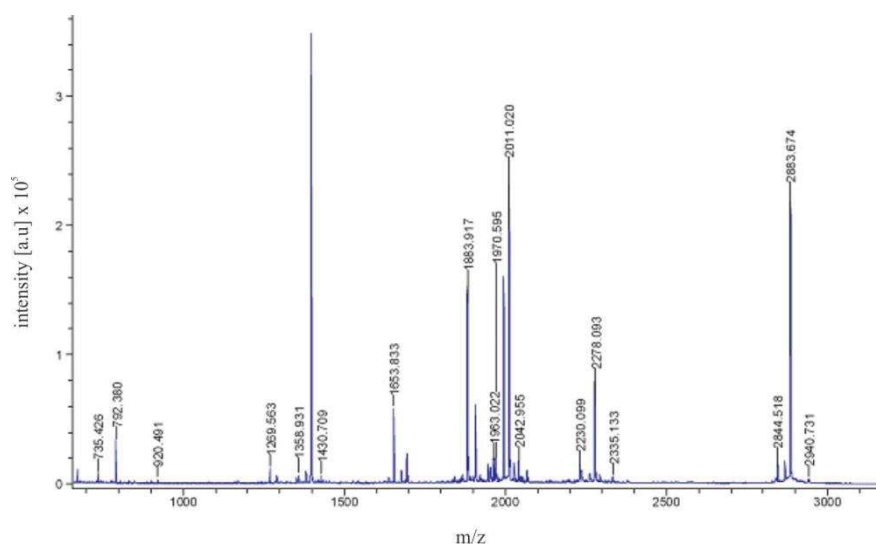


Figura 4. Espectro de massa da banda correspondente à proteína capsidial recombinante. O eixo "y" representa a intensidade do sinal e o eixo "x" representa a razão massa/carga (m/z) dos peptídeos ionizados.

Tabela 2. Resultado da análise em MASCOT MS/MS Ions Search, utilizando-se o banco de dados NCBI nr 20130411.

Identificação	Número de acesso	Score*
Poliproteína (PepYMV)	gi 14280077	90
Proteína capsidial, parcial (PepYMV)	gi 333601431	76
Proteína capsidial, parcial (PepYMV)	gi 333601441	76
Proteína capsidial (PepYMV)	gi 390483319	76
Proteína capsidial, parcial (PepYMV)	gi 333601427	64

*Foram considerados resultados significativos quando o score foi ≥ 73 .

4.4. Produção e avaliação do anti-soro

Para a produção do anti-soro, dois coelhos foram imunizados com a proteína capsidial recombinante. O anti-soro produzido a partir do coelho 1 foi nomeado AS-CPI e o do coelho 2 AS-CPII.

Para avaliar a sensibilidade foi realizado um ensaio de Western blot. Tanto o AS-CPI quanto o AS-CPII foram capazes de reconhecer a proteína na diluição de 1:5000, ou seja quando aplicados 0,119 ng da proteína (Figuras 5A e 5B, linha 5), demonstrando excelente sensibilidade.

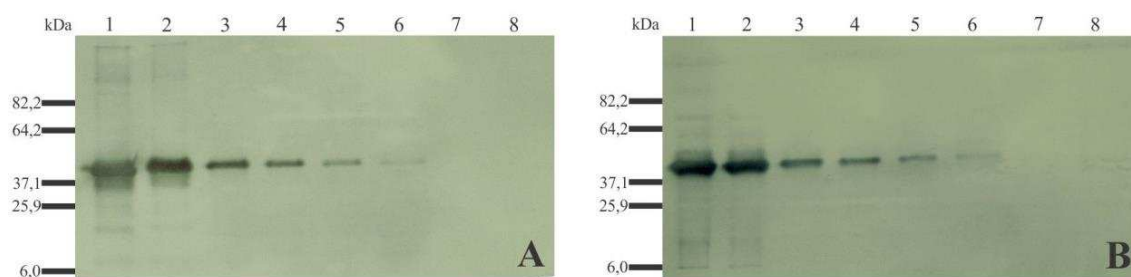


Figura 5. Análise da sensibilidade dos anti-soros (**A**, AS-CPI; **B**, AS-CPII) por Western blot. **1-5**, Cp-PepYMV purificada e dialisada nas diluições 1:50, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000 (concentração inicial: 119 ng/ μ L); **6-8**, frações insolúveis de proteínas extraídas de *E. coli* transformadas com vetor vazio (pRSET-A) nas diluições 1:0, 1:10 e 1:100. O anti-soro foi utilizado na diluição de 1:1000. Foram aplicados 5 μ L de cada amostra.

Para avaliar a capacidade do anti-soro em detectar a CP viral foram utilizados extratos de plantas infectadas e uma preparação de partículas virais concentradas obtida a partir de plantas infectadas com o PepYMV. Os anti-soros foram capazes de identificar a CP do PepYMV tanto a partir de preparações virais concentradas quanto em plantas de *N. debneyi* e *Capsicum annuum* infectadas pelo PepYMV (Figura 6). Foi observado que a proteína recombinante apresenta uma massa de aproximadamente 40 kDa devido à presença da cauda de histidina (Figura 6, linha 2). O minipurificado viral do isolado 19 apresentou três bandas com massas de aproximadamente 30, 36 e 70 kDa (Figura 6, linha 4) e no isolado 3 foram observados duas bandas (~30 e 70 kDa) (Figura 6, linha 5). Nas plantas infectadas foi observado uma banda de aproximadamente 36 kDa (Figura 6, linhas 7 e 9) e em *C. annuum* (Figura 6, linha 9) uma outra banda de 30 kDa. Foi observado que o AS-CPII reage inespecificamente com a planta sadia (Figura 6B, linhas 6 e 8), embora com pequena intensidade.

Para determinar a melhor diluição do anti-soro a ser utilizada na detecção viral em plantas infectadas com o PepYMV foram comparadas três diluições (1:1000, 1:3000 e 1:5000). Essas diluições foram utilizadas para detectar a presença do PepYMV em 6,67 μ L do extrato de plantas de *N. debneyi* infectadas com o isolado 3. Foi verificado que o anti-soro foi bastante sensível, uma vez que foi possível reconhecer a CP do PepYMV mesmo na diluição de 1:5000 (Figura 7, linha 6). Como o AS-CPII reagiu inespecificamente com proteínas da planta, optou-se por testar apenas o AS-CPI.

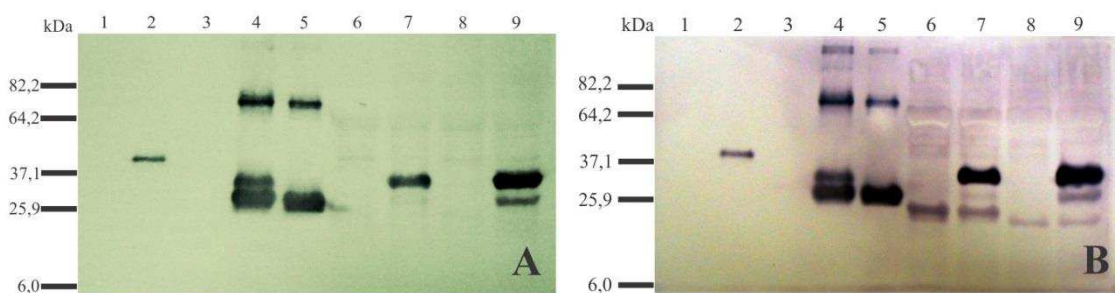


Figura 6. Detecção da proteína capsial do PepYMV com os anti-soros AS-CPI (A) e AS-CPII (B). **1**, proteínas totais extraídas de *E. coli* transformadas com vetor pRSET-A vazio na diluição 1:1000; **2**, proteína capsial recombinante purificada e dialisada; **3**, preparação viral concentrada a partir de plantas de *N. debneyi* sadias; **4**, preparação viral concentrada a partir de plantas de *N. debneyi* infectadas com o PepYMV (isolado 19); **5**, preparação viral concentrada a partir de plantas de *N. debneyi* infectadas com o PepYMV (isolado 3); **6**, proteínas totais de plantas de *N. debneyi* sadias; **7**, proteínas totais de plantas de *N. debneyi* infectadas com o PepYMV (isolado 3); **8**, proteínas totais de plantas de *C. annuum* sadias; **9**, proteínas totais de plantas de *C. annuum* infectadas com o PepYMV (isolado 3). Foram aplicados 5 μ L de cada amostra.

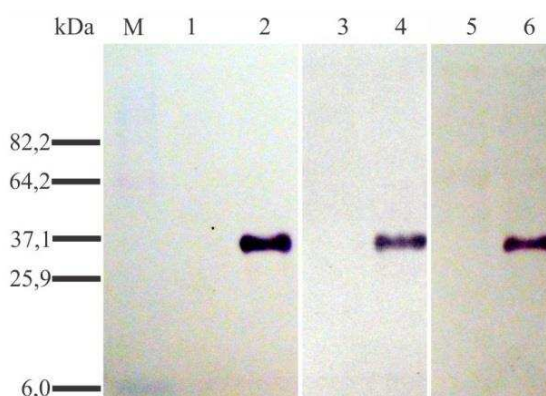


Figura 7. Diluição do anti-soro AS-CPI para detecção do PepYMV a partir de proteínas totais de *N. debneyi*. **1, 3, 5**, extrato de proteínas totais de plantas de *N. debneyi* sadias; **2, 4, 6**, extrato de proteínas totais de plantas de *N. debneyi* infectadas com o PepYMV (isolado 3). **1-2**, diluição do anti-soro a 1:1000. **3-4**, diluição do anti-soro a 1:3000. **5-6**, diluição do anti-soro a 1:5000. Foram aplicados 5 μ L de cada amostra.

Uma vez que a diagnose do PepYMV é realizada principalmente por ELISA indireto, a sensibilidade e a especificidade do anti-soro também foram avaliados por este método.

Para avaliar a capacidade de detecção do anti-soro produzido foram utilizadas plantas de *N. debneyi* infectadas com o isolado 3 do PepYMV e diferentes diluições dos anti-soros. Plantas sadias foram utilizadas como controle negativo. Foi possível detectar o vírus em todas as diluições testadas (Tabela 3).

Tabela 3. Sensibilidade do AS-CPI e AS-CPII na detecção do PepYMV por ELISA indireto. Extrato de proteínas totais de plantas de *N. debneyi* sadias e infectadas com o PepYMV (isolado 3) foram utilizadas no teste. O conjugado goat anti-rabbit IgG-AP (Bio-Rad) foi utilizado como anticorpo secundário na diluição 1:2000.

		Diluição do anti-soro				
		1:500	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000
AS-CPI	infectada	1,213	1,011	0,772	0,491	0,325
	sadia	0,234	0,187	0,154	0,152	0,139
	I/S*	5,184	5,406	5,013	3,230	2,338
AS-CPII	infectada	1,279	1,015	0,745	0,474	0,601
	sadia	0,336	0,250	0,159	0,186	0,150
	I/S	3,807	4,060	4,686	2,548	4,007

*Relação da absorbância da planta infectada (I) em relação à planta sadia (S), OD₄₀₅. Reação considerada positiva quando I/S \geq 2.

Para testar a especificidade do anti-soro na detecção do PepYMV em diferentes hospedeiros foi realizado um ELISA indireto utilizando-se extratos de plantas infectadas com espécies virais relacionadas ou não relacionadas ao PepYMV. O anti-soro produzido foi capaz de detectar as plantas infectadas com o PepYMV em *N. debneyi*, *N. benthamiana* e *C. annuum*. O anti-soro reagiu fracamente com o PVY (Figura 8), confirmando o resultado obtido por Truta et al. (2004) e demonstrando a existência de relacionamento sorológico entre o PepYMV e o PVY. Não foi observada reação com nenhum dos demais vírus testados, confirmando a especificidade dos anti-soro. O anti-soro revelou-se sensível à detecção do PepYMV nos três hospedeiros testados.

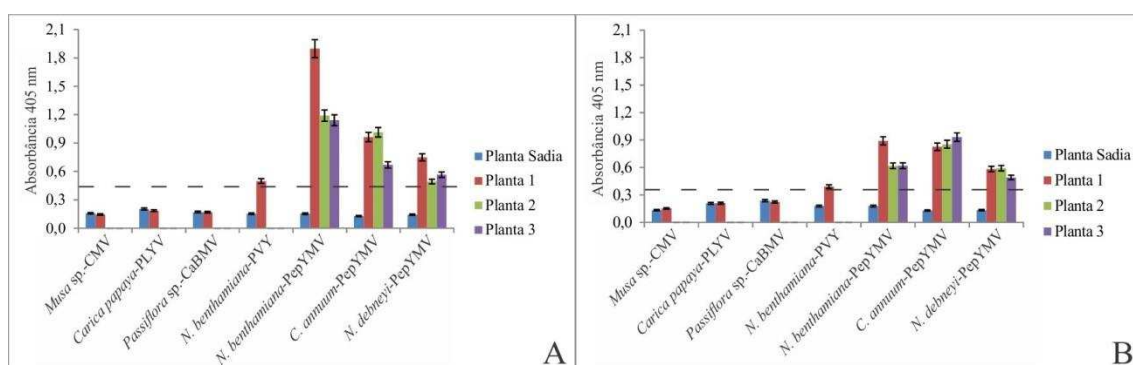


Figura 8. Análise de especificidade e sensibilidade dos anti-soros policlonais por ELISA indireto. **A.** AS-CPI. **B.** AS-CPII). O conjugado (goat-anti rabbit AP) e os anti-soros foram utilizados na diluição 1:2000. As plantas foram consideradas infectadas quando a relação da absorbância da planta infectada em relação à planta sadia foi \geq 2 (a linha pontilhada representa o valor I/S = 2). Os valores representam a média de quatro repetições. As barras indicam o erro padrão da média.

5. DISCUSSÃO

A proteína capsidial recombinante do Pepper yellow mosaic virus (PepYMV) utilizada nesta pesquisa mostrou-se estável, abundante e foi facilmente purificada. A partir da construção engenheirada (pRSET-A/CP-PepYMV), torna-se possível a produção massal desta proteína de forma virtualmente ilimitada, uma vez que a construção encontra-se armazenada em ultracongelador (-80°C), necessitando-se apenas de uma colônia bacteriana para que a proteína seja expressa. A produção de anti-soros específicos contra proteínas recombinantes já foi testada com sucesso em diferentes patossistemas (Helias et al., 2003; Barbieri et al., 2004; Radaelli et al., 2008; Gulati-Sakhuja et al., 2009; Basso et al., 2010; Liu et al., 2011).

Durante a extração da proteína, bem como no teste de sensibilidade por diluição do anti-soro, foi observada a presença de uma banda persistente com a mesma massa da CP-PepYMV recombinante em proteínas extraídas de bactérias transformadas tanto com a construção recombinante (pRSET-A/CP-PepYMV) quanto com o vetor vazio (pRSET-A). Uma possível explicação para esse fato seria tratar-se de uma proteína da bactéria que tenha epítomos e massa similar à CP-PepYMV, e conseqüentemente pode ter reagido em menor intensidade com anti-soro. Essa reação aconteceu apenas com o extrato de proteínas totais sem diluição. Já na primeira diluição (1:10) não foi observada reação alguma. Carvalho et al. (2013), utilizando o mesmo vetor e estirpe de *E. coli* (pRSET e *E. coli* BL21::DE3), observaram uma banda de aproximadamente 36 kDa tanto na fração solúvel quanto na fração insolúvel do extrato de proteínas de bactérias transformadas com o vetor vazio. Outros autores que utilizaram a *E. coli* BL21::DE3 para expressão de proteínas recombinantes em diferentes vetores também observaram a presença de uma banda de aproximadamente 36 kDa no extrato de proteínas totais onde a expressão não foi induzida ou em bactérias transformadas com vetores vazios (Xu et al., 2006; El-Attar et al., 2009; Sherpa et al., 2012; Abdel-Salam et al., 2014).

No teste de detecção da CP a partir de partículas virais e de plantas infectadas, observou-se que o minipurificado viral do isolado 19 apresentou três bandas, enquanto o do isolado 3 apresentou duas bandas. Podemos inferir que a banda de aproximadamente 30 kDa corresponde à CP do PepYMV sem as porções N- e C-terminal, que normalmente são perdidas durante o processo de purificação. Isso ocorre devido ao fato dessas porções ficarem externas ao capsídeo (Shukla et al., 1988; Shukla et al., 1991; Adams et al., 2012). A banda de aproximadamente 36 kDa corresponde à proteína em

sua conformação íntegra, e a banda de aproximadamente 70 kDa corresponde à proteína na forma de dímeros (Shukla et al., 1988; Hong et al., 1995). A mesma inferência pode ser feita para a banda de aproximadamente 30 kDa do extrato de plantas de *C. annuum* infectadas (Figura 6A e 6B, linha 9), sendo ela correspondente à forma da CP sem as porções N- e C-terminal.

Também foi observado que o anti-soro AS-CP^{II} se comportou de forma inespecífica, apresentando reação (embora com intensidade fraca) nas plantas sadias. Esta reação pode ter acontecido por causa da presença da cauda de histidina presente na CP recombinante, que pode ter se comportado como epítopo. A alta reatividade deste anticorpo com proteínas de plantas, pode ter ocasionado a reação cruzada. Uma possível explicação para esta reação ter ocorrido apenas com o AS-CP^{II} é que para a produção deste foi utilizado o dobro da quantidade de imunógeno.

Os anti-soros produzidos apresentaram um ótimo título no ELISA indireto, permanecendo sensíveis a uma diluição de até 10.000 vezes. Este valor foi superior ao título obtido por Rabelo Filho et al. (2005) e Carvalho et al. (2013). Com exceção do PVY, que é sorologicamente relacionado com o PepYMV (Truta et al., 2004), os anti-soros não apresentaram nenhum tipo de reação cruzada com os vírus testados. No entanto, foi observado que o AS-CP^I se mostrou mais sensível que o AS-CP^{II}. Isso já era esperado, pois o AS-CP^{II} apresentou reação com proteínas de plantas no Western blot.

Barbieri et al. (2004) demonstraram que para o Watermelon mosaic virus (WMV) o anti-soro produzido a partir da CP recombinante foi mais específico que o anti-soro produzido a partir de partículas virais. Radaelli et al. (2008) produziram um anti-soro altamente sensível e específico a partir da CP recombinante do Grapevine leafroll-associated virus 2, onde não foram observadas reações cruzadas com proteínas da planta. A produção de anti-soro a partir da CP recombinante, além de torná-lo mais específico, pode ser utilizada em casos em que a concentração de partículas virais necessária à produção de anti-soro não seja obtida (Carvalho et al., 2013; Koohapitagtam e Nualsri, 2013).

Os anti-soros produzidos neste estudo demonstraram boa sensibilidade em ambos os sistemas testados (ELISA e Western blot), podendo ser utilizados para diagnose. Além do uso na diagnose, os anti-soros poderão ser utilizados também em estudos de morfologia de partículas e de interação entre a CP e outras proteínas virais, do hospedeiro ou do vetor.

6. CONCLUSÕES

Os anti-soros produzidos a partir da CP-PepYMV recombinante se mostraram sensíveis à detecção viral, tanto por Western blot quanto pelo teste de ELISA indireto. Além disso: foram capazes de detectar o PepYMV em extratos de diferentes espécies de plantas por ELISA indireto e Western blot; reconheceram com especificidade tanto a CP recombinante do PepYMV quanto a própria partícula viral; reagiram positivamente, embora em menor intensidade, com o PVY; o AS-CPI não reagiu com plantas saudáveis. Os anti-soros podem ser utilizados para diagnose do PepYMV e para estudos de interação vírus-hospedeiro ou vírus-vetor.

7. LITERATURA CITADA

- Abdel-Salam, A.M., El-Attar, A.K., Gambley, C.F., 2014. Production of polyclonal antisera to a recombinant coat protein of Potato virus Y expressed in *Escherichia coli* and its application for immunodiagnosis. *International Journal of Virology* 10, 1-16.
- Adams, M.J., Zerbini, F.M., French, R., Rabenstein, F., Stenger, D.C., Valkonen, J.P.T., 2012. Family Potyviridae, in: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus taxonomy - classification and nomenclature of viruses*. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 1069-1089.
- Ala-Poikela, M., Goytia, E., Haikonen, T., Rajamäki, M.L., Valkonen, J.P.T., 2011. Helper component proteinase of the genus Potyvirus is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. *Journal of Virology* 85, 6784-6794.
- Alam, C.M., George, B., Sharfuddin, C., Jain, S.K., Chakraborty, S., 2013. Occurrence and analysis of imperfect microsatellites in diverse potyvirus genomes. *Gene* 521, 238-244.
- Alkowni, R., Zhang, Y.P., Rowhani, A., Uyemoto, J.K., Minafra, A., 2011. Biological, molecular, and serological studies of a novel strain of Grapevine leafroll-associated virus 2. *Virus Genes* 43, 102-110.
- Allison, R., Johnston, R.E., Dougherty, W.G., 1986. The nucleotide sequence of the coding region of Tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology* 154, 9-20.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., Vance, V.B., 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 13079-13084.
- Andersen, K., Johansen, I.E., 1998. A single conserved amino acid in the coat protein gene of Pea seed-borne mosaic potyvirus modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* 241, 304-311.
- Arbatova, J., Lehto, K., Pehu, E., Pehu, T., 1998. Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *Journal of General Virology* 79, 2319-2323.
- Arogundade, O., Balogun, O.S., Kareem, K.T., 2012. Occurrence and distribution of pepper veinal mottle virus and cucumber mosaic virus in pepper in Ibadan, Nigeria. *Virology Journal* 9, 79.
- Balzer, S., Kucharova, V., Megerle, J., Lale, R., Brautaset, T., Valla, S., 2013. A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 12, 26.

- Barbieri, M.R., Carvalho, M.G., Zambolim, E.M., Zerbini, F.M., 2004. Expressão em *Escherichia coli* da proteína capsidial do Watermelon mosaic virus e produção de anti-soro. *Fitopatologia Brasileira* 29, 215-219.
- Basso, J., Dallaire, P., Charest, P.J., Devantier, Y., Laliberte, J.F., 1994. Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. *Journal of General Virology* 75, 3157-3165.
- Basso, M.F., 2010. Desenvolvimento de ferramentas sorológicas e moleculares para identificação de vírus em videiras e cochonilhas, alterações fisiológicas e na qualidade enológica da uva de videiras infectadas. Dissertação MS, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR.
- Basso, M.F., Fajardo, T.V.M., Eiras, M., Ayub, R.A., Nickel, O., 2010. Produção de antissoro policlonal utilizando a proteína capsidial recombinante do Rupestris stem pitting-associated virus. *Ciência Rural* 40, 2385-2388.
- Bock, K.R., Conti, M., 1974. Cowpea aphid-borne mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* 134.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R.n., Bergervoet, J., Tomlinson, J., Mumford, R., 2014. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research* 186, 20-31.
- Boonham, N., Walsh, K., Smith, P., Madagan, K., Graham, I., Barker, I., 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *Journal of Virological Methods* 108, 181-187.
- Calegario, R.F., 2009. Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae). Tese DS, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- Calvo, M., Malinowski, T., García, J.A., 2014. Single amino acid changes in the 6k1-ci region can promote the alternative adaptation of Prunus- and Nicotiana-propagated Plum pox virus c isolates to either host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 136-149.
- Carrington, J.C., Dougherty, W.G., 1988. A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for Tobacco etch virus polyprotein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85, 3391-3395.
- Carrington, J.C., Freed, D.D., Oh, C.S., 1990. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. *EMBO Journal* 9, 1347-1353.
- Carvalho, S.L., Silva, F.N., Zanardo, L.G., Almeida, A.M.R., Zerbini, F.M., Carvalho, C.M., 2013. Production of polyclonal antiserum against Cowpea mild mottle virus coat protein and its application in virus detection. *Tropical Plant Pathology* 38, 49-54.
- Chung, B.Y.W., Miller, W.A., Atkins, J.F., Firth, A.E., 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 105, 5897-5902.

- Clark, M.F., Lister, R.M., Bar-Joseph, M., 1986. ELISA techniques. *Methods in Enzymology* 118, 742-766.
- Colinet, D., Kummert, J., Lepoivre, P., 1994. The complete nucleotide sequences of the coat protein cistron and the 3' non-coding region of a newly-identified potyvirus infecting sweetpotato, as compared to those of sweetpotato feathery mottle virus. *Archives of Virology* 139, 327-336.
- Corchero, J.L., Gasser, B., Resina, D., Smith, W., Parrilli, E., Vázquez, F., Abasolo, I., Giuliani, M., Jäntti, J., Ferrer, P., Saloheimo, M., Mattanovich, D., Schwartz Jr, S., Tutino, M.L., Villaverde, A., 2013. Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics. *Biotechnology Advances* 31, 140-153.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C., Carrington, J.C., 1995. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7, 549-559.
- Cunha, L.C.V., Resende, R.O., Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., 2004. Distinct features of Pepper yellow mosaic virus isolates from tomato and sweetpepper. *Fitopatologia Brasileira* 29, 663-667.
- Daros, J.A., Carrington, J.C., 1997. RNA binding activity of N1a proteinase of tobacco etch potyvirus. *Virology* 237, 327-336.
- Dianese, E.C., Resende, R.O., Inoue-Nagata, A.K., 2008. High incidence of Pepper yellow mosaic virus in tomatoes in productive areas of Brazil's Federal District. *Tropical Plant Pathology* 33, 67-68.
- DiPiero, R.M., Rezende, J.A.M., Yuki, V.A., Pascholati, S.F., Delfino, M.A., 2006. Transmissão do Passionfruit woodiness virus por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. *Neotropical Entomology* 35, 139-140.
- Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A., Carrington, J.C., 1995. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206, 1007-1016.
- Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G., Carrington, J.C., 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO Journal* 13, 1482-1491.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C., Voinnet, O., 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16, 1235-1250.
- Ebhardt, H.A., Thi, E.P., Wang, M.B., Unrau, P.J., 2005. Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 102, 13398-13403.
- El-Attar, A.K., Riad, B.Y., Saad, A., Soliman, A.M., Mazyad, H.M., 2009. Expression of the coat protein gene of Potato leafroll virus in *Escherichia coli* and development of polyclonal antibodies against recombinant coat protein. *Arab Journal of Biotechnology* 13, 85-98.

- Farinelli, L., Malnoe, P., Collet, G.F., 1992. Heterologous encapsidation of Potato Virus Y strain O (PVY^O) with the transgenic coat protein of PVY strain N (PVY^N) in *Solanum Tuberosum* cv. Bintje. *Nature Biotechnology* 10, 1020-1025.
- Gallie, D.R., Tanguay, R.L., Leathers, V., 1995. The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene* 165, 233-238.
- Gibbs, A., Ohshima, K., 2010. Potyviruses and the digital revolution. *Annual Review of Phytopathology* 48, 205-223.
- Gillett, J.M., Morrissey, S.M., Ramsdell, D.C., 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease* 70, 722-726.
- Grangeon, R., Jiang, J., Wan, J., Agbeci, M., Zheng, H., Laliberté, J.F., 2013. 6K2-induced vesicles can move cell to cell during Turnip mosaic virus infection. *Frontiers in Virology* 4, 1-10.
- Guaragna, M.A., Lamborn, J., Groth-Helms, D., Juszczak, S., Mollov, D., Lockhart, B., van Schadewijk, T., Hammond, J., Jordan, R., 2013. First report of Nerine yellow stripe virus in *Amaryllis* in the United States. *Plant Disease* 97, 1389-1389.
- Gulati-Sakhuja, A., Sears, J.L., Nunez, A., Liu, H.Y., 2009. Production of polyclonal antibodies against *Pelargonium zonate spot virus* coat protein expressed in *Escherichia coli* and application for immunodiagnosis. *Journal of Virological Methods* 160, 29-37.
- Hajimorad, M.R., Ding, X.S., Flasiński, S., Mahajan, S., Graff, E., Haldeman-Cahill, R., Carrington, J.C., Cassidy, B.G., 1996. NIa and NIb of peanut stripe potyvirus are present in the nucleus of infected cells, but do not form inclusions. *Virology* 224, 368-379.
- Haldeman-Cahill, R., Daros, J.A., Carrington, J.C., 1998. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the Tobacco etch virus genome. *Journal of Virology* 72, 4072-4079.
- Hayashi, E.A.I., Boari, A.J., Carvalho, T.P., 2013. Detecção de potyvírus em bucha (*Luffa cylindrica* (L.) Roem.) no estado do Pará. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.
- Helias, V., Jacquot, E., Guillet, M., Le Hingrat, Y., Giblot-Ducray, D., 2003. Production of recombinant Potato mop-top virus coat protein in *Escherichia coli* and generation of antisera recognising native virus protein. *Journal of Virological Methods* 110, 91-97.
- Hong, Y., Hunt, A.G., 1996. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 226, 146-151.
- Hong, Y., Levay, K., Murphy, J.F., Klein, P.G., Shaw, J.G., Hunt, A.G., 1995. A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology* 214, 159-166.

- Hull, R., 2002. *Matthew's Plant Virology*, 4 ed. Academic Press, Londres, Inglaterra.
- ICTV, 2014. International Committee on Taxonomy of Viruses. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=27>. Acessado em: 03/02/2014.
- 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., 2002. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. *Archives of Virology* 147, 849-855.
- Juhasz, A.C.P., da Silva, D.J.H., Zerbini, F.M., Carneiro, P.C.S., Soares, B.O., Cruz, C.D., 2008. Resistance genetic basis of a wild tomato access to pepper yellow mosaic virus. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 43, 713-720.
- Kasschau, K.D., Carrington, J.C., 1995. Requirement of HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. *Virology* 209, 268-273.
- Kasschau, K.D., Cronin, S., Carrington, J.C., 1997. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228, 251-262.
- Kaur, C., Kumar, S., Snehi, S.K., Raj, S.K., 2013. Molecular detection of Jasmine potyvirus associated with yellow mosaic symptoms on *Jasminum sambac* L. in India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46, 1102-1107.
- Kazinczi, G., Kovacs, J., Takacs, A.P., Horvath, J., Gaborjanyi, R., 2003. 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* 68, 555-559.
- Khoshkhatti, N., Habibi Koohi, M., Mosahebi, G., 2009. Occurrence and distribution of Potato virus Y strain N (PVY(N)) on celery in Iran. *Communications in Agricultural Applied Biological Sciences* 74, 849-852.
- Klein, P.G., Klein, R.R., Rodríguez-Cerezo, E., Hunt, A.G., Shaw, J.G., 1994. Mutational analysis of the Tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204, 759-769.
- Koohapitagtam, M., Nualsri, C., 2013. Production of polyclonal antibodies specific to the recombinant coat protein of Blackeye cowpea mosaic virus and its use in disease detection. *Kasetsart Journal: Natural Science* 47, 603-613.
- Laín, S., Martín, M.T., Riechmann, J.L., García, J.A., 1991. 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* 65, 1-6.
- Lalić, J., Agudelo-Romero, P., Carrasco, P., Elena, S.F., 2010. Adaptation of tobacco etch potyvirus to a susceptible ecotype of *Arabidopsis thaliana* capacitates it for systemic infection of resistant ecotypes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 1997-2007.

- Langham, M.A.C., 2010. Vírus fitopatogênicos, in: Trigiano, R.N., Windham, M.T., Windham, A.S. (Eds.) Fitopatologia: Conceitos e exercícios de laboratório, 2^a ed. Artmed, Porto Alegre, p. 576.
- Lellis, A.D., Kasschau, K.D., Whitham, S.A., Carrington, J.C., 2002. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Current Biology* 12, 1046-1051.
- Lima, M.F., Melo, W.F., Vale, L.S.R., Morgado, H.S., Inoue-Nagata, K., Reifschneider, F.J.B., 2010. Detecção e incidência de vírus em 89 acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) no Município de Ceres, Goiás. *Horticultura Brasileira* 28, S1187-S1194.
- Liu, Q., Ku, Z., Cai, Y., Sun, B., Leng, Q., Huang, Z., 2011. Detection, characterization and quantification of Coxsackievirus A16 using polyclonal 34 antibodies against recombinant capsid subunit proteins. *Journal of Virological Methods* 173, 115-120.
- Lombardi, R., 2010. Clonagem e purificação da proteína capsidial do Banana streak virus e produção de antissoro policlonal a partir de preparações purificadas do vírus. Instituto Biológico, São Paulo, SP.
- López-Moya, J.J., García, J.A., 2008. Potyviruses. *Encyclopedia of Virology* (3^a ed). Academic Press, Oxford, UK, pp. 313-322.
- Lucinda, N., da Rocha, W.B., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., 2012. Complete genome sequence of Pepper yellow mosaic virus, a potyvirus, occurring in Brazil. *Archives of Virology* 157, 1397-1401.
- Madan, N., Sundar Raj, N., Farook, M.A., Vimal, S., Venkatesan, C., Abdul Majeed, S., Nambi, K.S.N., Sahul Hameed, A.S., 2013. Partial cloning and production of polyclonal antiserum against recombinant capsid protein of Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) and its application for diagnostics in penaeid shrimp. *Process Biochemistry* 48, 1893-1898.
- Mahajan, S., Dolja, V.V., Carrington, J.C., 1996. Roles of the sequence encoding Tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: Requirements for the translation process and a cis-active element. *Journal of Virology* 70, 4370-4379.
- Mallik, I., Anderson, N.R., Gudmestad, N.C., 2012. Detection and differentiation of Potato Virus Y strains from potato using immunocapture multiplex RT-PCR. *American Journal of Potato Research* 89.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Bartel, D., Vance, V.B., Bowman, L.H., 2002. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99, 15228-15233.
- Merits, A., Guo, D., Järvekülg, L., Saarma, M., 1999. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato a potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* 263, 15-22.

- Moura, M.F., Marubayashi, J.M., Mituti, T., Gioria, R., Kobori, R.F., Pavan, M.A., Krause-Sakate, R., 2012a. Análise comparativa da região codificadora para a proteína capsidial de isolados de PepYMV e PVY coletados em pimentão. *Summa Phytopathologica* 38, 93-96.
- Moura, M.F., Mituti, T., Marubayashi, J.M., Gioria, R., Kobori, R.F., Pavan, M.A., Silva, N., Krause-Sakate, R., 2011. A classification of Pepper yellow mosaic virus isolates into pathotypes. *European Journal of Plant Pathology* 131, 549-552.
- Moura, M.F., Nozaki, D.N., Ferreira, F.Z., Pavan, M.A., Krause-Sakate, R., 2012b. Ocorrência de infecção viral mista em pimentão no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 38, 170-170.
- Murphy, J.F., Klein, P.G., Hunt, A.G., Shaw, J.G., 1996. Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* 220, 535-538.
- Nair, S., 2012. Towards the analysis of Potyvirus VPg Interacting Protein (PVIP) gene expression in response to potyvirus infection. Tese PhD, Auckland University of Technology, Auckland, Nova Zelândia.
- Nascimento, A.A.C., Espreafico, E.M., Larson, M.L.P., MONESI, N., Martinez-Rossi, N.M., Rodrigues, V., Patussi, E.V., Graminha, M.A.S., Squina, F.M., Sousa, J.F., Ruler, R., Valente, V., 2003. Tecnologia do DNA recombinante. <http://www.biocelfmrp.com.br/sites/default/files/apostilatd_2005.pdf>. Acessado em: 19/02/2014.
- Nicolas, O., Dunnington, S.W., Gotow, L.F., Pirone, T.P., Hellmann, G.M., 1997. Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco. *Virology* 237, 452-459.
- Niepel, M., Gallie, D.R., 1999. Identification and characterization of the functional elements within the Tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of Virology* 73, 9080-9088.
- Noueiry, A.O., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L., 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 76, 925-932.
- Quezado-Duval, A.M., Inoue-Nagata, A.K., Reis, A., Pinheiro, J.B., Lopes, C.A., Araújo, E.C., Fontenelle, M.R., Costa, J.R., Guimarães, C.M.N., Rossato, M., Becker, W.F., Costa, H., Ferreira, M.A.S.V., Destéfano, S.A.L., 2013. Levantamento de doenças e mosca branca em tomateiro em regiões produtoras no Brasil. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF.
- Rabelo Filho, F.A.C., Lima, J.A.A., Ramos, N.F., Gonçalves, M.F.B., Carvalho, K.F., 2005. Produção de anti-soro para o vírus do mosaico da abóbora mediante imunização oral de coelhos. *Revista Ciência Agronômica* 36, 344-347.
- Radaelli, P., Fajardo, T.V.M., Nickel, O., Eiras, M., Pio-Ribeiro, G., 2008. Production of polyclonal antisera using recombinant coat proteins of Grapevine leafroll-associated virus 2 and Grapevine virus B. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43, 1405-1411.

- Rajamäki, M.L., Kelloniemi, J., Alminaitė, A., Kekkarainen, T., Rabenstein, F., Valkonen, J.P.T., 2005. A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. *Virology* 342, 88-101.
- Rajamäki, M.L., Valkonen, J.P.T., 2009. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like Potato virus A in *Nicotiana* species. *Plant Cell* 21, 2485-2502.
- Restrepo-Hartwig, M.A., Carrington, J.C., 1994. The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *Journal of Virology* 68, 2388-2397.
- Rezende, J.A.M., Kitajima, E.W., 2012. Procedimentos para identificação de fitovírus, in: Zambolim, L., Jesus Júnior, W.C., Pereira, O.L. (Eds.) *O Essencial da Fitopatologia. Vol. 2 - Agentes Causais*. Editora UFV, Viçosa, MG, pp. 287-304.
- Riechmann, J.L., Lain, S., Garcia, J.A., 1989. The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of Plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* 70, 2785-2789.
- Robert, Y., Woodford, J.A.T., Bourdin-Ducray, D.G., 2000. Some epidemiological approaches to the control of aphid-borne virus diseases in seed potato crops in northern Europe. *Virus Research* 71, 33-47.
- Rodriguez-Cerezo, E., Ammar, E.D., Pirone, T.P., Shaw, J.G., 1993. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology* 74, 1945-1949.
- Rohožková, J., Navrátil, M., 2011. P1 peptidase – a mysterious protein of family Potyviridae. *Journal of Biosciences* 36, 189-200.
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L., Lucas, W.J., 1997. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237, 283-295.
- Romeiro, R.S., 2001. *Métodos em bacteriologia de plantas*. Editora UFV, Viçosa, MG.
- Romero, A., Blanco-Urgoiti, B., Soto, M.J., Fereres, A., Ponz, F., 2001. Characterization of typical pepper isolates of PVY reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. *Virus Research* 79, 71-80.
- Ruiz-Ferrer, V., Boskovic, J., Alfonso, C., Rivas, G., Llorca, O., López-Abella, D., López-Moya, J.J., 2005. Structural analysis of Tobacco etch potyvirus HC-Pro oligomers involved in aphid transmission. *Journal of Virology* 79, 3758-3765.
- Sambrook, J., Russel, D., 2001. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E., Carrington, J.C., 1997. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO Journal* 16, 4049-4059.

- Sherpa, A.R., Hallan, V., Zaid, A.A., 2012. In vitro expression and production of antibody against Cymbidium mosaic virus coat protein. *Indian Journal of Virology* 23, 46-49.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M., 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* 1, 2856-2860.
- Shukla, D.D., Frenkel, M.J., Ward, C.W., 1991. Structure and function of the Potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13, 178-191.
- Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H., Ward, C.W., 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology* 69, 1497-1508.
- Simón-Buela, L., Guo, H.S., García, J.A., 1997. Cap-independent leaky scanning as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. *Journal of General Virology* 78, 2691-2699.
- Spadotti, D.M.A., Buriolla, J.E., Rezende, J.A.M., Souza, V.C., 2013. The wild type of *Momordica charantia* is not infected by potyviruses that cause disease in papaya and cucurbit crops. *Tropical Plant Pathology* 38, 447-451.
- Taskin, H., Baktemur, G., Kurul, M., Büyükalaca, S., 2013. Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR. *The Scientific World Journal*, 5.
- Teycheney, P.Y., Aziz, R., Dinant, S., Slanki, K., Tourneur, C., Balzs, E., Jacquemond, M., Tepfer, M., 2000. Synthesis of (-) strand RNA from the 3' untranslated region of plant viral genomes expressed in transgenic plants upon infection with related viruses. *Journal of General Virology* 81, 1121-1126.
- 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., 2004. Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. *Fitopatologia Brasileira* 29, 160-168.
- Urcuqui-Inchima, S., Maia, I.G., Arruda, P., Haenni, A.L., Bernardi, F., 2000. Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology* 268, 104-111.
- Uzest, M., Drucker, M., Hébrard, E., Garzo, E., Candresse, T., Fereres, A., Blanc, S., 2007. A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104, 17959-17964.
- Verchot, J., Carrington, J.C., 1995. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology* 69, 3668-3674.

- Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N., Miller, W.A., 2012. Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathogens* 8, e1002639.
- Waegeman, H., De Lausnay, S., Beauprez, J., Maertens, J., De Mey, M., Soetaert, W., 2013. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* K12 through metabolic engineering. *New Biotechnology* 30, 255-261.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C., Wang, A., 2010. Formation of complexes at plasmodesmata for Potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens* 6, e1000962.
- Wen, R.H., Hajimorad, M.R., 2010. Mutational analysis of the putative pipo of Soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* 400, 1-7.
- Xu, Z.Y., Hong, N., Xing, B., Wang, G.P., 2006. Partial molecular characterization of a chinese isolate of Grapevine leafroll-associated virus 2 and production of antisera to recombinant viral proteins. *Journal of Plant Pathogens* 88, 89-94.
- Zambolim, E.M., Costa, H., Capucho, A.S., Ávila, A.C., Inoue-Nagata, A.K., Kitajima, E.W., 2004. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira* 29, 325-327.
- Zerbini, F.M., Carvalho, M.G., Zambolim, E.M., 2002. *Introdução à virologia vegetal*. Editora UFV, Viçosa, MG.
- Zerbini, F.M., Zambolim, E.M., 1999. A família Potyviridae. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 7, 1-66.
- Zhang, M., Chen, W., Chen, X., Zhang, Y.P., Lin, X., Wu, Z., Li, M., 2013. Multiplex immunoassays of plant viruses based on functionalized upconversion nanoparticles coupled with immunomagnetic separation. *Journal of Nanomaterials* 2013, 8.