

DANIELLE RIBEIRO DE BARROS

**CLONAGEM E EXPRESSÃO *IN VITRO* DA ORF AC5 DO *Tomato rugose mosaic virus*
(ToRMV) E PRODUÇÃO DE ANTI-SORO**

**Tese 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
2003**

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a meu pai, Nilton de Barros Junior e Talita Cristina Esteves de Barros por todo apoio, por me ensinarem o valor de sempre estar buscando o conhecimento e carinho;

Agradeço ao meu orientador Murilo Zerbini por acreditar no meu trabalho, pela amizade e por toda a força e compreensão em todos os momentos da realização deste trabalho;

Aos amigos Giselle, Ricardo, Renata, Lana, Simone, Daniela, Verônica, Miri, Cor, Renatinha, Liliane, Gustavo, Leonardo e Ricardo Brainer por não me deixarem, em hipótese alguma, desistir da realização deste sonho;

A amiga Leila Aparecida Lopes por tornar este caminho mais tranquilo;

Aos companheiros de laboratório Alison, Ana Raquel, Ana Veronica, Adriana, Glória, Renata e principalmente a Eduardo, Poliane e Raquel por estarem sempre me ajudando a solucionar questões que apareceram no caminho;

Aos meus Conselheiros, Prof. Murilo de Carvalho e Prof Kiyoshi Matsouka, por toda atenção, dedicação e carinho;

A Eunize Maciel, por desde o início, me incentivar a ingressar no mestrado;

Aos funcionários do DFP, principalmente ao Fizinho, Délio e Joaquim, que foram de grande ajuda e atenção;

Gostaria de agradecer a todos os professores do Departamento de Fitopatologia da UFV e a CAPES pelo suporte financeiro do projeto;

E por fim, a todos aqueles que dê alguma forma estiveram comigo, auxiliando e tornando esta jornada mais tranquila;

Obrigado a todos.

BIOGRAFIA

DANIELLE RIBEIRO DE BARROS, é natural do Rio de Janeiro, RJ, nascida a 16 de outubro de 1972, filha de Nilton de Barros Junior e Marilena Ribeiro de Barros. Concluiu o primeiro grau no colegio municipal Albert Einstein em 1987, e o segundo grau na Escola Técnica Federal do Rio de Janeiro em 1994, ambos em seu município natal.

Em 1996 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, onde se graduou como Engenheiro Agrônomo em março de 2001.

Em abril do mesmo ano ingressou no curso de mestrado do programa de Pós-Graduação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

Resumo	vii
Abstract	ix
Introdução e Revisão de Literatura.....	1
Literatura Citada.....	9
Clonagem e expressão <i>in vitro</i> da ORF AC5 do <i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV) e produção de anti-soro	12
Resumo	13
Abstract.....	14
Introdução.....	14
Material e métodos	16
Análise filogenética da ORF AC5 de diferentes espécies de begomovírus	16
Obtenção e manutenção do isolado viral	16
Clonagem da ORF AC5 do ToRMV em vetor de expressão em <i>E. coli</i>	16
Expressão da proteína AC5 em <i>E. coli</i> BL21:: DE3	17
Produção de anti-soro	18
Resultados.....	18
Análise filogenética da ORF AC5 de diferentes espécies de begomovírus	18
Clonagem da ORF AC5 do ToRMV em vetor de expressão em <i>E.coli</i>	19
Expressão da proteína AC5 em <i>E. coli</i> BL21:: DE3	19
Produção de anti-soro	19
Discussão	20

Literatura Citada.....	21
Apêndice.....	28

RESUMO

BARROS, D.R., M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2003. **Clonagem e expressão *in vitro* da ORF AC5 do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e produção de anti-soro.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Junior. Conselheiros: Murilo Geraldo Carvalho e Kiyoshi Matsuoka.

O *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) é um begomovírus descrito como parte de um complexo viral causando mosaico dourado e deformação (rugosidade) foliar em tomateiro na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. Os dois componentes genômicos encontram-se completamente sequenciados, e a análise das seqüências de nucleotídeos do DNA-A indicou a presença de uma ORF adicional denominada AC5, presente apenas em algumas espécies de begomovírus. Esta ORF está quase totalmente inserida na seqüência do gene *cp*, porém em orientação inversa e em outra fase de leitura. A ORF AC5 do ToRMV tem o potencial de codificar uma proteína com aproximadamente 27 kDa. A função do produto potencial da ORF AC5 foi estudada apenas para o *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV), não sendo encontrado nenhum indício da expressão da ORF. Entretanto, a seqüência de aminoácidos da proteína potencialmente codificada pela ORF AC5 do ToRMV possui apenas 41% de identidade com a AC5 do WmCSV. É possível que a ORF AC5 do ToRMV seja expressa, e que a proteína desempenhe alguma função no ciclo de infecção viral. Este trabalho teve por objetivo a clonagem e a expressão *in vitro* da ORF AC5 do ToRMV e a produção de anti-soro específico. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados para a amplificação da região codificadora da ORF AC5 via PCR. O fragmento amplificado foi clonado no vetor de expressão pRSET-C. Plasmídeos recombinantes foram utilizados para a expressão da proteína

AC5 em *E. coli* BL21::DE3. A proteína foi purificada a partir das células de *E. coli* e utilizada para a produção de anti-soro policlonal em coelhos. A especificidade do anti-soro policlonal obtido foi confirmada por *Western blot*. Esse anti-soro poderá ser utilizado em ensaios de imunolocalização da proteína AC5 em tecidos infectados pelo ToRMV.

ABSTRACT

BARROS, D.R., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2003. **Cloning and *in vitro* expression of the AC5 ORF of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), and production of specific antiserum.** Advisor: Francisco Murilo Zerbini Junior. Committee Members: Murilo Geraldo Carvalho and Kiyoshi Matsuoka.

Tomato rugose mosaic virus (ToRMV) is a typical bipartite begomovirus described as part of a viral complex inducing golden mosaic and leaf distortion (rugosity) in tomatoes at Triângulo Mineiro, Minas Gerais. Both genomic components have been completely sequenced, and the DNA-A sequence analysis indicated the presence of an additional open reading frame (ORF), named AC5, present in only a number of begomovirus species. This ORF is almost fully inserted into the *cp* gene, but in opposite orientation and in a different reading frame. The AC5 ORF of ToRMV has the potential to encode for a 27 kDa protein. The function of a putative AC5 protein has only been studied for *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV), but no evidence of its expression was found. However, the amino acid sequence of the putative AC5 protein from ToRMV is only 41% identical to the WmCSV AC5. It is thus conceivable that the ToRMV AC5 is expressed and plays a role in the viral infection cycle. The objective of this work was to clone and express the ToRMV AC5 ORF *in vitro*, and to raise an AC5-specific antiserum. Specific primers were used to direct the PCR-based amplification of the ToRMV AC5 ORF. The amplified fragment was cloned into the expression vector pRSET-C. Recombinant plasmids were used for protein expression in *E. coli* BL21::DE3. The AC5 protein was purified from *E. coli* cells by affinity chromatography and used for the immunization of rabbits. The specificity of the polyclonal antiserum obtained

was assayed by *Western blot*. This antiserum can now be used in immunolocalization studies attempting to detect the AC5 protein in ToRMV-infected tissues.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Geminiviridae é uma família de vírus que infectam plantas, responsáveis por doenças severas em várias culturas em todo o mundo. Os geminivírus possuem o genoma constituído de DNA circular de fita simples e são encapsidados por uma única proteína estrutural disposta na forma de 22 capsômeros, conferindo à partícula viral a aparência de dois icosaedros incompletos com cerca de 18x30 nm (Zhang *et al.*, 2001). A família é constituída de quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Esta classificação é baseada no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e número de componentes do genoma viral. O gênero *Mastrevirus* inclui os geminivírus com um componente genômico e transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. A espécie-tipo é o *Maize streak virus* (MSV). O gênero *Curtovirus* engloba os geminivírus com um componente genômico, transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a espécies dicotiledôneas. A espécie-tipo é o *Beet curly top virus* (BCTV). O gênero *Topocuvirus* contém uma única espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), com um único componente genômico e transmitido por cigarrinhas (Homoptera: Auchenoryncha) a espécies dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* inclui espécies com um ou dois componentes genômicos, transmitidas por mosca-branca (Homoptera: Aleyrodidae) para espécies dicotiledôneas. A espécie-tipo é o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV).

A maioria dos vírus classificados no gênero *Begomovirus* possui dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B. O DNA-A contém os genes necessários para a replicação e encapsidação da progênie viral, e o DNA-B contém os genes requeridos para o movimento intra- e intercelular do vírus na planta. Ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica de plantas. Exceto por uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), os dois componentes não apresentam

similaridade em suas sequências de nucleotídeos. A RC contém a origem de replicação dos geminivírus (Fontes *et al.*, 1994a; Fontes *et al.*, 1994b), que inclui diversos elementos de sequência altamente conservados entre as diferentes espécies do gênero. As RC's de dois componentes genômicos de uma determinada espécie de begomovírus são idênticas ou muito similares. Uma exceção é o *Cabbage leaf curl virus* (CLCV), que apresenta apenas 80% de homologia entre as sequências das RC's do DNA-A e do DNA-B (Hill *et al.*, 1998).

O DNA-A contém de quatro a seis genes (Figura 1). Na fita de sentido viral encontram-se o gene que codifica a proteína capsial (*cp*) e uma segunda ORF (AV2, ou “precoat”) presente apenas nos begomovírus do hemisfério oriental. Na fita de sentido complementar encontram-se os genes *rep*, *trap*, *ren* e a ORF AC4. No DNA-B estão localizados os genes *ns* e *mp*, nas fitas viral e complementar, respectivamente (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). O gene *ns* codifica a proteína NS (“nuclear shuttle”), necessária para o tráfico intracelular de DNA viral do núcleo para o citoplasma, e o gene *mp* codifica a proteína MP, que está envolvida no movimento do DNA viral célula-a-célula, via plasmodesmas.

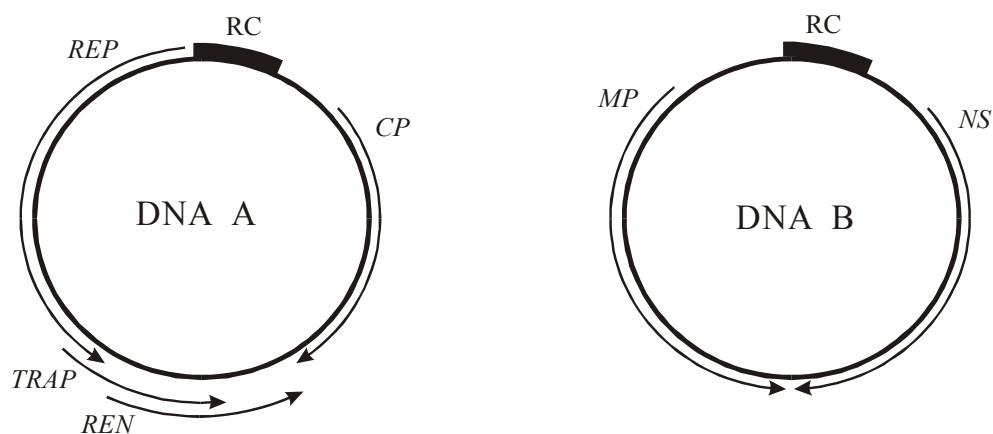


Figura 1. Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico. Os círculos representam o genoma viral, constituído de dois componentes (DNA-A e DNA-B) com aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada um. As setas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição: *rep*, “replication-associated protein”; *trap*, “trans-activating protein”; *ren*, “replication-enhancer protein”; *cp*, proteína capsial (“coat protein”); *mp*, “movement protein”; *ns*, “nuclear shuttle”. A região comum (RC) também está indicada.

A função do gene *cp* é codificar a proteína do capsídeo viral. Além da montagem da partícula, a CP é essencial para a transmissão do vírus e determina a especificidade do inseto vetor. Entretanto, para a maioria dos begomovírus, a CP não é necessária para a infecção sistêmica de plantas. A ORF AV2, presente apenas nos begomovírus do hemisfério oriental, muitos dos quais possuem apenas um componente genômico análogo ao DNA-A, codifica a proteína “precoat”, que está associada à movimentação sistêmica do vírus. O gene *rep* (“replication-associated protein”) codifica a única proteína essencial para o processo de replicação destes vírus. O gene *ren* (“replication enhancer protein”) codifica uma proteína acessória, amplificadora da replicação viral. Embora esta proteína não seja essencial para o processo de replicação, o acúmulo de DNA viral é muito maior quando ela se encontra presente. O produto do gene *trap* (“trans-activating protein”) é uma proteína ativadora da transcrição dos genes de sentido viral, *cp* e *ns* (revisado por Gutierrez, 1999).

O processo de replicação dos geminivírus, incluindo os begomovírus, ocorre no núcleo das células infectadas, onde o ssDNA é convertido em dsDNA (conhecido como forma replicativa, RF). A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, mas evidências indiretas indicam que ela é realizada por fatores do hospedeiro. A RF serve como molde para síntese de novos ssDNA e para os RNAs mensageiros virais. A replicação propriamente dita envolve apenas a proteína Rep. No caso específico dos begomovírus, Rep é uma proteína de ~41 kDa codificada por um único gene. Várias atividades bioquímicas têm sido demonstradas para esta proteína, incluindo propriedades de ligação a DNA de fita simples e dupla, clivagem e ligação do DNA em sequências específicas, hidrólise de ATP, e iniciação do mecanismo de replicação por círculo rolante (revisado por Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

A replicação dos geminivírus pode ser dividida em três passos: (i) conversão do ssDNA viral em dsDNA (RF); (ii) clivagem do RF e síntese de uma molécula de ssDNA linear sentido viral, contendo várias unidades genômicas (multímero) utilizando como molde a fita complementar do RF; e (iii) clivagem e religação das unidades genômicas do multímero, gerando moléculas circulares de ssDNA correspondentes ao genoma viral. A proteína Rep é a responsável pela clivagem do RF, que dá início à síntese do multímero por meio do mecanismo de círculo rolante. Essa clivagem ocorre entre o último T e A de uma sequência de nove nucleotídeos (TAATATTAC) presente em todos os geminivírus, que constitui a origem de replicação.

A replicação dos geminivírus depende em grande parte do sistema enzimático de seus hospedeiros, responsável pela síntese da RF e de novas fitas de ssDNA de sentido viral. Assim, torna-se fundamental que as células infectadas por geminivírus estejam sintetizando DNA, caso contrário as enzimas responsáveis pela síntese não estarão presentes em

concentração suficiente para permitir a replicação do vírus. Uma vez que os geminivírus infectam células vegetais plenamente diferenciadas, nas quais a síntese de novos DNAs praticamente não ocorre, o vírus deve ser capaz de modificar o ciclo celular do hospedeiro de forma a reiniciar a síntese de DNA, ou pelo menos ativar a transcrição das enzimas envolvidas nesse processo. A proteína Rep é a responsável por essa ativação, por meio da indução do acúmulo de PCNA (“proliferating cell nuclear antigen”), uma proteína associada à síntese de DNA em plantas (Nagar *et al.*, 1995).

Além dos genes *rep*, *ren*, *trap*, *precoat* e *cp*, outras ORFs, como AC4 e AC5, foram identificadas em alguns, mas não em todos os begomovírus estudados até o presente. A ORF AC4 está inserida na sequência do gene *rep*, em uma fase de leitura distinta. Essa ORF possui o potencial de codificar uma proteína de 10 kDa. Gröning *et al.* (1994) demonstraram por meio de experimentos de expressão transiente que a proteína AC4 do *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) provavelmente reprime a expressão de Rep por meio de regulação negativa do promotor AL61 do gene *rep*. Essa repressão independe do sítio de ligação para Rep, pois um cassete de expressão em plantas codificando AC4 foi capaz de reprimir a expressão do gene da luciferase sob o comando de um promotor AL61 cuja região de ligação a Rep havia sido deletada (Eagle & Hanley-Bowdoin, 1997). Outros autores questionam se a ORF AC4 é realmente expressa pelo TGMV e outros begomovírus, já que a proteína AC4 ainda não foi detectada em tecidos infectados, e mutações na ORF AC4 não resultam em mudanças fenotípicas (Pooma & Petty, 1996).

A ORF AC5 está presente em algumas espécies de begomovírus (Tabela 1). Esta ORF está quase totalmente inserida na sequência do gene *cp*, porém em orientação inversa e em outra fase de leitura. As sequências de aminoácidos das proteínas potencialmente codificadas pelas ORFs AC5 de diversos begomovírus apresentam grande variação, e a análise filogenética dessas sequências separa-as em três grupos claramente distintos (Figura 2). A função do produto da ORF AC5 foi estudada apenas para o *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) (Kheyr-Pour *et al.*, 2000). Mutações que inativavam a ORF AC5 deste vírus não acarretaram nenhuma modificação sintomatológica.

Recentemente, duas novas espécies de begomovírus foram descritas infectando tomateiros em Minas Gerais, o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV) (Machado, 2001) e o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes, 2001). O componente genômico clonado do TCMoV-[MG-Bt1] possui uma organização genômica similar à do DNA-A de outros begomovírus, exceto pela presença de uma ORF AC5 com o potencial de codificar uma proteína com 250 aminoácidos (Machado, 2001).

Tabela 1. Begomovírus nos quais a ORF AC5 está presente na sequência de nucleotídeos do DNA-A.

Espécie	Referência	Nº de acesso no GenBank
<i>African cassava mosaic virus</i> (ACMV-[Ivory Coast])	não publicado	AF259894
<i>Ageratum yellow vein virus</i> (AYVV)	Tan <i>et al.</i> (1995)	NC_004626 (=X74516)
<i>Bhendi yellow vein mosaic virus</i> (BYVMV)	Usha & Jose (2003)	NC_003418 (=AF241479)
<i>Croton yellow vein mosaic virus</i> (CYVMV)	não publicado	NC_004300 (=AJ507777)
<i>East African cassava mosaic virus</i> (EACMV)	não publicado	NC_004674 (=AF126806)
<i>Indian cassava mosaic virus</i> (ICMV)	Hong <i>et al.</i> (1993)	NC_001932 (=Z24758)
<i>Mungbean yellow mosaic virus</i> (MYMV)	Morinaga <i>et al.</i> (1993)	NC_001983 (=D14703)
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> (MYMIV-[BG-3])	Pant <i>et al.</i> (2001)	NC_004608 (=AF126406)
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> (MYMIV-[Cowpea])	não publicado	AF481865
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> (MYMIV-[Mungbean])	não publicado	AF416742
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> (MYMIV-[Soybean])	não publicado	AY049772 (=AF361434)
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> (MYMIV-[SoybeanTN])	não publicado	AJ416349
<i>Papaya leaf curl virus</i> (PLCV)	não publicado	NC_004147 (=Y15934)
<i>Sida golden mosaic virus</i> (SGMV)	não publicado	NC_004636 (=U77963)
<i>Sida golden yellow vein virus</i> (SGYVV)	não publicado	NC_004635 (=U77964)
<i>Sida mottle virus</i> (SMoV)	não publicado	NC_004637 (=AY090555)
<i>Soybean crinkle leaf virus</i> (SoCLV)	Samretwanich <i>et al.</i> (2001)	NC_003357 (=AB050781)
<i>Soybean yellow mosaic virus</i> (SoYMV)	não publicado	AJ315668
<i>Sida yellow mosaic virus</i> (SYMV)	não publicado	NC_004639 (=AY090558)
<i>Tomato golden mottle virus</i> (TGMoV)	não publicado	NC_003829 (=AF132852)
<i>Tomato leaf curl virus</i> (TLCV)	não publicado	AF448059
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> (TLCNDV-[Mild])	Padidam <i>et al.</i> (1995)	U15016
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> (TLCNDV-[Severe])	Padidam <i>et al.</i> (1995)	U15015

Tabela 1 (cont.)

Espécie	Referência	Nº de acesso no GenBank
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> (ToCMV-[MG-Bt1])	Machado (2001)	AY090557
<i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV-[MG-Ub1])	Fernandes (2001)	NC_002555 (=AF291706)
<i>Tomato yellow leaf curl Thailand virus</i> (TYLCThV)	não publicado	NC_000869 (=AF141922)
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i> (WmCSV)	Kheyr-Pour <i>et al.</i> (2000)	AJ245652

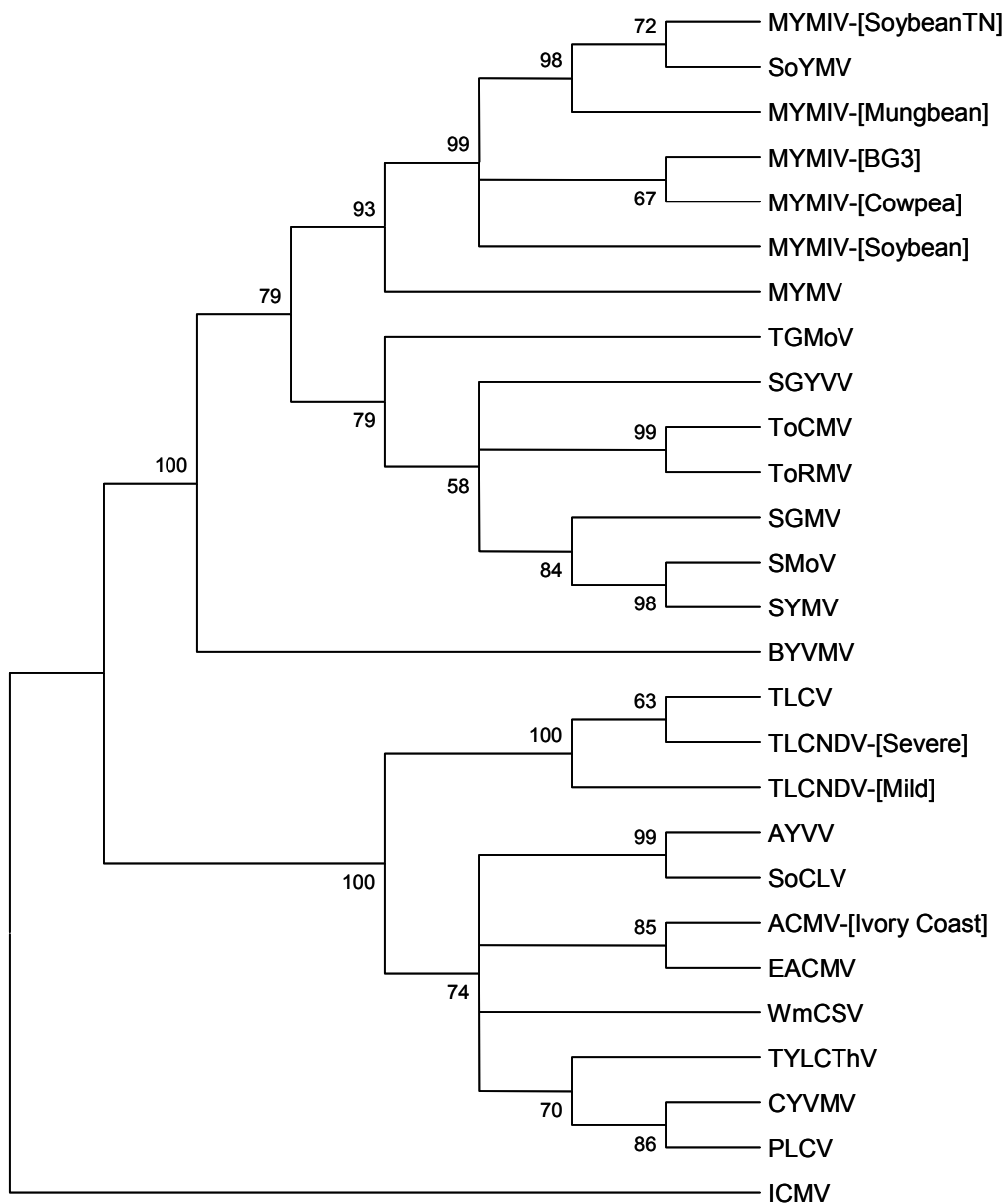


Figura 2. Árvore filogenética construída a partir das seqüências da proteína AC5 de espécies de begomovírus presentes no GenBank. O comprimento dos ramos é proporcional à distância genética entre os vírus; os ramos verticais são arbitrários. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as ramificações foram observadas

O ToRMV foi descrito por Fernandes (2001) como parte de um complexo viral causando mosaico dourado e deformação (rugosidade) foliar em tomateiro na região do Triângulo Mineiro, MG. A análise via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para o gênero *Begomovirus* indicou a amplificação de dois fragmentos distintos para o DNA-A e para o DNA-B, sugerindo que o complexo continha dois vírus distintos. Os vírus presentes nesse complexo viral foram transmitidos via extrato vegetal tamponado a partir de folhas de tomateiro para plantas de *Nicotiana benthamiana*. O genoma viral foi clonado por meio da extração da RF a partir das plantas de *N. benthamiana*, clivagem da RF com enzimas de restrição e ligação da RF clivada a plasmídeos vetores. A comparação das seqüências de nucleotídeos dos insertos virais presentes nos clones pUb1-49 (DNA-A) e -81 (DNA-B) indicou que esses componentes pertenciam a uma nova espécie de begomovírus. Os clones pUb1-49 e -81 possuem regiões comuns idênticas, e constituem os dois componentes genômicos do ToRMV. A análise da sequência de nucleotídeos do DNA-A do ToRMV indicou a presença da ORF AC5.

A análise filogenética da proteína potencialmente codificada pela ORF AC5 do ToRMV indicou que essa proteína pertence a um subgrupo distinto da AC5 do WmCSV (Figura 2). Desta forma, é possível que a ORF AC5 do ToRMV seja expressa, e que a proteína desempenhe um papel na infecção viral. Este trabalho teve como objetivo a clonagem e expressão em *Escherichia coli* da ORF AC5 do ToRMV e a produção de anti-soro policlonal específico.

LITERATURA CITADA

- EAGLE, P.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. *Cis*-elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *Journal of Virology*, v. 71, p. 6947-6955, 1997.
- FERNANDES, J.J. Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro. Tese D.S., Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 192 p. 2001.
- FONTES, E.P.B.; EAGLE, P.A.; SIPE, P.S.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 8459-8465, 1994a.
- FONTES, E.P.B.; GLADFELTER, H.J.; SCHAFFER, R.L.; PETTY, I.T.D.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell*, v. 6, p. 405-416, 1994b.
- GRÖNING, B.R.; HAYES, R.J.; BUCK, K.W. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and AL1 gene expression: Expression of the AL4 gene may contribute to suppression of the AL1 gene. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 721-726, 1994.
- GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 56, p. 313-329, 1999.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 18, p. 71-106, 1999.
- HILL, J.E.; STRANDBERG, J.O.; HIEBERT, E.; LAZAROWITZ, S.G. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus:

- Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. *Virology*, v. 250, p. 283-292, 1998.
- HONG, Y.G.; ROBINSON, D.J.; HARRISON, B.D. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted geminiviruses in cassava. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 2437-2443, 1993.
- KHEYR-POUR, A.; BANANEJ, K.; DAFALLA, G.A.; CACIAGLI, P.; NORIS, E.; AHOONMANESH, A.; LECOQ, H.; GRONENBORN, B. *Watermelon chlorotic stunt virus* from the Sudan and Iran: Sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. *Phytopathology*, v. 90, p. 629-635, 2000.
- MACHADO, J.J. Caracterização molecular de uma nova espécie de geminivírus e análise de infectividade dos genomas virais clonados. Tese M.S, Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2001.
- MORINAGA, T.; IKEGAMI, M.; MIURA, K. The nucleotide sequence and genome structure of mung bean yellow mosaic geminivirus. *Molecular Immunology*, v. 37, p. 471-476, 1993.
- NAGAR, S.; PEDERSEN, T.J.; CARRICK, K.M.; HANLEY-BOWDOIN, L.; ROBERTSON, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell*, v. 7, p. 705-719, 1995.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 249-263, 1995.
- PANT, V.; GUPTA, D.; CHOUDHURY, N.R.; MALATHI, V.G.; VARMA, A.; MUKHERJEE, S.K. Molecular characterization of the Rep protein of the blackgram isolate of *Indian mungbean yellow mosaic virus*. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 2559-2567, 2001.
- POOMA, W.; PETTY, I.T. Tomato golden mosaic virus open reading frame AL4 is genetically distinct from its C4 analogue in monopartite geminiviruses. *Journal of General Virology*, v. 77, p. 1947-1951, 1996.
- SAMRETWANICH, K.; KITTIPAKORN, K.; CHIEMSOMBAT, P.; IKEGAMI, M. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Soybean crinkle leaf virus*. *Journal of Phytopathology*, v. 149, p. 333-336, 2001.
- TAN, P.H.; WONG, S.M.; WU, M.; BEDFORD, I.D.; SAUNDERS, K.; STANLEY, J. Genome organization of ageratum yellow vein virus, a monopartite whitefly-transmitted geminivirus isolated from a common weed. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 2915-2922, 1995.

- USHA, R.; JOSE, J. Bhendi yellow vein mosaic disease in India is caused by association of a DNA Beta satellite with a begomovirus. *Virology*, v. 305, p. 310-317, 2003.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (Eds.) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press. 1162p. 2000.
- ZHANG, W.; OLSON, N.H.; BAKER, T.S.; FAULKNER, L.; AGBANDJE-MCKENNA, M.; BOULTON, M.I.; DAVIES, J.W.; MCKENNA, R. Structure of the *Maize streak virus* geminate particle. *Virology*, v. 279, p. 471-477, 2001.

**CLONAGEM E EXPRESSÃO *IN VITRO* DA ORF AC5 DO *Tomato rugose mosaic virus*
(ToRMV) E PRODUÇÃO DE ANTI-SORO**

Barros, D.R., Lima, A.T.M., Matsuoka, K., Fernandes, J.J., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M.
Clonagem e expressão *in vitro* da ORF AC5 do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e
produção de anti-soro. *Fitopatologia Brasileira*, *submetido para publicação*.

CLONAGEM E EXPRESSÃO *IN VITRO* DA ORF AC5 DO *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) E PRODUÇÃO DE ANTI-SORO

Danielle R. de Barros, Alison T. M. Lima, Kiyoshi Matsuoka, Jonas J. Fernandes, Murilo G. Carvalho e F. Murilo Zerbini

Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36571-000.

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: F. Murilo Zerbini (E-mail: zerbini@ufv.br)

Barros, D.R., Lima, A.T.M., Matsuoka, K., Fernandes, J.J., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M.

Clonagem e expressão *in vitro* da ORF AC5 do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e produção de anti-soro. Fitopatologia Brasileira, 00:000-000.

RESUMO

O *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) é um begomovírus descrito como parte de um complexo viral causando mosaico dourado e deformação (rugosidade) foliar em tomateiro na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. Os dois componentes genômicos encontram-se completamente sequenciados, e a análise das seqüências de nucleotídeos do DNA-A indicou a presença de uma ORF adicional denominada AC5, presente apenas em algumas espécies de begomovírus. A ORF AC5 do ToRMV tem o potencial de codificar uma proteína com aproximadamente 27 kDa. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados para a amplificação da ORF AC5 via PCR. O fragmento amplificado foi clonado no vetor de expressão pRSET-C. Plasmídeos recombinantes foram utilizados para a expressão da proteína AC5 em *E. coli* BL21::DE3. A proteína foi purificada a partir das células de *E. coli* e utilizada para a

produção de anti-soro policlonal em coelhos. A especificidade do anti-soro foi confirmada por *Western blot*. Esse anti-soro poderá ser utilizado em ensaios de imunolocalização da proteína AC5 em tecidos infectados pelo ToRMV.

ABSTRACT

Tomato rugose mosaic virus (ToRMV) is a typical bipartite begomovirus described as part of a viral complex inducing golden mosaic and leaf distortion (rugosity) in tomatoes at Triângulo Mineiro, Minas Gerais. Both genomic components have been completely sequenced, and the DNA-A sequence analysis indicated the presence of an additional ORF, named AC5, present in only a number of begomovirus species. The AC5 ORF of ToRMV has the potential to encode a 27 kDa protein. Specific primers were used for PCR-amplification of the ToRMV AC5 ORF. The amplified fragment was cloned into the expression vector pRSET-C. Recombinant plasmids were used for protein expression in *E. coli* BL21::DE3. The AC5 protein was purified from *E. coli* cells and used for the immunization of rabbits. The specificity of the polyclonal antiserum obtained was assayed by *Western blot*. This antiserum can now be used in immunolocalization studies attempting to detect the AC5 protein in ToRMV-infected tissues.

Palavras-chave: Geminivírus, begomovírus, tomateiro.

INTRODUÇÃO

Os geminivírus constituem um grupo de vírus de plantas de grande importância econômica em todos os continentes, em diversas culturas. A família *Geminiviridae* é caracterizada pelo aspecto geminado da partícula viral, cujo genoma é composto por uma ou duas moléculas de DNA de fita simples, circular, cada uma com 2.500 a 3.000 nucleotídeos

(nt), encapsidados por uma única proteína, conferindo-lhe a aparência de dois icosaedros incompletos geminados (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

A família é dividida em quatro gêneros de acordo com organização genômica, inseto vetor e hospedeiro. Espécies pertencentes ao gênero *Begomovirus* possuem dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B, e são transmitidas por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) a plantas dicotiledôneas. Exceto por uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum, os dois componentes não apresentam similaridade significativa em suas sequências de nucleotídeos. A região comum contém a origem de replicação dos geminivírus (Fontes *et al.*, 1994a; Fontes *et al.*, 1994b), que inclui diversos elementos de sequência (iterons) altamente conservados entre as diferentes espécies do gênero (revisado por Faria & Zerbini, 2000). O DNA-A contém os genes necessários para a replicação e encapsidação da progênie viral, enquanto o DNA-B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

O *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) foi descrito por Fernandes (2001), como parte de um complexo viral causando mosaico dourado e deformação (rugosidade) foliar em tomateiro na região do Triângulo Mineiro, MG. Os dois componentes genômicos foram completamente sequenciados, e a análise das seqüências demonstrou tratar-se de um típico begomovírus do hemisfério ocidental. Entretanto, o DNA-A do ToRMV possui uma ORF adicional denominada AC5, presente apenas em algumas espécies de begomovírus. Esta ORF está quase totalmente inserida na sequência do gene *cp*, porém em orientação inversa e em outra fase de leitura. A ORF AC5 do ToRMV tem o potencial de codificar uma proteína com aproximadamente 27 kDa. Até o momento, a função do produto potencial da ORF AC5 foi estudada apenas para o *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) (Kheyr-Pour *et al.*, 2000). Nesse estudo, mutações que inativaram a ORF AC5 não acarretaram nenhuma

modificação sintomatológica em plantas inoculadas com o mutante. Como a sequência de aminoácidos da proteína potencialmente codificada pela ORF AC5 do ToRMV possui apenas 41% de identidade com a AC5 do WmCSV, é possível que a ORF AC5 do ToRMV seja expressa, e que a proteína desempenhe um papel na infecção viral. Este trabalho teve como objetivo a clonagem e expressão em *Escherichia coli* da ORF AC5 do ToRMV e a produção de anti-soro policlonal específico.

MATERIAL E MÉTODOS

Análise filogenética da ORF AC5 de diferentes espécies de begomovírus. As seqüências deduzidas de aminoácidos de todas as proteínas AC5 foram obtidas do Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) (Tabela 1). Um alinhamento múltiplo dessas seqüências foi obtido utilizando-se o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/Clustalw). A partir do alinhamento, foi preparada uma árvore filogenética utilizando-se o programa MEGA (www.megasoftware.net), utilizando-se o método de *neighbour-joining* com correção Poisson. Os ramos da árvore foram testados por *bootstrap*, com 2.000 repetições.

Obtenção e manutenção do isolado viral. O isolado de ToRMV utilizado neste estudo foi obtido e caracterizado por Fernandes (2001). O isolado foi mantido em plantas de *Nicotiana benthamiana*, por meio de inoculações sucessivas via extrato foliar tamponado em fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0 contendo sulfito de sódio a 0,1% (p/v). As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação.

Clonagem da ORF AC5 do ToRMV em vetor de expressão em *E. coli*. A seqüência codificadora da ORF AC5 do ToRMV foi amplificada via reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando como DNA molde o clone pUb-49 obtido por Fernandes (2001), e oligonucleotídeos sintetizados a partir da seqüência de nucleotídeos da ORF AC5 (5'-G-G-C-C-G-A-A-T-T-C-A-T-G-A-T-G-C-A-T-T-T-G-A-C-G-A-G-C-3', sítio para *EcoR* I

sublinhado, e 5'-C-G-T-A-G-G-A-T-C-C-T-C-G-T-A-T-T-T-T-C-C-A-G-C-3', sítio para *BamH* I sublinhado). A PCR foi executada em um volume de 50 µl, contendo 5 µl de tampão (Tris-HCl 100mM, pH 8,3 e KCl 500 mM), MgCl₂ 2,5 mM, mistura de dNTPs a 0,2 mM, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e uma unidade de *Taq* DNA polimerase, completando-se o volume com água. A reação consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 48°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9% p/v). O fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEM-T (Promega), conforme instruções do fabricante. A ligação, transformação de *E. coli* DH5α e identificação de clones recombinantes foram realizados de acordo com técnicas padrão (Sambrook *et al.*, 1989). Plasmídeos recombinantes contendo o inserto viral foram digeridos com as enzimas *EcoR* I e *BamH* I para liberação do inserto. Este foi purificado a partir de gel de agarose utilizando-se uma matriz sólida (Sephaglass Bandprep, Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento viral foi ligado ao vetor de expressão pRSET-C (Invitrogen), previamente digerido com as mesmas enzimas. A ligação, transformação de *E. coli* DH5α e identificação dos clones recombinantes foram realizados de acordo com técnicas padrão (Sambrook *et al.*, 1989). O clone pRSET-AC5 foi seqüenciado pelo método de dideoxinucleotídeos terminadores utilizando-se o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin Elmer), conforme as instruções do fabricante. A seqüência foi analisada em um sequenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems).

Expressão da proteína AC5 em *E. coli* BL21::DE3. Para a transformação da estirpe BL21::DE3 de *E. coli*, células competentes dessa estirpe foram transformadas com aproximadamente 10 ng de DNA, pelo método do choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). Após incubação a 37°C por 12 horas, uma colônia individual foi selecionada e utilizada para a inoculação de 200 ml de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/ ml), em um

erlenmeyer de 1 L. Essa cultura foi incubada a 37°C a 250 rpm até atingir uma densidade ótica (OD₆₀₀) de aproximadamente 0,5. Neste ponto, a expressão da proteína foi induzida por meio da adição de IPTG a uma concentração final de 1 mM. Quatro horas após a indução as células foram coletadas por centrifugação (5.000 g por 10 minutos) e armazenadas a -80°C. A proteína foi purificada conforme descrito por Noueiry *et al.* (1994), utilizando colunas de Ni²⁺-NTA (Qiagen) conforme instruções do fabricante. As frações eluídas da coluna foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), a fim de determinar as frações que continham a proteína viral. A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford, utilizando-se o kit “Dc Protein Assay” (BioRad) conforme instruções do fabricante.

Produção de anti-soro. A proteína purificada a partir das células bacterianas foi utilizada para a produção de anti-soro policlonal utilizando-se dois coelhos brancos da raça Nova Zelândia, com 30 dias de idade. Após a coleta de sangue para obtenção do soro normal (pré-imune) foram realizadas cinco injeções intramusculares a intervalos semanais, com 100, 100, 200, 250 e 500 µg de proteína para um dos coelhos e 200, 200, 400, 500 e 1000 µg para o outro coelho. Duas semanas após a última injeção foram retiradas amostras de sangue para avaliação inicial do anti-soro. Três coletas adicionais foram realizadas a intervalos semanais após a coleta inicial. A especificidade do anti-soro foi confirmada por *Western blot*.

RESULTADOS

Análise filogenética da ORF AC5 de diferentes espécies de begomovírus. A árvore filogenética relativa a ORF AC5 dos begomovírus (Figura 1) possui ramos distintos separando as espécies relatadas nas Américas (incluindo o ToRMV), na Índia, e um ramo no qual foram agrupadas espécies da Ásia e África (incluindo o WmCSV).

Clonagem da ORF AC5 do ToRMV em vetor de expressão em *E. coli*. A amplificação do fragmento correspondente à ORF AC5 foi confirmada pela observação do fragmento esperado, com aproximadamente 750 nt, em gel de agarose (Figura 2). Esse fragmento foi ligado diretamente ao vetor pGEM-T, e o clone correspondente foi denominado pAC5. A subclonagem no vetor de expressão pRSET-C foi confirmada após digestão dos plasmídeos recombinantes com as enzimas de restrição *EcoR* I e *BamH* I (dados não apresentados), e o clone correspondente foi denominado pRSET-AC5. O sequenciamento parcial desse clone confirmou que a ORF AC5 foi inserida no vetor pRSET-C na fase de leitura correta, levando à tradução da seqüência correta de aminoácidos da proteína AC5 (dados não apresentados).

Expressão da proteína em *E. coli* BL21::DE3. O clone pRSET-AC5 foi utilizado para a transformação da estirpe BL21::DE3 de *E. coli*. A expressão da proteína foi verificada por meio de SDS-PAGE, observando-se a presença de uma banda com aproximadamente 29 kDa (Figura 2).

Produção de anti-soro. Foram realizadas duas induções para a obtenção de proteína suficiente para imunização de dois coelhos. O anti-soro foi testado para detecção específica da proteína AC5 em *Western blot* (Figura 3). O anti-soro reagiu com as diluições da proteína purificada e não reagiu com extrato de proteínas totais de *E. coli* transformada com o vetor pRSET-C vazio ou com os extratos de proteínas totais de plantas saudáveis e inoculadas com isolados dos begomovírus TGMV, *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV-[MG-Ig1]) e *Tomato severe mosaic virus* (TSMV-[MG-Bi2]), comprovando-se assim sua especificidade. O anti-soro também não reagiu com o extrato de proteínas totais de plantas infectadas com o ToRMV.

DISCUSSÃO

A caracterização funcional de proteínas virais e de fatores do hospedeiro que interagem com o vírus durante o processo de patogênese é um dos focos principais da virologia vegetal nos dias atuais. Nesse contexto, os geminivírus constituem um dos grupos de vírus melhor caracterizados, o que não significa que todos os aspectos do ciclo de replicação viral e das interações vírus-hospedeiro estejam elucidados. Por exemplo, algumas espécies de begomovírus possuem ORF's cujo produto potencial ainda não foi detectado em plantas. É possível que essas ORF's não sejam funcionais, ou que a proteína codificada esteja presente em baixa concentração nos tecidos. A ORF AC5 está presente em poucas espécies de begomovírus, e no único caso em que sua possível função foi estudada a conclusão foi de que ela não é funcional (Kheyr-Pour *et al.*, 2000).

Os resultados aqui obtidos demonstram que a sequência da ORF AC5 é capaz de codificar uma proteína estável *in vitro*. A concentração da proteína AC5 atingiu níveis elevados em *E. coli* sem afetar seu crescimento, indicando que não possui efeito tóxico à bactéria. A proteína purificada a partir das células bacterianas comportou-se como um bom imunógeno, e o anti-soro produzido foi altamente específico e eficiente na detecção da proteína AC5 em *Western blot*. A não detecção da proteína AC5 em *Western blot* utilizando extrato de proteínas totais de plantas infectadas pelo ToRMV pode ser resultado da baixa concentração da proteína AC5 *in vivo*, ou de sua expressão apenas em determinado estágio do ciclo de infecção viral. Evidentemente, a hipótese de a ORF AC5 do ToRMV não ser funcional não pode ser descartada.

A obtenção de um anti-soro de boa qualidade é uma etapa de grande importância para que o processo de caracterização de uma ORF seja viabilizado. Com o auxílio deste anti-soro, ensaios de imunolocalização poderão ser conduzidos visando a detecção da proteína AC5 em tecidos infectados pelo ToRMV. Além disso, estudos de mutagênese da ORF AC5

encontram-se em andamento, com o objetivo de verificar se a expressão da ORF afeta os processos de replicação e infectividade do ToRMV.

LITERATURA CITADA

- FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M. Família Geminiviridae - taxonomia, replicação e movimento. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 8, p. 25-65, 2000.
- FERNANDES, J.J. Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro. Tese D.S., Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 192 p. 2001.
- FONTES, E.P.B.; EAGLE, P.A.; SIPE, P.S.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 8459-8465, 1994a.
- FONTES, E.P.B.; GLADFELTER, H.J.; SCHAFFER, R.L.; PETTY, I.T.D.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell*, v. 6, p. 405-416, 1994b.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 18, p. 71-106, 1999.
- KHEYR-POUR, A.; BANANEJ, K.; DAFALLA, G.A.; CACIAGLI, P.; NORIS, E.; AHOONMANESH, A.; LECOQ, H.; GRONENBORN, B. *Watermelon chlorotic stunt virus* from the Sudan and Iran: Sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. *Phytopathology*, v. 90, p. 629-635, 2000.
- LEAL, A.M.B. Detecção molecular de geminivirus em *Sida* spp. e tomateiro e caracterização parcial de seus genomas. Tese MS, Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 74 p. 1997.
- NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v. 76, p. 925-932, 1994.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2^a ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- WANG, H.L.; GILBERTSON, R.L.; LUCAS, W.J. Spacial and temporal distribution of Bean dwarf mosaic geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathology*, v. 86, p. 1204-1214, 1996.

Tabela 1. Begomovírus nos quais a ORF AC5 está presente na sequência de nucleotídeos do DNA-A.

Espécie	Referência	Nº de acesso no GenBank
<i>African cassava mosaic virus</i> (ACMV-[Ivory Coast])	não publicado	AF259894
<i>Ageratum yellow vein virus</i> (AYVV)	Tan <i>et al.</i> (1995)	NC_004626 (=X74516)
<i>Bhendi yellow vein mosaic virus</i> (BYVMV)	Usha & Jose (2003)	NC_003418 (=AF241479)
<i>Croton yellow vein mosaic virus</i> (CYVMV)	não publicado	NC_004300 (=AJ507777)
<i>East African cassava mosaic virus</i> (EACMV)	não publicado	NC_004674 (=AF126806)
<i>Indian cassava mosaic virus</i> (ICMV)	Hong <i>et al.</i> (1993)	NC_001932 (=Z24758)
<i>Mungbean yellow mosaic virus</i> (MYMV)	Morinaga <i>et al.</i> (1993)	NC_001983 (=D14703)
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> (MYMIV-[BG-3])	Pant <i>et al.</i> (2001)	NC_004608 (=AF126406)
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> (MYMIV-[Cowpea])	não publicado	AF481865
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> (MYMIV-[Mungbean])	não publicado	AF416742
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> (MYMIV-[Soybean])	não publicado	AY049772 (=AF361434)
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> (MYMIV-[SoybeanTN])	não publicado	AJ416349
<i>Papaya leaf curl virus</i> (PLCV)	não publicado	NC_004147 (=Y15934)
<i>Sida golden mosaic virus</i> (SGMV)	não publicado	NC_004636 (=U77963)
<i>Sida golden yellow vein virus</i> (SGYVV)	não publicado	NC_004635 (=U77964)
<i>Sida mottle virus</i> (SMoV)	não publicado	NC_004637 (=AY090555)
<i>Soybean crinkle leaf virus</i> (SoCLV)	Samretwanich <i>et al.</i> (2001)	NC_003357 (=AB050781)
<i>Soybean yellow mosaic virus</i> (SoYMV)	não publicado	AJ315668
<i>Sida yellow mosaic virus</i> (SYMV)	não publicado	NC_004639 (=AY090558)
<i>Tomato golden mottle virus</i> (TGMoV)	não publicado	NC_003829 (=AF132852)
<i>Tomato leaf curl virus</i> (TLCV)	não publicado	AF448059
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> (TLCNDV-[Mild])	Padidam <i>et al.</i> (1995)	U15016

Tabela 1 (cont.)

<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> (TLCNDV-[Severe])	Padidam <i>et al.</i> (1995)	U15015
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> (ToCMV-[MG-Bt1])	Machado (2001)	AY090557
<i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV-[MG-Ub1])	Fernandes (2001)	NC_002555 (=AF291706)
<i>Tomato yellow leaf curl Thailand virus</i> (TYLCThV)	não publicado	NC_000869 (=AF141922)
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i> (WmCSV)	Kheyr-Pour <i>et al.</i> (2000)	AJ245652

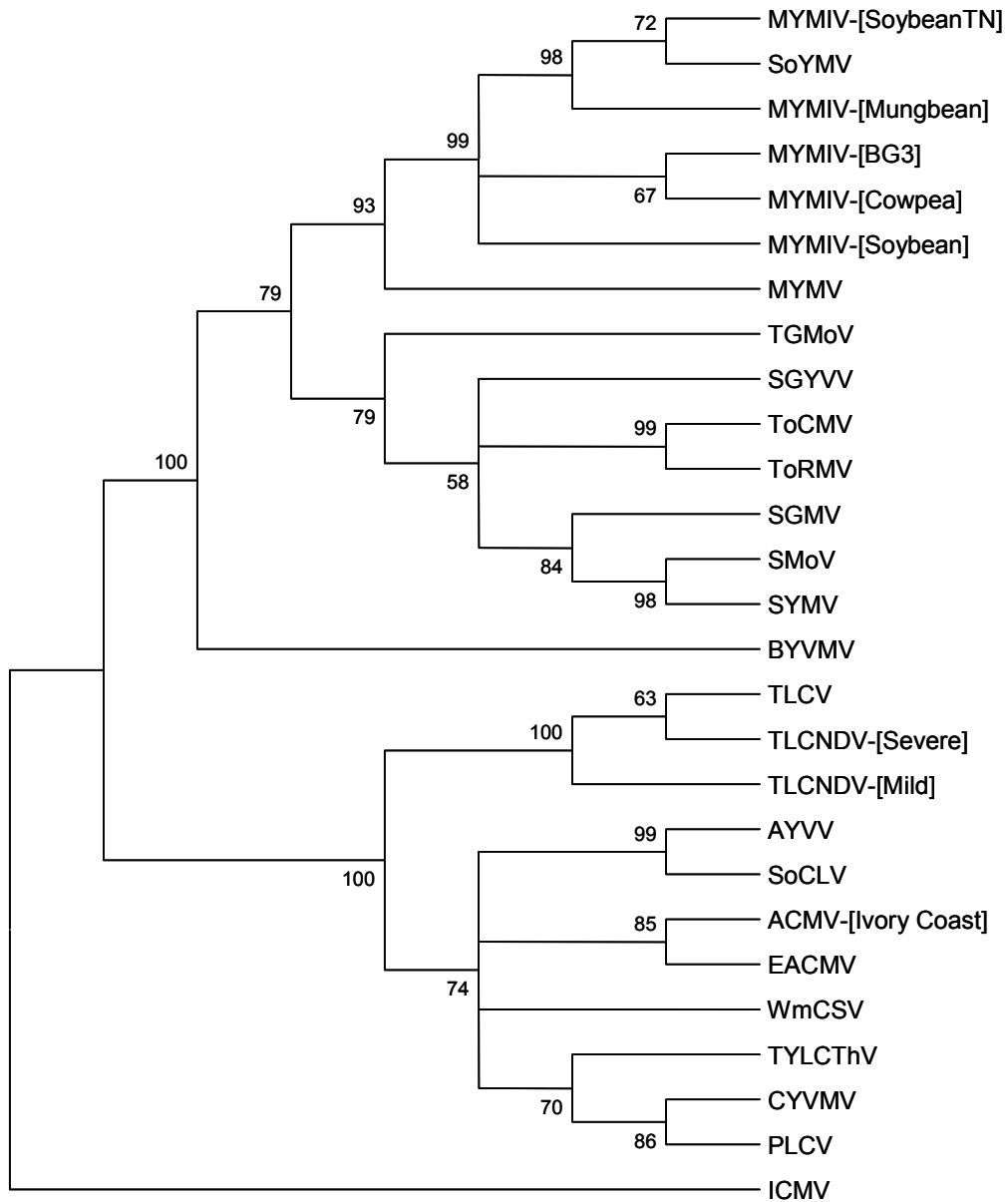


Figura 1. Árvore filogenética construída a partir das seqüências deduzidas de aminoácidos das proteínas AC5 de begomovírus disponíveis no GenBank. O comprimento dos ramos é proporcional à distância genética entre os vírus; os ramos verticais são arbitrários. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as ramificações foram observadas

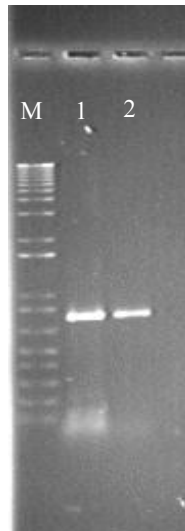


Figura 2. Perfil eletroforético em gel de agarose (0,9%) do fragmento correspondente à ORF AC5 do ToRMV, amplificado via PCR utilizando oligonucleotídeos específicos. **M**, “1kb DNA ladder”. **1, 2**, Fragmento correspondente à ORF AC5 do ToRMV.

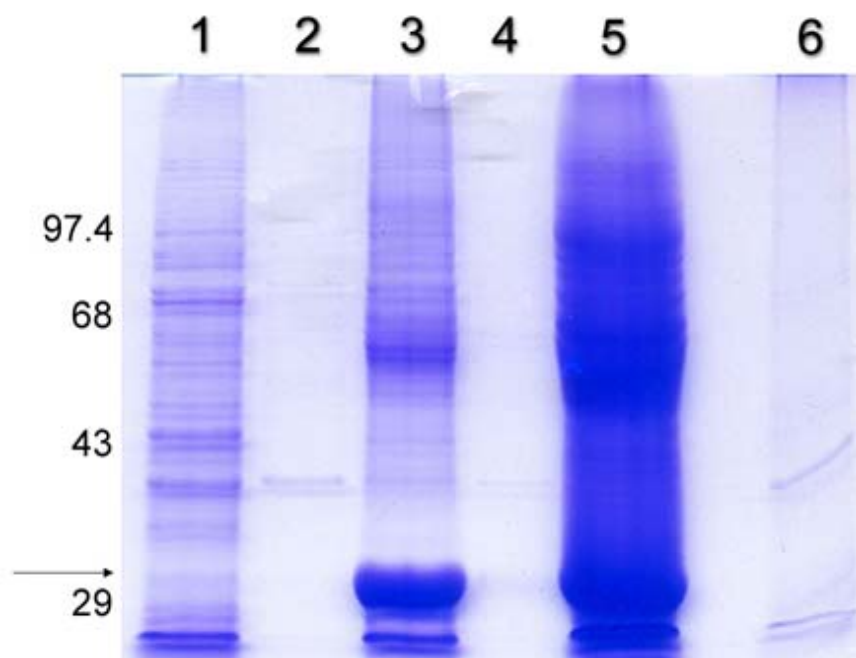


Figura 3. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio da proteína AC5 do ToRMV expressa em *E. coli*. **1, 2**, Frações protéicas solúveis de *E. coli* transformada com o clone recombinante pRSET-AC5. **3, 4, 5**, Frações insolúveis de *E. coli* transformada com o clone pRSET-AC5. **6**, Extrato de proteínas totais de *E. coli* transformada com o vetor pRSET-C vazio. A seta indica a banda correspondente à proteína AC5 do ToRMV. As massas moleculares dos padrões (em kDa) estão indicadas à direita do gel.

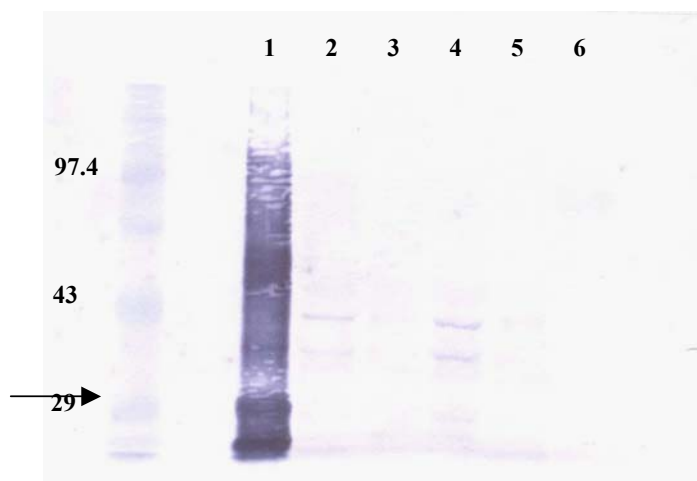


Figura 4. *Western blot* utilizando o anti-soro produzido para a proteína AC5 do ToRMV. **1,** Extrato não-diluído de proteínas totais de *E. coli* transformada com o vetor pRSET-C vazio. **2,** extrato diluído (1:500) de proteínas totais de *E. coli* transformada com o clone recombinante pRSET-AC5. **3, 4, 5, 6,** extrato de proteínas totais de plantas de *N. benthamiana* sadia e inoculadas com os begomovírus ToRMV, TGMV e TSMV, respectivamente. A seta indica a banda correspondente à proteína AC5 do ToRMV. As massas moleculares dos padrões (em kDa) estão indicadas à esquerda da membrana.

APÊNDICE

Imunolocalização da proteína AC5 do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) em *Nicotiana benthamiana*

Um ensaio de imunolocalização da proteína AC5 foi conduzido utilizando-se folhas de *N. benthamiana* sadias e infectadas com o ToRMV. Além do anti-soro específico para a proteína AC5 produzido neste trabalho, um anti-soro policlonal para a proteína capsidial do TGMV também foi utilizado (Leal, 1997). O método utilizado para a imunolocalização foi o mesmo descrito por Wang *et al.* (1996). Fragmentos de tecido foliar com aproximadamente 1 mm³ foram fixados e em seguida infiltrados em resina Spurr. A partir do material emblocado foram realizados cortes de seções semifinas (0,5 a 1,0 µm). Os cortes foram tratados com o anti-soro específico na diluição 1:20, incubados com o anti-soro secundário (cabra anti-coelho conjugado com ouro coloidal), tratados com solução de prata (Sigma), corados com safranina 0,5% e observados em microscópio de luz. Embora a infecção da planta utilizada para o preparo das seções pelo ToRMV tenha sido confirmada via PCR (dados não apresentados), não foi observado nenhum sinal que evidenciasse a presença da proteína AC5 do ToRMV nos tecidos (Figura 1). Entretanto, a hipótese de que a ORF AC5 não seja expressa ainda não pode ser confirmada, uma vez que as seções tratadas com o anti-soro para a proteína capsidial do TGMV também não apresentaram reação positiva. É possível que a proteína AC5 esteja presente nos tecidos em uma concentração muito baixa, dificultando o reconhecimento pelo anti-soro. Outro fator que pode ter afetado o resultado é a viabilidade do conjugado e/ou do kit utilizado para a contrastação com prata. Essa última possibilidade é considerada mais provável, em vista da ausência de reação positiva ao se utilizar o anti-soro para a proteína capsidial do TGMV.

Considerando que neste estudo o teste de imunolocalização foi negativo, faz-se necessário que todas as hipóteses descritas acima sejam testadas, para então chegar-se a uma conclusão final sobre a expressão da ORF e o acúmulo da proteína nos tecidos infectados.

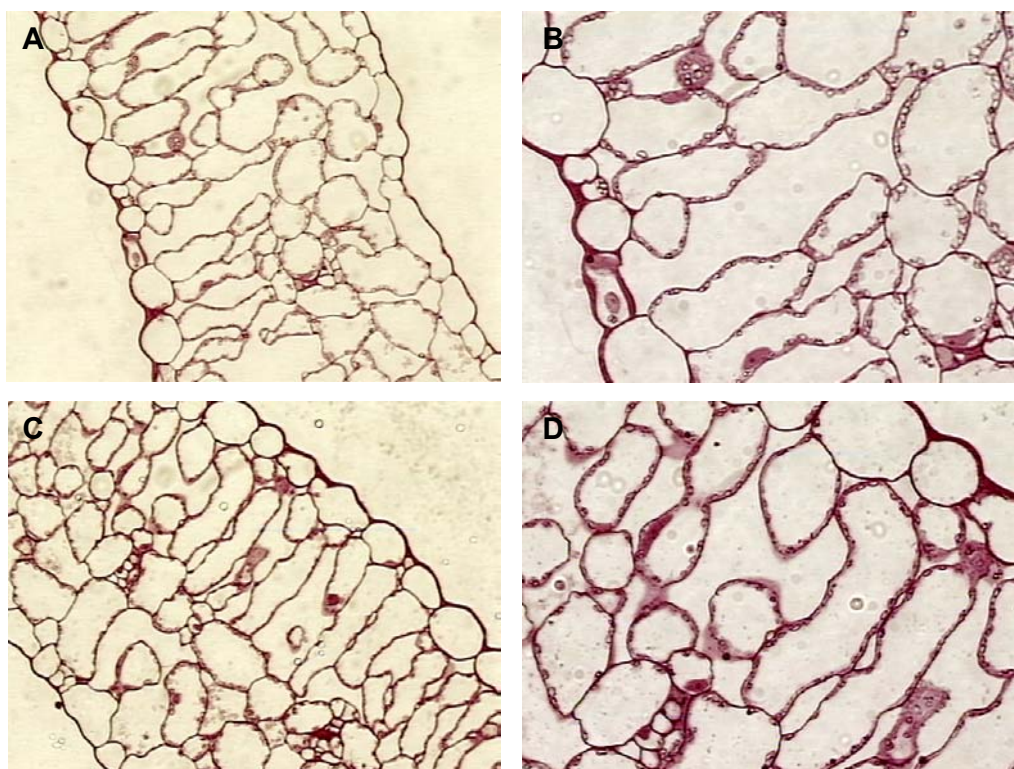


Figura 1. Imunolocalização da proteína AC5 em plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas pelo ToRMV. Micrografia de seções semifinas preparadas a partir de tecidos infectados e tratadas com: **A, B**, anti-soro específico para a proteína AC5 do ToRMV; **C, D**, anti-soro para a proteína capsidial do TGMV. **A, C**, aumento de 200×. **B, D**, aumento de 400×.