

LAIANE SILVA MACIEL

**ENVOLVIMENTO DE CHAPERONAS MOLECULARES NA
INFECÇÃO DO POTYVÍRUS *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) EM
HOSPEDEIROS SUSCETÍVEIS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL 2015

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

T

Maciel, Laiane Silva, 1989-
M152e Envolvimento de chaperonas moleculares na infecção do
2015 potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) em
 hospedeiros suscetíveis / Laiane Silva Maciel. – Viçosa, MG,
 2015.

ix, 47f. : il. (algumas color.); 29 cm.

Orientador: Poliane Alfenas Zerbini.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.40-47.

1. Potyvírus. 2. Relação parasito-hospedeiro. 3. Interação
proteína-proteína . I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia Agrícola. Programa de
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 635.642

LAIANE SILVA MACIEL

**ENVOLVIMENTO DE CHAPERONAS MOLECULARES NA
INFECÇÃO DO POTYVÍRUS *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV)
EM HOSPEDEIROS SUSCETÍVEIS**

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

APROVADA: 6 de março de 2015.

Luciano Gomes Fietto

Giselle Camargo Mendes

Poliane Alfenas Zerbini
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Á Deus por sempre iluminar o meu caminho;

Aos meus pais Geraldo e Nelma pela compreensão, incentivo, dedicação e amor incondicional em todas as etapas da minha vida;

Ao meu irmão Davisson pelo companheirismo, amizade, conversas trocadas e por todos os momentos compartilhados;

A todos os meus familiares por incentivarem a minha busca pelo conhecimento, em especial as minhas avós Gerssy e Conceição (*in memoria*) pelo exemplo de superação e por terem sempre festejado com orgulho as minhas conquistas;

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade de realizar esse curso;

A Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) pela concessão da bolsa de estudos;

Aos professores, funcionários do departamento de Microbiologia Agrícola e funcionários do Bioagro pela competência, proatividade e disponibilidade;

A Prof^a. Poliane Alfenas Zerbini pela orientação, oportunidade, dedicação e por todos os ensinamentos;

A Prof^a Denise Bazzolli pela disponibilidade, dedicação e incentivo a busca ao conhecimento;

Ao Prof Wagner Otoni e todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos pela receptividade, atenção, experiências trocadas, conselhos e todos os momentos de descontração;

Ao Prof Francisco Murilo Zerbini e todos os amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular, pelo apoio científico para a condução do trabalho, incentivo a construção do senso crítico e pelos momentos de alegria divididos no dia a dia;

Aos meus grandes parceiros de bancada, André, Ana, Chayanne, Diêgo, Fernanda, Fernandinha, Flávia, Lina e Rita, sem dúvida todos vocês foram essenciais para a construção desse trabalho. Tenho muito orgulho de ter participado desse grupo tão unido. O sentimento de gratidão é imenso e todos vocês estarão para sempre eternizados no meu coração;

Aos amigos “barra pesada” do departamento de Microbiologia Agrícola pela receptividade, amizade, companheirismo, generosidade, enfim, por todas as discussões científicas que contribuíram para minha evolução intelectual e por todas as prosas e festinhas que tornaram meus dias em Viçosa mais felizes e tranquilos;

Aos amigos de todas as horas Breno, Cleriane, Karla, Marina e Michele, muito obrigada por tanto carinho, por sempre me acolherem, pelas risadas, conselhos, incentivo, e por todas as comilanças partilhadas.

As amigas de república pela receptividade, carinho, paciência e amizade.

Aos velhos amigos de Sete Lagoas que mesmo distante se fazem presente, pela confiança, paciência, conselhos, e por estarem dispostos a dividir todos os anseios vitórias;

À todos aqueles que contribuíram para minha evolução profissional e pessoal nesses dois anos de curso.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

LAIANE SILVA MACIEL, filha de Geraldo Maciel da Mata e Nelma Lúcia da Silva Maciel, nasceu em 4 de fevereiro de 1989 em Sete Lagoas, Minas Gerais.

Em 2008 iniciou o curso de Ciências Biológicas no Centro Universitário de Sete Lagoas (Unifemm), vindo a graduar-se em dezembro de 2011. Em abril de 2013 ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 A família Potyviridae.....	4
2.2. PepYMV.....	8
2.3 Interação planta-potyvirus.....	8
2.4 Proteínas do hospedeiro Hsp70 e DnaJ.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Isolado viral.....	17
3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	17
3.3 Amplificação e clonagem da região codificadora do gene <i>hsp70</i>	18
3.4 Análise da sequência do gene <i>hsp70</i> e <i>dnaJ</i>	18
3.5 Duplo-híbrido.....	19
3.6 Obtenção de linhagens de <i>S. lycopersicum</i> transgênicas silenciadas para o gene <i>dnaJ20</i>	
3.7 Confirmação da inserção do T-DNA.....	20
3.8 Localização subcelular do gene <i>hsp70</i>	21
4. Resultados e Discussão.....	22
4.1 Análise da sequência do gene <i>hsp70</i>	22
4.2 Localização subcelular da proteína Hsp70.....	27
4.3 Ensaio de duplo híbrido em leveduras: interação proteína-proteína.....	29
4.4 Silenciamento do gene <i>SIDj1</i> via <i>A. tumefaciens</i> em plantas de tomateiro.....	32
6. REFERÊNCIAS.....	40

RESUMO

MACIEL, Laiane Silva, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Março de 2015. **Envolvimento de chaperonas moleculares na infecção do potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) em hospedeiros suscetíveis.** Orientadora: Poliane Alfnas Zerbini. Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzolli e Wagner Campos Otoni.

Os vírus que infectam plantas apresentam um genoma pequeno e codificam um número reduzido de proteínas. A limitação do número de proteínas virais é superada pela modulação da expressão de genes na célula hospedeira. O mapeamento das redes de interações entre fatores do patógeno e do hospedeiro tem fornecido respostas importantes para a compreensão dos processos que favorecem a infecção viral. O objetivo deste trabalho foi avaliar a contribuição de duas proteínas do tomateiro, a chaperona citosólica Hsp70 e sua co-chaperona DnaJ (classe 1) no estabelecimento da infecção pelo *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Essas duas proteínas foram identificadas com a expressão induzida em células infectadas pelo PepYMV. A sequência codificadora da Hsp70 de tomateiro (SIHsp70) foi clonada e sequenciada. A análise *in silico* mostrou a presença de todos os domínios típicos de uma Hsp70. Alinhamento entre a sequência da proteína SIHsp70, e as Hsps70 de *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabacum* mostrou uma alta conservação na sequência de aminoácidos das quatro proteínas alinhadas. A localização subcelular de SIHsp70 em células infectadas pelo PepYMV foi analisada por microscopia confocal. Células sadias e infectadas apresentaram uma localização nuclear e citoplasmática, entretanto em células infectadas foi possível observar a expressão da Hsp70 em estruturas ancoradas a membrana semelhantes a vesículas replicativas induzidas pela proteína viral 6K2. Para avaliar a ocorrência de interação entre SIHsp70 com proteínas virais, e SIDj1 com proteínas virais foi realizado um ensaio de duplo híbrido em leveduras. Não houve a detecção de nenhuma interação entre as proteínas do PepYMV e as proteínas SIHsp70 e SIDj1. Foi detectado a ocorrência de interação entre SIHsp70 e SIDj1. Com o objetivo de avaliar o efeito do silenciamento de SIDj1 na infecção viral, plantas de tomateiro foram transformadas com uma construção que induz o silenciamento de SIDj1 via *Agrobacterium*

tumefaciens. As plantas transformadas silenciadas apresentaram um fenótipo de letalidade e esse fenômeno não permitiu a quantificação do acúmulo do PepYMV em tomateiros transformados. Os resultados deste trabalho sugerem que as proteínas SIHsp70 e SIDj1 favorecem a infecção viral de forma indireta, e que estudos mais detalhados irão fornecer informações sobre o envolvimento dessas proteínas no processo de infecção pelo PepYMV.

ABSTRACT

MACIEL, Laiane Silva, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March, 2015. Involvement of molecular chaperones in infection potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) in susceptible hosts. Advisor: Poliane Alfenas Zerbini. Co-Advisors: Denise Mara Soares Bazzolli and Wagner Campos Otoni.

Viruses are obligate intracellular parasites with a small genome and encode a limited number of proteins. Limitation in the number of viral proteins is overcome by modulating the expression of certain genes in the host cell. Mapping interaction networks between pathogen and host factors has provided important answers to the understanding of the processes that promote viral infection. This study objective is to evaluate the contribution of the tomato proteins chaperone Hsp70 and its co-chaperone DnaJ in infection process with *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). These two proteins were investigated due to the modification of gene expression reports of transcripts in infected cells PepYMV. Initially the coding sequence corresponding to the tomato Hsp70 (SIHsp70) was analyzed *in silico*, the presence of all the domains of a typical Hsp70 was confirmed. Sequence alignment between the protein SIHsp70, and Hsps70 *Arabidopsis thaliana*, as well as *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum* revealed high conservation in the amino acid sequence alignment of the four proteins. The subcellular localization by confocal scanning microscopy was performed with SIHsp70 and demonstrated a common cytoplasmic and nuclear localization to healthy cells and cells infected by PepYMV. The infected cells showed similar expression of Hsp70 in membrane-anchored structures, similar to replicative vesicles induced by 6K2. Study of protein-protein interaction was performed by two-hybrid assay in yeasts. Due to SIHsp70 chaperone and co-chaperone SIDj1 act together, the interactions between the PepYMV proteins were tested with both the vegetable proteins. There was no detection of any interaction between PepYMV proteins and vegetable proteins, a single interaction was detected between SIHsp70 and SIDj1. Genetic transformation of tomato plants by *Agrobacterium tumefaciens* was carried out to induce silencing of the gene encoding the protein SIDj1. The silenced plants showed a lethality phenotype, and

this phenomenon did not allow the quantification of the PepYMV accumulation in processed tomato. These results suggest that SIHsp70 and SIDj1 proteins promote the viral infection indirectly, and that investigations in the PepYMV replication process can reveal interesting facts about the involvement of these proteins in infection.

1. INTRODUÇÃO

Os vírus que infectam plantas possuem um genoma pequeno e compacto, codificando, em média, de 3 a 10 proteínas. Apesar do número reduzido de proteínas de origem viral expressas durante a infecção, os sintomas e danos gerados são extremamente variáveis, refletem a adaptação do vírus ao hospedeiro e a eficiência da resposta de defesa da planta. Os vírus são responsáveis por uma ampla gama de doenças em diferentes espécies vegetais, causam grandes perdas econômicas e queda na produtividade de muitas culturas (Culver and Padmanabhan 2007).

O estabelecimento da infecção viral envolve as etapas de replicação do genoma, movimento célula-a-célula e movimento sistêmico ou vascular (Hull 2002). Para uma infecção eficiente, as proteínas virais necessitam interagir com fatores da célula hospedeira, manipulando vias metabólicas e coordenando interações bioquímicas e intermoleculares que favoreçam a doença. A infecção viral altera o perfil de expressão gênica do hospedeiro, a transcrição de diversos genes é ativada ou reprimida nas células infectadas (Adams et al. 2012; Alfenas-Zerbini et al. 2009; Babu et al. 2008a; Babu et al. 2008b; Baebler et al. 2009; Liu and Whitham 2013; Senthil et al. 2005; Yang et al. 2007).

Os estudos de interação vírus-hospedeiro tem fornecido respostas importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo da infecção. Diversos trabalhos demonstraram a relevância da associação entre os fatores do hospedeiro e as proteínas virais no estabelecimento da infecção. Entre eles, a interação entre *Viral genome-linked protein* (VPg) e o fator de tradução eIF4E, ou sua isoforma eIF(iso)4E foi demonstrada ser essencial para a infectividade viral e a mais bem estudada e caracterizada para diferentes potyvírus, infectando diferentes grupos de plantas (Lellis et al. 2002; Léonard et al. 2000; Nicaise et al. 2007; Wittmann et al. 1997).

No cenário agrícola muitas perdas econômicas estão relacionadas a infecção por vírus classificados na família *Potyviridae*. O gênero de maior importância da família é o *Potyvirus*, as espécies classificadas nesse gênero estão presentes em todas as regiões do mundo e infectam uma diversidade de monocotiledôneas e

dicotiledôneas (Gibbs and Ohshima 2010). A transmissão de uma planta para outra é realizada por afídeos de maneira não persistente (Adams et al. 2012). O genoma dos *Potyvirus* é composto por uma molécula de RNA linear fita simples sentido positivo. Apresenta uma sequência de 10.000 nt delimitada por uma cauda poliA na extremidade 3' e uma proteína de origem viral, denominada VPg, covalentemente ligada a extremidade 5'. O RNA viral apresenta uma única sequência aberta de leitura (*Open reading frame* - ORF) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 350 KDa, que sofre autoproteólise gerando em torno de 8 a 10 peptídeos maduros (Fauquet et al. 2005). Uma segunda ORF, denominada PIPO (*Pretty interesting Potyviridae ORF*), localiza-se sobreposta à ORF codificadora da poliproteína, e é expressa fusionada a extremidade N-terminal da P3. (Chung et al. 2008). O RNA viral é encapsidado por várias cópias da proteína capsidial, formando uma partícula alongada e flexuosa de 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro (Bock and Conti 1974).

Os relatos do potyvirus *Pepper Yellow Mosaic Virus* (PepYMV) no Brasil são recentes, ele passou a ocupar o nicho ecológico antes ocupado pelo potyvirus PVY (*Potato virus Y*), sendo os primeiros diagnósticos da virose identificados nos estados de São Paulo e Goiás (Inoue-Nagata et al. 2002). Atualmente o vírus tem representado perdas econômicas significativas em culturas de pimentão (*Capsicum annum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e pimenta em diferentes regiões do país (Cunha et al. 2004; Zambolim et al. 2004).

O estudo da expressão gênica de tomateiros infectados pelo PepYMV forneceu uma visão geral dos genes envolvidos no processo de infecção viral. Dentre os genes detectados como diferencialmente expressos nesse patossistema encontra-se o gene que codifica a proteína DnaJ (Alfenas-Zerbini et al. 2009). Em um estudo recente a co-chaperona DnaJ foi relacionada com o acúmulo do PepYMV, entretanto, ainda não se sabe ao certo em qual fase do ciclo viral ela está envolvida (Xavier 2012).

As proteínas Hsp70 e DnaJ atuam em conjunto, e estão envolvidas em processos celulares, tais como, enovelamento de proteínas, redobramento de proteínas desnaturadas, translocação de proteínas, regulação da degradação de proteínas e montagem e desmontagem de complexos proteicos (Hafren et al. 2010;

Hofius et al. 2007; Liu and Whitham 2013; Shimizu et al. 2009). O sinergismo entre a chaperona Hsp70 e a sua co-chaperona DnaJ é fundamental para a atividade ATPase da Hsp70 e para a promoção da ligação aos peptídeos substratos (Kampinga and Craig 2010; Mayer 2013).

A indução da expressão gênica de *Hsp70* e *DnaJ* foi associada a diferentes células infectadas por vírus (Jockusch et al. 2001; Mine et al. 2012; Verchot 2012). Hsp70 já foi relatada estar envolvida na replicação viral (Dufresne et al. 2008), no controle da expressão de proteínas virais (Hafren et al. 2010; Hofius et al. 2007) e na translocação de proteínas virais (Gorovits et al. 2013; Kunik et al. 1998). O envolvimento da DnaJ em processos infecciosos está relacionado a montagem dos complexos de replicação nas membranas (Tomita et al. 2003a) e ao movimento viral (Lu et al. 2009; Soellick et al. 2000).

O entendimento da interação entre proteínas virais e fatores do hospedeiro é extremamente importante uma vez que fornece informações para uma melhor compreensão dos mecanismos de patogênese, e para o desenvolvimento de estratégias que permitam o manejo das doenças no campo (Lellis et al. 2002; Lu et al. 2009). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a funcionalidade das proteínas Hsp70 e DnaJ no processo de infecção pelo potyvírus PepYMV.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A família Potyviridae

Potyviridae é a segunda maior família de vírus que infectam plantas, sendo superada apenas pela família *Geminiviridae*. A família *Potyviridae* compreende um grupo de oito gêneros, bem definidos (*Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*). A classificação do gênero é baseada na organização do genoma e no agente vetor. Todos os potyvírus formam inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, conhecidas como “cataventos”, sendo esta uma característica relevante para a caracterização de vírus pertencentes à família. Membros dessa família são facilmente transmitidos experimentalmente de plantas infectadas para plantas sadias por meio da inoculação via extrato tamponado (Mayo 1995; Zerbini and Zambolim 1999). Estudos recentes de metagenômica demonstraram que são encontrados em plantas selvagens em uma ampla distribuição geográfica (Ivanov et al. 2014; Roossinck 2012).

O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso da família *Potyviridae*, com 146 espécies descritas. Em conjunto, essas espécies infectam uma ampla gama de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas em diferentes regiões climáticas, causando grandes perdas econômicas em várias culturas importantes como, por exemplo o *Potato virus Y* (PVY) e *Potato virus A* (PVA). Estas duas espécies representam uma grande ameaça para a produção de batata em todo o mundo, pois podem reduzir a produtividade da cultura em 90% (Ivanov et al. 2014; Salazar 2003). Outro potyvírus importante é o *Plum pox virus* (PPV), que causa perdas consideráveis em fruteiras de clima temperado. Os vírus PVA e PPV foram classificados entre os 10 vírus de plantas com maior importância econômica e científica (Scholthof et al. 2011).

A transmissão dos potyvirus ocorre de maneira não-persistente por afídeos. As partículas virais são alongadas, flexuosas, com 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído de uma única molécula de RNA fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos (Figura1). 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 and Conti 1974; Di Piero et al. 2006).

A proteína capsidial dos potyvírus apresenta uma região amino-terminal altamente variável em tamanho e sequência, uma região central altamente conservada contendo de 215 a 227 aminoácidos, e uma região carboxi-terminal com 18-20 aminoácidos. As regiões amino e carboxi-terminal estão voltadas para o exterior da partícula viral, e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da proteína e, conseqüentemente, da partícula viral (Shukla et al. 1991). O RNA dos potyvírus é covalentemente ligado a uma proteína de origem viral ("genome-linked viral protein" VPg) em sua extremidade 5' (Reichmann 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 massa molecular de aproximadamente 350 kDa (Allison et al. 1986). Esta sofre autoproteólise dando origem a 8-10 produtos finais (Carrington et al. 1990). A principal consequência desse mecanismo de expressão gênica é que todas as proteínas virais originadas a partir da clivagem da poliproteína são produzidas em quantidades equimolares, independente da necessidade do vírus para cada proteína em particular. As proteínas produzidas em excesso se acumulam na célula infectada na forma de inclusões (Ivanov et al. 2014; Riedel et al. 1998). 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 and Zambolim 1999).

Uma segunda ORF denominada *Pipo* (*Pretty Interesting Potyviridae ORF*) localiza-se dentro da região codificadora da proteína P3, porém em uma fase de leitura +2 em relação a da poliproteína. Foi proposto que a tradução desta ORF se dá pela alteração no posicionamento do ribossomo durante a tradução, e resulta em um polipeptídeo com massa molecular de aproximadamente 25 KDa, condizente com o esperado para uma fusão entre a porção N-terminal da proteína P3 e a proteína PIPO (Chung et al. 2008; RajamaKi and Valkonen 2004).

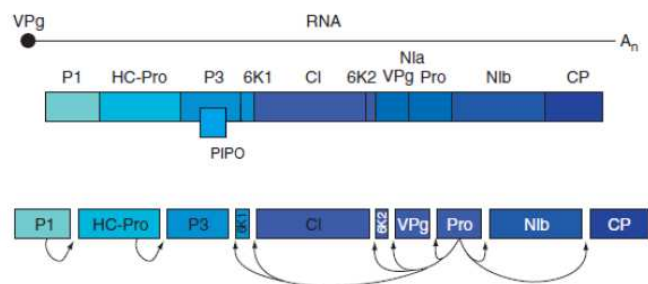


Figura 1: Organização típica do genoma de um potyvirus, indicação da poliproteína formada e as clivagens realizadas para a geração das proteínas maduras. Adaptado de López-Moya (2008)

Após a entrada do vírus na célula, ocorre sua desencapsidação. O RNA viral atua como um RNA mensageiro e sua tradução é necessária para as outras etapas do ciclo viral, pois codifica todas as proteínas virais. O RNA viral não apresenta CAP ligado a sua extremidade 5', 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 do *Tobacco etch virus* (TEV), e ambos atuam em conjunto para a tradução do RNA viral (Niepel and Gallie 1999). No caso do 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). Existem controvérsias quanto à maneira pela qual ocorre o processo de tradução dos potyvirus. Para o *Turnip mosaic virus* (TuMV) evidências indicam que a tradução ocorre por meio de iniciação interna (Basso et al. 1994). Entretanto, trabalhos realizados com o *Plum pox virus* (PPV) indicaram que, para esse vírus, a tradução se inicia pelo mecanismo de *leaky scanning* (Simón-Buela et al. 1997) É possível que potyvirus distintos utilizem estratégias diferentes para a tradução do genoma, ou que ambas as estratégias sejam utilizadas em conjunto. Uma vez sintetizada, a poliproteína sofre auto-proteólise pela ação das regiões que vão gerar a P1, HC-Pro e NIa, sendo esta última a responsável pela maior parte das clivagens (Carrington and Dougherty 1988).

As proteínas codificadas pelos potyvirus são multifuncionais, essa característica minimiza os efeitos ocasionados pela limitação do genoma pequeno. Cada proteína é

responsável por diferentes funções durante o ciclo de infecção. P1 é uma protease e está envolvida na tradução da poliproteína; Hc-Pro, apresenta atividade na supressão do silenciamento, é uma protease e está envolvida na transmissão viral via inseto vetor; 6K1, um pequeno peptídeo com função desconhecida; CI; uma RNA helicase com atividade ATPase e envolvimento no movimento célula a célula via plasmodesma; 6K2, um pequeno peptídeo é responsável por ancorar os complexos de replicação às membranas do retículo endoplasmático; Vpg, envolvida na replicação viral; NIa, atividade protease; NIb, RNA polimerase dependente de RNA; CP, atua no movimento viral, transmissão pelo inseto vetor e encapsidação da partícula; P3N-Pipo, está envolvida no movimento célula a célula (Ivanov et al. 2014; Urcuqui-Inchima et al. 2000).

A replicação dos potyvirus ocorre no citoplasma, entretanto, algumas proteínas virais são transportadas para o núcleo e apresentam sinal de localização nuclear (NLS), a função dessas proteínas no núcleo ainda é pouco compreendida (Ivanov et al. 2014).

O estabelecimento da infecção por potyvirus envolve algumas proteínas virais e diversos fatores do hospedeiro. Como exemplo de proteína viral, podemos citar a 6K2, ela apresenta um domínio transmembrana que se associa a membrana do retículo endoplasmático e induz a formação das vesículas replicativas conhecidas como virossomos ou fábricas virais (Schaad et al. 1997). As vesículas induzidas pela 6K2 do *Turnip mosaic virus* (TuMV) foram associadas ao plasmodesma, demonstrando que apresentam a capacidade de mover célula a célula (Grangeon et al. 2013). Cada vesícula é proveniente de um único RNA viral e já foi comprovado que elas transitam por microfilamentos de actina (Cotton et al. 2009; Grangeon et al. 2013). Elas co-localizam nos sítios de saída do retículo (ERES-ER Exit Sites) com proteínas do sistema secretório COPII (Coat protein complex II) e induzem a formação de uma estrutura perinuclear envolvendo membranas de retículo endoplasmático, cloroplasto, Golgi e complexo COPII (Grangeon et al. 2012; Wei and Wang 2008).

2.2. PepYMV

O *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) pertence ao gênero *Potyvirus* e atualmente encontra-se distribuído por todo o Brasil (Dianese et al. 2008). Foi encontrado inicialmente no estado de São Paulo e no Distrito Federal, infectando plantas de pimentão (*Capsicum annum*), em plantas apresentando sintomas de mosaico amarelo e deformação foliar (Inoue-Nagata et al. 2002). Desde então, a ocorrência do PepYMV foi detectada em diferentes regiões do Brasil, sendo a alta incidência relatada em culturas de tomate e pimentão (Ávila et al. 2004; Dianese et al. 2008; Inoue-Nagata et al. 2002; Truta et al. 2004). O genoma completo do PepYMV foi sequenciado a partir de uma amostra coletada em uma região produtora de pimentão do Distrito Federal. A análise do genoma mostrou a organização típica de um potyvírus. O PepYMV foi agrupado filogeneticamente dentro do grupo do PVY, estando mais relacionado ao *Pepper mottle virus* (PepMoV), como comumente ocorre com potyvírus da América do Sul (Lucinda et al. 2012).

Com o objetivo de entender os mecanismos moleculares envolvidos no processo infeccioso do PepYMV foi construída uma biblioteca subtrativa a partir de folhas de tomateiro, 72 horas após inoculação. Foram identificados 881 genes como diferencialmente expressos, dentre eles genes envolvidos em resposta a diferentes estresses abióticos e bióticos (Alfenas-Zerbini et al. 2009). A indução das proteínas vegetais *Translationally controlled tumor protein* (TCTP) e DnaJ, altamente conservadas em eucariotos, foi relacionada com o aumento no acúmulo do PepYMV em plantas infectadas podendo indicar que essa indução é importante para o processo de infecção viral (Bruckner 2012; Xavier 2012).

2.3 Interação planta-potyvirus

Uma série de alterações no padrão de expressão gênica e no proteoma de plantas e animais são relatadas durante a infecção viral. Esse efeito na fisiologia dos

hospedeiros pode ser interpretado como um conjunto de processos que atuam simultaneamente, alguns na defesa antiviral e outros criando um ambiente mais favorável para a replicação e a disseminação do vírus no hospedeiro (Babu et al. 2008a; Senthil et al. 2005; Vahey et al. 2002; Whitham et al. 2003).

Ao longo da co-evolução entre patógeno-hospedeiro, uma pressão de seleção complexa e dinâmica é estabelecida, diversos processos adaptativos de ataque do patógeno e contra ataque do hospedeiro são desenvolvidos quase que simultaneamente (Rainey and Travisano 1998). Para que o patógeno alcance uma vantagem seletiva é necessário suprimir ou neutralizar as respostas de defesa do hospedeiro, várias vias metabólicas e interações bioquímicas são desencadeadas para o estabelecimento da infecção (Scaria et al. 2006).

O padrão de expressão gênica da célula hospedeira é alterado em consequência da infecção viral, seja por meio da indução de genes essenciais para o ciclo de infecção ou genes de resposta de defesa do organismo infectado. Análises do transcriptoma, proteoma e metaboloma de células hospedeiras infectadas tem sido extensivamente descritos para uma melhor compreensão sobre a biologia molecular dos potyvirus (Agudelo-Romero et al. 2008; Alfenas-Zerbini et al. 2009; Babu et al. 2008a; Baebler et al. 2009; Prashch and Sonnewald 2013; Whitham et al. 2003; Yang et al. 2007; Yang et al. 2011).

Nos potyvirus a multifuncionalidade das proteínas e a integração de fatores do hospedeiro são duas adaptações importantes que evitam a necessidade de informações adicionais no genoma. Os genes da célula hospedeira regulados por infecções virais são possíveis candidatos para caracterização funcional das interações moleculares que favorecem o ciclo viral (Babu et al. 2008a).

Análises de microarranjo em tecidos foliares de *A. thaliana* infectadas com *Plum pox virus* (PPV) identificaram 2013 genes sendo regulados positivamente e 1457 negativamente. As alterações na expressão dos genes foram associadas a infecção propriamente dita e a indução de sintomas. A comparação entre os genes regulados em células inoculadas com PPV e com outros vírus de RNA senso positivo indicaram um conjunto comum de 416 genes, provavelmente eles representam uma importante

função no desenvolvimento do patógeno (Babu et al. 2008a). Genes relacionados a estresse biótico e abiótico, expressão de fatores de transcrição e aumento da expressão de proteínas do choque térmico foram relatados em análise de *A. thaliana* infectada com *Tobacco etch* vírus (TEV) (Agudelo-Romero et al. 2008).

A construção de bibliotecas subtrativas de cDNA pode ser utilizada para a comparação entre os genes diferencialmente expressos em plantas resistentes e suscetíveis a um determinado patógeno. Duas cultivares de batata, uma resistente e outra suscetível ao *Potato virus Y* (PVY), foram avaliadas no estágio inicial da infecção. Os genes reprimidos nas cultivares suscetíveis e induzidos na resistente estavam envolvidos com a biossíntese de brassinoesteróides, metabólitos secundários e poliaminas, além dos que codificam proteínas relacionadas a patogênese (PR) (Baebler et al. 2009).

O perfil de expressão gênica de plantas de tomate foi avaliado 72 horas após a inoculação com o PepYMV por meio de uma biblioteca subtrativa de cDNA. Vários genes que apresentaram o nível de expressão alterado foram relatados, dentre eles, genes que codificam proteínas envolvidas na defesa, regulação do ciclo celular, fatores de transcrição, resposta a estresses abióticos e ubiquitinas (Alfenas-Zerbini et al. 2009).

Durante as últimas décadas o número de estudos direcionados a interação proteína- proteína apresenta uma escala crescente de desenvolvimento. O efeito estabelecido por essas associações está envolvido em uma ampla gama de processos biológicos. Na virologia, investigações nessa área podem contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares da infecção viral e da defesa do hospedeiro. Diferenciadas técnicas como co-immunoprecipitação, cromatografia (Belanger 2009), duplo e triplo híbrido em leveduras (Cagney et al. 2011; Parrish et al. 2006), purificação de afinidade acoplada com espectrometria de massas (Abu-Farha et al. 2008) e BiFC (Bhat et al. 2006) tem contribuído para a identificação de interações patógeno-hospedeiro.

A interação entre Vpg do TuMV e o fator de iniciação da tradução eIF4E ou sua isoforma, eIF (iso)4E foi inicialmente descrito por Wittmann et al. 1997. Essa

interação já foi identificada em diferentes patossistemas potyvirus-hospedeiro e comprovada ser essencial para infectividade do vírus (Lellis et al. 2002; Léonard et al. 2000; Nicaise et al. 2007). Possivelmente, a interação está envolvida no aumento da competitividade dos RNAs virais perante os mRNAs do hospedeiro pela maquinaria de tradução (Eskelin et al. 2011).

Análises de duplo híbrido em leveduras e BiFC demonstraram que a CP do PVY interage com a proteína do tabaco NtCPIP. Plantas transgênicas expressando as formas mutantes da proteína NtCPIP foram infectadas com PVY e o acúmulo viral nessas plantas foi drasticamente reduzido. Os resultados indicavam que a interação CP-NtCPIP estava envolvida na montagem do virion e propagação celular (Hofius et al. 2007). Em um estudo posterior foi demonstrado que NtCPIP e Hsp70 estão envolvidas na regulação da expressão da proteína CP, sendo essa regulação essencial para que replicação e tradução sejam acopladas em um mesmo complexo em células infectadas com o *Potato virus A* (PVA) (Hafren et al. 2010). Esses resultados concordam com uma pesquisa em plantas infectadas por TuMV que detectou a presença de diferentes fatores de tradução nas vesículas replicativas, e propôs que os mecanismos de replicação e tradução estavam acoplados em um mesmo complexo (Thivierge et al. 2008).

Estudos em *Arabidopsis thaliana* identificaram interação entre a RdRp do TuMV e as proteínas do hospedeiro PABP e Hsc70. Os autores sugerem que as duas proteínas estão associadas ao complexo de replicação e podem exercer papel importante na regulação das funções da RdRp em potyvirus (Dufresne et al. 2008).

A proteína calreticulina é altamente conservada em plantas. Ela é induzida nos estágios iniciais da infecção e provavelmente atua como uma resposta de defesa e envolve a sinalização celular mediada por cálcio. Interação entre a proteína Hc-Pro do *Papaya ringspot virus* (PRSV) e a calreticulina foi identificada em diferentes células hospedeiras, provavelmente essa associação favoreça a infecção viral pela interferência negativa na via de defesa da planta (Shen et al. 2010).

As proteínas PpDDXL e AtRH8 são homólogas da RNA helicase tipo “DEAD-box”. Interação entre estas proteínas e Vpg foram encontradas em dois potyvirus distintos, PPV e TuMV, respectivamente. Observação de *A. thaliana*

mutantes para o gene *atrh8* demonstraram que o desenvolvimento vegetal não é alterado, mas quando essas plantas são infectadas com PPV ou TuMV a replicação do vírus é comprometida. Esses resultados indicam que o gene *atrh8* tem um alto potencial para ser utilizado em programas de melhoramento de plantas (Huang et al. 2010).

A proteína CI produz estruturas cônicas que se estendem através do plasmodesma e são direcionadas pela proteína P3N-PIPO (Wei et al. 2010). Um estudo recente demonstrou que P3N-PIPO tem a capacidade de associar-se a uma proteína da membrana plasmática da célula hospedeira denominada como PCaP1. Os autores sugerem que a interação auxilia a conexão do RNA viral com os plasmodesmas e que este mecanismo está envolvido no movimento célula a célula do vírus (Vijayapalani et al. 2012).

Uma proteína associada ao microtúbulo denominada como HIP2 foi demonstrada por interagir com Hc-Pro em *S. tuberosum*. A indução do silenciamento do gene *hip2* em plantas infectadas com PVA corroborou com uma diminuição significativa do acúmulo viral. A associação dos vírus com microtúbulos de plantas pode estar relacionada a reorganização do retículo endoplasmático para a finalidade de replicação viral (Haikonen et al. 2013). Outro grupo de pesquisa identificou as proteínas de retículo SNARES (Soluble N-ethyl-maleimide-sensitive-factor attachment protein receptor), Syp e Vap27-1 sendo translocadas para os cloroplastos pela proteína viral 6K₂. Vap27-1 atua como uma conexão entre Syp71 e 6K₂, as três proteínas localizam-se na junção entre os cloroplastos e o silenciamento de Syp71 reduz o acúmulo viral em protoplastos, sugerindo que esta proteína atua na replicação viral (Wei et al. 2013).

Em um estudo recente foi demonstrado que a proteína VPg está envolvida na supressão do silenciamento de RNA. Diferente da Hc-Pro que é uma supressora do silenciamento induzido por RNA fita dupla, VPg está envolvida na amplificação do silenciamento mediado pela fita senso. A proteína VPg do PVA e SGS3 de *Solanum tuberosum* co-localizam com RdRP em pequenos corpos citoplasmáticos. A interação entre VPg e SGS3 interfere na etapa de supressão do silenciamento, provavelmente isso ocorra devido a estabilização ou proteção do RNA viral contra a

degradação (Rajamaki et al. 2014).

Com o avanço das técnicas genômicas tem sido possível a montagem de redes de interação proteína-proteína, isso ocorre através da representação visual de um mapa completo com análises *in silico* simultâneas de milhares de interações ocorrendo ao mesmo tempo (Bosque et al. 2014). O entendimento dessas interações podem fornecer dados importantes para o desenvolvimento de medidas de controle das doenças virais em plantas (Elena e Rodrigo 2012).

2.4 Proteínas do hospedeiro Hsp70 e DnaJ

As chaperonas moleculares participam na regulação de vários processos biológicos para manter a homeostase celular. HSPs são proteínas de choque térmico e estão entre as mais bem caracterizadas. Elas são classificadas com base no peso molecular em: pequenas proteínas HSPs, Hsp40 (DnaJ), Hsp60 (chaperoninas), Hsp70, Hsp90 e Hsp100. Os genes da maior parte das chaperonas são expressos constitutivamente, mas podem ser induzidos em resposta a estresses abióticos e bióticos (Gupta et al. 2010).

As proteínas da família Hsp70 são filogeneticamente conservadas com homólogos funcionais nos três domínios da vida. Possuem diferentes funções na célula, sendo que dentre elas, o envolvimento no dobramento de proteínas recém-sintetizadas, no redobramento de proteínas mal dobradas ou agregados de proteína, translocação de proteínas secretoras e organelares, montagem ou desmontagem de complexos proteicos, degradação de proteínas e como receptores para sinalização, tais como receptores de hormônios esteróides e certas proteínas quinases (Hartl and Hayer-Hartl 2002; Mayer 2013; Mayer and Bukau 2005; Young et al. 2004). Em quase todos os tipos de células estão presente no citoplasma, retículo endoplasmático, e mitocôndias (Gupta et al. 2010; Mayer 2013; Xiao et al. 2010).

Uma característica importante que permite a proteína Hsp70 reconhecer uma ampla gama de proteínas como substrato está associada ao reconhecimento de um

motivo degenerado curto que é encontrado a cada 30-40 resíduos de quase todas as proteínas. Esse motivo encontra-se principalmente no núcleo hidrofóbico e é disponibilizado apenas quando as proteínas não estão dobradas ou quando estão desnaturadas (Kampinga e Craig 2010; Mayer 2013). A estrutura geral da Hsp70 consiste de um domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD) de 45 kDa na porção N-terminal e um domínio de ligação ao substrato (SBD) de 28 kDa na porção C-terminal (Mayer and Bukau 2005).

Um mecanismo de controle alostérico entre os domínios NBD e SBD controla os estados conformacionais da Hsp70. A hidrólise de ATP é essencial para a atividade da proteína, os substratos encontram Hsp70/ATP com alta taxa de associação e induzem a hidrólise de ATP, em seguida são presos a Hsp70/ADP sendo a taxa de dissociação baixa. Esse mecanismo aumenta a afinidade de Hsp70 a polipeptídeos de alta grandeza (Mayer 2013). A atividade de hidrólise de ATP de Hsp70 é fraca, entretanto, a interação com a co-chaperona DnaJ favorece a hidrólise e promove a ligação do substrato a proteína Hsp70. A liberação do substrato é estimulada pela interação da Hsp70 com outra co-chaperona, a NEF, caracterizada como essencial para promover a dissociação entre o substrato e ADP (Kampinga and Craig 2010).

As proteínas DnaJ representam uma família de co-chaperonas que também podem ser denominadas como Hsp40 (Qiu et al. 2006). A família dessas proteínas apresenta como característica principal um domínio J conservado de 70 a 80 aminoácidos e um motivo invariável composto por quatro α -hélices e uma sequência tripeptídica de His, Pro e Asp (motivo HPD) (Rajan and D'Silva 2009). Além do domínio J, as DnaJs possuem outros domínios conservados que permitem a classificação destas proteínas em quatro classes. A classe I apresenta o domínio J, um domínio rico em Gly/Phe, um domínio dedo de zinco e um domínio pouco conservado na região C-terminal; a classe II apresenta ausência do domínio dedo de zinco; a classe III apresenta apenas o domínio J e a classe IV, uma J-like que apresenta sequência e estrutura semelhante ao domínio J diferindo apenas no motivo HPD que está ausente (Liu and Whitham 2013; Rajan and D'Silva 2009).

A indução da expressão de genes que codificam proteínas chaperonas e co-

chaperonas tem sido relatada em diferentes plantas e animais infectados por vírus. Entre as chaperonas, as proteínas Hsp70 e DnaJ são as mais comumente relacionadas a processos de infecção viral (Aparicio et al. 2005; Chen et al. 2008). Podem ter a sua expressão alterada em decorrência de alguns fatores, dentre eles, o envolvimento no dobramento das proteínas virais recém-sintetizadas (Jockusch et al. 2001); regulação da replicação viral (Mine et al. 2012); movimento célula a célula e sistêmico; montagem e encapsidação da partícula viral; e formação dos complexos de replicação ancorados a membrana (Verchot 2012).

O envolvimento de proteínas com o domínio DnaJ já foi descrito em vários processos de infecção viral em plantas. Durante a infecção pelo bromovírus *Brome mosaic virus* (BMV), DnaJ participa da montagem dos complexos de replicação nas membranas (Tomita et al. 2003b). Em plantas infectadas pelo tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) foi demonstrado que DnaJ é capaz de interagir com a proteína NSm, envolvida no movimento viral (Soellick et al. 2000), além de interagir com a proteína capsidial (CP) e com PC4 do tenuivírus *Rice stripe virus* (RSV) (Lu et al. 2009).

A indução da expressão de chaperonas HSP70 já foi associada ao estabelecimento do processo infeccioso de alguns vírus. Dentre eles, auxilia na replicação do (TuMV) por meio da interação com a RNAPolimerase dependente de RNA (Dufresne et al. 2008); interfere na expressão de genes do PVA através da interação entre o complexo HSP70, CPIP e CP (Hafren et al. 2010); é essencial para a localização e inserção das proteínas de replicação do *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) nas membranas organelares (Pogany and Nagy 2008; Wang et al. 2009). No processo infeccioso do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) foi demonstrado que a interação CP-Hsp70 facilita a translocação da CP entre o citoplasma e o núcleo (Gorovits et al. 2013). A associação dessa interação com o processo de replicação e multiplicação do vírus é reforçada pelo envolvimento da CP do TYLCV na importação do DNA viral para o núcleo (Kunik et al. 1998).

As proteínas Hsp70 e Hsp90 são requeridas para a replicação do *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV), ambas interagem com p27 e co-localizam no retículo endoplasmático. Na ausência do vírus as proteínas do hospedeiro foram

observadas no núcleo e no citoplasma e dificilmente foram localizadas no retículo endoplasmático (Mine et al. 2012). Além disso, o envolvimento da Hsp70 e Hsp90 juntamente com suas co-chaperonas já foi relatado no silenciamento pós transcricional de genes. Acredita-se que ambas as proteínas auxiliam a incorporação dos pequenos RNAs nas proteínas argonautas (Mine et al. 2012).

Os closteovírus codificam uma proteína homologa a Hsp70 celular, esse fato reforça a funcionalidade das Hsp70 celulares no processo infeccioso. A Hsp70 presente no *Citrus tristeza virus* (CTV) está envolvida com a proteína p61 na montagem das partículas virais (Satyanarayana et al. 2000). Existem relatos de co-localização da Hsp70h com miosinas vegetais, miosina da classe VIII foram identificadas juntamente com Hsp70h do closteovirus *Beet yellows virus* (BYV) e estão relacionadas ao movimento via plasmodesma.

Dessa forma, o estudo de proteínas chaperonas é relevante, uma vez que estas apresentam importantes funções celulares, e já foram relatadas como fatores do hospedeiro recrutados para diversos mecanismos de proliferação dos vírus que infectam plantas. A compreensão da atuação de fatores do hospedeiro que favorecem a infecção viral é importante para o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas em busca do manejo da doença no campo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolado viral

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

3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração de RNA foram utilizadas aproximadamente 100 mg de folhas de *Solanum lycopersicum* maceradas em nitrogênio líquido. A extração foi realizada utilizando-se o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose (1,0%). A quantificação e a pureza do RNA extraído foi avaliada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A síntese do cDNA foi realizada a partir de dois microgramas de RNA tratados com DNase I (Promega), utilizando-se oligo (dT) e a enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) conforme as orientações do fabricante. O cDNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000.

3.3 Amplificação e clonagem da região codificadora do gene *hsp70*

Para amplificação da região codificadora completa do gene *Hsp70* de *S. lycopersicum* foram utilizados os oligonucleotídeos 5'HSP70Sall (5'AAAGTCGACATGGCCGGAAAAGGTG3') e 3'HSP70NotI (5'ATAGCGGCCGCTTAATCAACCTCCTC3'), desenhados com base na sequência de *Hsp70* de tomateiro disponível no genbank (NM_001247562.1).

O fragmento amplificado foi clonado em vetor pGEM T-easy (Promega) conforme as recomendações do fabricante. Células competentes de *Escherichia coli* DH5 α foram transformadas por choque térmico (Sambrook and Russel 2001). A extração de DNA plasmidial dos transformantes foi realizada utilizando o kit Quiagem plasmid de acordo com as recomendações do fabricante, e a clonagem confirmada por análise de restrição e sequenciamento (Macrogen, Inc.,Seul, Coréia do Sul).

3.4 Análise da sequência do gene *hsp70* e *dnaJ*

A sequência do gene *hsp70* de tomate foi analisada utilizando as ferramentas BLASTn, BLASTx (Altschul et al. 1990) e Clustal W (Thompson et al. 1994). A tradução da sequência de nucleotídeos foi realizada pelo programa *translate tool* (<http://web.expasy.org/translate/>) e a busca por domínios conservados pelo programa *conserverd domains CDD* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>). A sequência dos genes que codificam as isoformas das proteínas Hsp70 e DnaJ no genoma do tomateiro foi realizada utilizando o banco de dados *Phytozome* v 9.1

(<http://www.phytozome.net/>) e predição da localização subcelular dessas proteínas foi realizada pelo programa *Cello v 2.5 subcellular localization predictor* (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)

3.5 Duplo-híbrido

As sequências codificadoras da HSP70 citosólica (NM_001247562.1) e da DnaJ classe 1, de *S. lycopersicum* e proteínas do Pep YMV (Cascardo 2011) foram clonadas no vetor de entrada pENTR11 (Invitrogen) e transferidas para os vetores de expressão em leveduras pDEST32 (Invitrogen) e pDEST22 (Invitrogen) utilizando a enzima LR clonase (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante.

As construções clonadas no vetor pDEST32 foram transformadas em *Saccharomyces cerevisiae* estirpe AH109 pelo método do acetato lítio (Gietz et al. 1992) e os transformantes foram selecionados em meio de cultura *Synthetic Dropout* (SD) (Sigma, St. Louis, MO) sem leucina (Leu⁻). Os transformantes foram co-transformados com as construções clonadas no vetor pDEST22 e os transformantes foram selecionados em meio SD sem leucina e triptofano (Leu⁻, Trp⁻). As construções foram confirmadas por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para amplificação das proteínas virais do PepYMV e as proteínas Hsp70 e DnaJ.

Os ensaios foram montados em duplicatas, um para avaliar a interação entre a proteína Hsp 70 e as proteínas do Pep YMV e o outro para DnaJ e proteínas do Pep YMV. A análise da interação direta entre as proteínas estudadas foi avaliada pelo crescimento das leveduras transformadas em meio SD sem leucina, triptofano e histidina (Leu⁻, Trp⁻, His⁻), suplementado com 1,5mM de 3 aminotriazole (3AT) . Como controle positivo foi utilizado cultura de leveduras transformadas com a construção pDest32-NIa e pDest22-NIb, duas proteínas virais que sabidamente interagem (Lee et al. 2002). Com o intuito de evitar possíveis falsos positivos, culturas transformadas com o vetor pDest22 vazio e pDest32-Hsp70 ou pDest32-DnaJ foram utilizadas para testar a capacidade de transativação das proteínas.

3.6 Obtenção de linhagens de *S. lycopersicum* transgênicas silenciadas para o gene *dnaJ*

A construção pK7WIW-DnaJ (Valente) foi transformada na estirpe *A. tumefaciens* GV3101 de acordo com (Brasileiro and Carneiro 1998b).

Sementes da cultivar de tomate '*Moneymaker*' foram desinfetadas por imersão em solução etanol 70% por um minuto, seguida por imersão por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2%. Após a desinfestação, as sementes foram germinadas em meio de cultura MS meia força (Murashige and Skoog 1962) acrescido de mio-inositol a 0,050 g/L, sacarose 2% (p/v), 5 g/l de ágar-ágar e vitaminas de (Nitsch and Nitsch 1969). Após a germinação, os hipocótilos foram seccionados e pré-cultivados por 48 horas na ausência de luz em meio de regeneração composto por sais MS força total (Murashige and Skoog 1962) adicionado de vitaminas de Nitsch e Nitsch, zeatina a 0,001 g/L, sacarose a 2 g/L, e acetoseringona 100 µM. A transformação foi realizada como descrito por (Frery and Earle 1996).

3.7 Confirmação da inserção do T-DNA

Material vegetal dos explantes regenerados foi utilizado para a extração de DNA total (Doyle and Doyle 1987). A confirmação da inserção do T-DNA no genoma do tomateiro foi realizada por PCR com o par de oligonucleotídeos p35S-F (5'-GCT CTA CAA ATG CCA TCA-3') e DnaJ-R (5'GTG CAC CAC GCA TGT CT-3'), correspondente à região entre a extremidade 5' do promotor 35S do CaMV e a extremidade 3' do gene *DnaJ*.

3.8 Localização subcelular do gene *hsp70*

Plantas de *Nicotiana benthamiana* foram crescidas em casa-de-vegetação por aproximadamente 30 dias. Após esse período as plantas foram transferidas para câmara de crescimento a 22°C com um fotoperíodo de 16 horas. A região codificadora do gene *Hsp70* foi clonada no vetor pK7WGF2 que expressa a proteína GFP na porção amino terminal da proteína para determinar a localização subcelular da Hsp70. A clonagem foi realizada por recombinação homóloga utilizando-se a enzima LR clonase de acordo com as orientações do fabricante. A construção pK7WGF2-Hsp70 foi transformada em *A. tumefaciens* GV3101 pelo método do choque térmico (Brasileiro and Carneiro 1998a). As culturas de *A. tumefaciens* transformadas foram incubadas em meio LB acrescido dos antibióticos estreptomicina, espectiomicina e gentamicina sob rotação de 250 rpm a 28 °C. Quando atingiram a OD₆₀₀ de 0,6 foram centrifugadas a 8600g por 5 minutos. As células foram ressuspensas em tampão de agroinfiltração (MgCl₂ 10mM, MES10mM e acetoseringona 200µM) ajustando-se a OD₆₀₀ para 0,3. Plantas de *N. benthamiana* com infecção pelo PepYMV já estabelecida (12 dias antes da agroinfiltração) e plantas sadias foram agroinfiltradas com a cultura de *A. tumefaciens* contendo a construção descrita.

A face abaxial de folhas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas com a utilização de seringas estéreis sem agulha, pressionando-se levemente a epiderme das folhas. Plantas controle foram infiltradas apenas com o tampão de inoculação. As folhas infiltradas foram observadas em microscópio confocal LSM 510 META (Carl Zeiss) 48 horas após a infiltração. As imagens foram processadas com auxílio do software LSM Image Browser 4 (Carl Zeiss) e do programa Adobe Photoshop 7.0.1.

4. Resultados e Discussão

4.1 Análise da sequência do gene *hsp70*

A região codificadora correspondente à proteína Hsp70 citosólica de *Solanum lycopersicum* (SlHsp70) foi clonada e sequenciada. Análise da sequência mostrou que a proteína clonada apresenta 650 aminoácidos, uma massa molecular estimada em 70 KDa e todos os domínios conservados típicos de uma chaperona Hsp70 (Fig. 2). A porção N-terminal (43 KDa) possui um domínio de ligação à nucleotídeo (NBD) e a C-terminal (27 KDa) um domínio de ligação ao substrato (SDB). O motivo DLLLLD conecta o domínio NBD ao SDB. A presença desse motivo interligante é conservada em procariotos e eucariotos, e atua como um ligante flexível entre os dois domínios, onde a mudança de angulação controla a afinidade da proteína à ATP/ADP e ao peptídeo substrato (Bertelsen et al. 2009).

Outro motivo conservado entre as Hsps70 citosólicas é o EEVD, ele tem sido relatado como sítio de interação a proteínas que apresentam repetições tetratricopeptídicas (TPR). O motivo TPR está envolvido na formação de complexos multiproteicos relacionados a diversos processos celulares, tais como a transcrição, ciclo celular, translocação de proteínas, degradação de proteínas, e defesa do hospedeiro contra patógenos invasores (Allan and Ratajczak 2011). Conforme descrito na literatura, o domínio NBD, também conhecido como domínio ATPase, apresenta sítios de ligação para reconhecimento das proteínas NEFs, BAG e DnaJ (Kabani et al. 2002; Kampinga and Craig 2010; Sondermann et al. 2001)

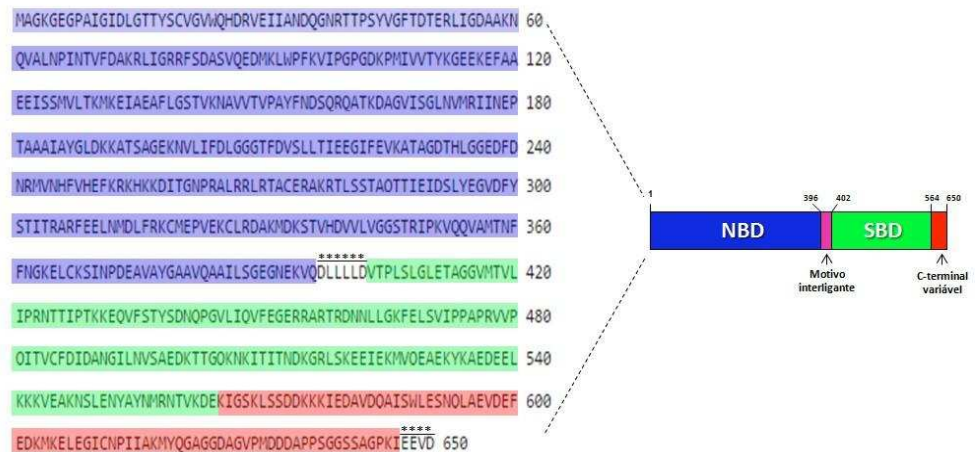


Figura 2: Domínios conservados na sequência de aminoácidos da proteína Hsp70 citosólica de *S. lycopersicum*. Domínio NBD (azul); interligante entre os domínios (rosa); SBD (verde); C-terminal variável (vermelho). Os traços na sequência indicam os motivos DLLLLD e EEVD.

Análise no banco de dados *Phytozome* v 9.1 (<http://www.phytozome.net/>) indicou a presença de 22 isoformas da proteína Hsp70 no genoma *S. lycopersicum*. Com o auxílio da ferramenta *Cello* v 2.5 *subcellular localization predictor* (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) foi possível prever a localização subcelular dessas proteínas, elas foram preditas em diferentes compartimentos celulares como citoplasma, mitocôndria, cloroplasto e retículo endoplasmático (Tabela 1). Uma análise filogenética incluindo a proteína SHsp70 e todas as outras isoformas de Hsp70 do *S. lycopersicum* revelou uma alta conservação das sequências e a presença de cinco clados distintos. O agrupamento das proteínas teve uma relação direta com a predição da sua localização subcelular (Figura 3).

Tabela 1: Localização física em pb de bases dos genes *hsp70* nos cromossomos de tomateiro, peso molecular e predição da localização subcelular das proteínas Hsp70.

Proteína	Cromossomo	Massa molecular (kDa)	Predição localização subcelular
SIHsp70	6	71,3	Citoplasmática
Solyc06g076020.2.1	6	71,2	Citoplasmática
Solyc11g066060.1.1	11	77,15	Citoplasmática
Solyc09g010630.2.1	9	77,88	Citoplasmática
Solyc10g086410.2.1	10	77,28	Citoplasmática
Solyc11g066100.1.1	11	78,48	Citoplasmática
Solyc04g011440.2.1	4	78,12	Citoplasmática
Solyc03g117630.1.1	3	78,48	Citoplasmática
Solyc07g005820.2.1	7	78,48	Citoplasmática
Solyc03g082920.2.1	3	80,04	Ret. Endoplasmático
Solyc08g082820.2.1	8	79,92	Ret.endoplasmático
Solyc01g099660.2.1	1	80,28	Ret. Endoplasmático
Solyc06g052050.2.1	6	74,28	Ret. Endoplasmático
Solyc01g106260.2.1	1	80,4	Mitocondrial
Solyc01g106210.2.1	1	81,72	Mitocondrial
Solyc11g020040.1.1	11	83,04	Cloroplasto
Solyc01g103450.2.1	1	84,36	Cloroplasto
Solyc12g043120.1.1	12	69,12	Citoplasmática
Solyc12g043110.1.1	12	101,52	Citoplasmática
Solyc02g080470.2.1	2	90,36	Citoplasmática
Solyc07g043560.2.1	7	106,8	Citoplasmática
Solyc09g0759501.1	9	63,73	Citoplasmática

hospedeiros suscetíveis. Os estudos mostram o envolvimento das proteínas AtHsp70 e NbHsp70 no processo de replicação viral (Dufresne et al. 2008; Mine et al. 2012). A proteína NtHsp70 foi descrita como importante para controle da expressão gênica da CP, esse controle é fundamental para que o processo de replicação e tradução viral sejam acoplados em um mesmo complexo (Hafren et al. 2010). O resultado do alinhamento demonstra o elevado grau de conservação entre as proteínas dessa classe em diferentes espécies de plantas (Figura 4). Essa alta similaridade sugere que a Hsp70 citosólica de tomate pode ser um fator do hospedeiro importante para o estabelecimento da infecção viral.

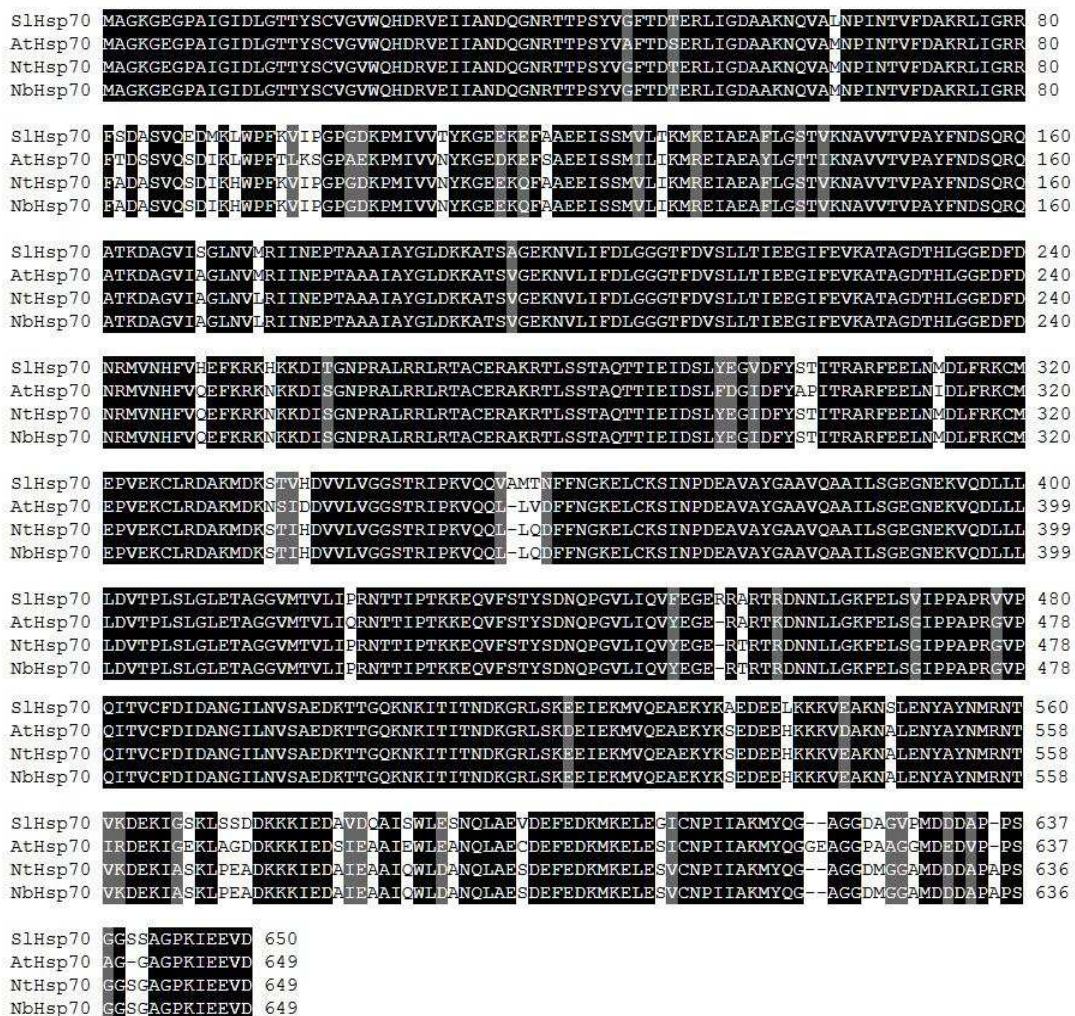


Figura 4: Alinhamento da sequência dos aminoácidos deduzidos da proteína SlHsp70 com AtHsp70; NtHsp70 e NbHsp70 usando os programas *Mega* e o *Color Align Conservation*. Regiões de identidade são sombreadas em preto. Sombreado branco sinaliza a região onde a SlHsp70 difere das outras três proteínas. Sombreado cinza sinaliza a mudança de aminoácido entre alguma das proteínas AtHsp70, NtHsp70 e NBHsp70.

Uma árvore filogenética com os homólogos das co-chaperonas DnaJ tipo 1 em *N. benthamiana* e *S. lycopersicum* indicam uma alta conservação entre as sequências e reforçam os indícios de que SIDj1 (Solyc05g055160.2.1) está envolvida em alguma etapa do estabelecimento da infecção do PepYMV (Figura 5).

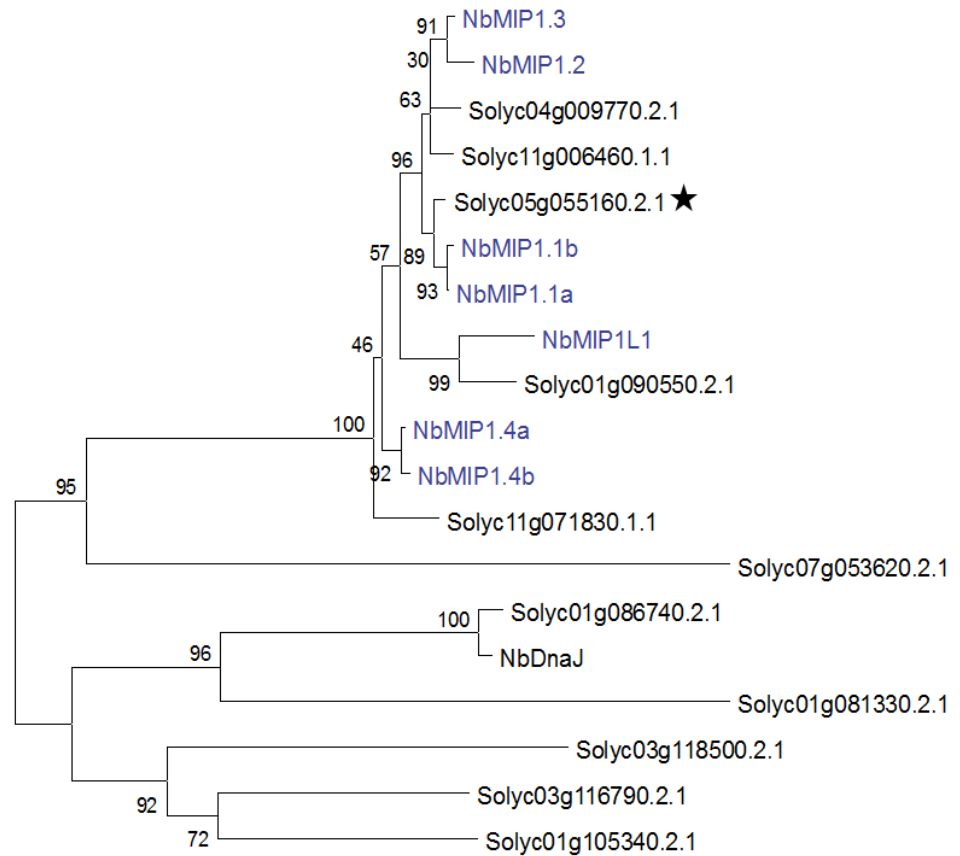


Figura 5: Relação entre os homólogos do domínio J. A árvore filogenética compreende proteínas com domínio J do tipo 1 em *N. benthamiana* (representadas em azul) e *S. lycopersicum* (representadas em preto). A estrela indica a sequência da proteína SIDj1. A árvore filogenética foi construída usando o método de máxima verossimilhança.

4.2 Localização subcelular da proteína Hsp70

A localização subcelular da SIHsp70 em plantas *N. benthamiana* sadia e infectada foi analisada por microscopia confocal. A análise da localização da proteína é importante para estudar o possível envolvimento da SIHsp70 no processo de infecção viral, e observar a possibilidade de alguma alteração na localização da

proteína entre a célula sadia e a infectada. A proteína foi observada no núcleo e citoplasma tanto em plantas sadias como em plantas infectadas (Figura 6). Os resultados estão de acordo com o que foi observado por Dufresne et al., (2008) e Mine Hyodo et al., (2012). Em ambos os trabalhos, a participação das chaperona Hsp70 foi confirmada no mecanismo de replicação viral, entretanto, esse envolvimento não teve influência na localização nuclear e citoplasmática da proteína nas células infectadas. O domínio 6K2 em potyvírus é essencial para a formação das vesículas replicativas associadas ao retículo endoplasmático. A expressão transiente da 6K-VPg-Pro do TuMV foi suficiente para o redirecionamento da RdRp e AtHsc70 para as vesículas perinucleares (Dufresne et al. 2008). Análise de plantas infectadas por RCNV demonstrou que a localização da Hsp70 no núcleo e citoplasma não é alterada, apesar disso, durante a infecção a proteína é também localizada no retículo endoplasmático (Mine et al. 2012).

Uma comparação entre os relatos de Dufresne et al., (2008) e os nossos resultados sugerem a possibilidade da presença de vesículas replicativas nas células infectadas pelo PepYMV (Figura 6B). Devido essa região apresentar expressão da SIHsp70 é possível especular que provavelmente a proteína vegetal esteja envolvida em alguma etapa da montagem dos complexos de replicação associados a membrana. Entretanto ensaios de expressão transiente de co-localização de 6K2 e SIHsp70 são necessários para corroborar essa hipótese.

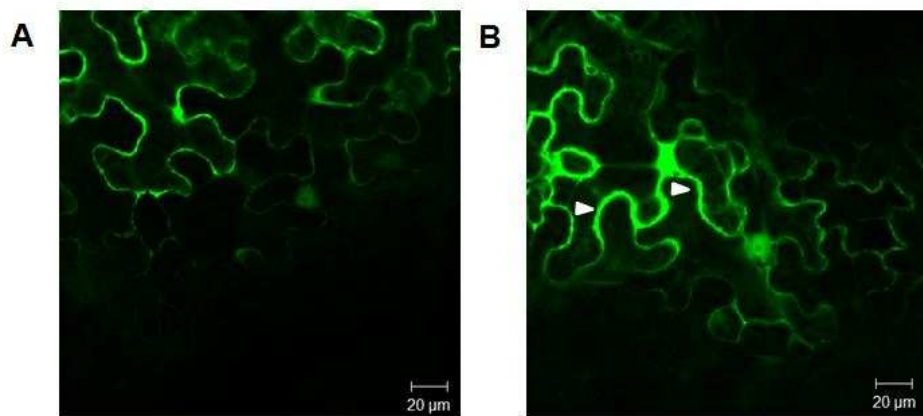


Figura 6: Localização subcelular da proteína Hsp70 fusionada com GFP em células de *N. benthamiana*. (A) Planta sadia. (B) Planta infectada pelo PepYMV. Pontas de setas brancas indicam a possibilidade de vesículas replicativas associadas ao retículo endoplasmático.

4.3 Ensaio de duplo híbrido em leveduras: interação proteína-proteína

O sistema de duplo híbrido em leveduras foi utilizado para investigar a ocorrência de interação direta entre proteína do PepYMV (P1, Hc-pro, CI, NIa, NIB, CP, P3) e a SIHsp70. Avaliação da interação entre as proteínas do PepYMV e a co-chaperona SIDj1 (Xavier 2012) também foi realizada.

A ocorrência da interação foi analisada pelo crescimento em meio auxotrófico para leucina, triptofano e histidina. A levedura transformada com pDEST32 e pDEST22 foi utilizada como controle negativo e não apresentou crescimento. O controle positivo pDEST32-NIa e pDEST22-NIB apresentou o crescimento esperado (Figura 7). A capacidade de transativação das proteínas vegetais foi testada com transformantes pDEST32 e pDEST22-SIDJ1 e com os transformantes pDEST32 e pDEST22-SIHsp70. Os resultados indicam que nenhuma das proteínas vegetais apresenta a capacidade de transativação. Interação direta entre as proteínas vegetais e as proteínas virais não foram observadas (Fig. 5). A detecção de interação direta foi verificada em leveduras transformadas com pDEST32-SIDj1 e pDEST22-SIHsp70 (Figura 6A e B). Devido o sistema duplo híbrido em leveduras não ser

indicado para proteínas associadas a membrana, interação entre as proteínas com domínio transmembrana 6K1 e 6K2 não foram avaliadas. A interação com a proteína P3N- PIPO ainda necessita ser verificada.

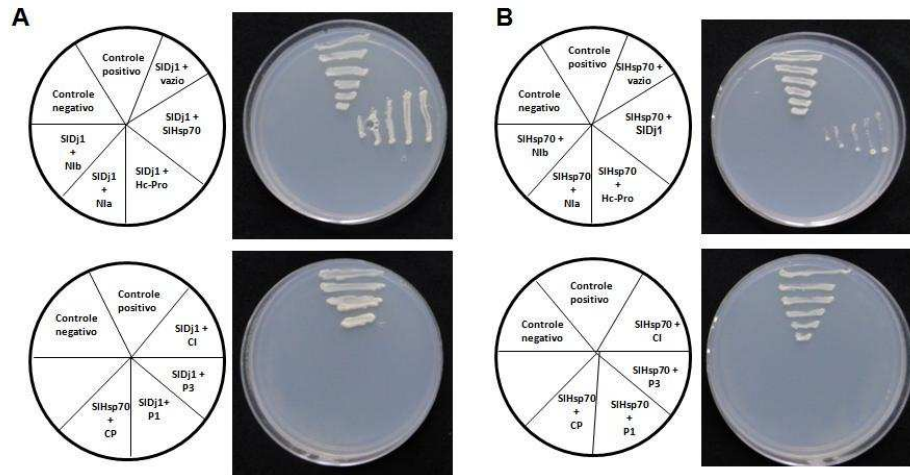


Figura 7: Ensaio de duplo híbrido em leveduras. (A) Interação entre SIDj1(AD) e SIHsp70(BD) foi detectada pelo crescimento de leveduras em meio de cultura SD (-Leu, -Trip,-His) acrescido de 3AT (1,5mM) 4 dias após o plaqueamento. As proteínas do PepYMV não apresentaram interação com SIDj1. (B) Interação entre SIHsp70 (AD) e SIDj1 (BD) foi observada pelo crescimento de leveduras em meio de cultura SD (-Leu, -Trip,-His) acrescido de 3AT (1,5mM) 4 dias após o plaqueamento. Nenhuma proteína do PepYMV interagiu com SIHsp70. Controle negativo (AD:BD). Controle positivo (Nla AD:Nib BD).

Plantas silenciadas para o gene da SIDj1 foram infectadas com PepYMV e apresentaram um menor acúmulo viral, esse resultado indica a possibilidade da proteína estar envolvida no processo infeccioso (Xavier 2012). A não interação entre SIDj1 e as proteínas PepYMV contradizem o trabalho feito por (Hofius et al. 2007), onde os autores descobriram uma interação direta entre uma DnaJ de *Nicotiana tabacum* e a CP do PVY. Uma explicação para essa diferença dos resultados é que a SIDj1 de tomate (DnaJ de classes I) apresenta uma similaridade inferior a 54% quando comparada com NtCPIPs (DnaJ-like).

A detecção da interação entre a proteína Hsp70 e sua co-chaperona DnaJ condiz com a funcionalidade dessas proteínas na célula e com resultados obtidos por outros autores (Dufresne et al. 2008; Kampinga and Craig 2010; Mayer 2013). A atividade

de hidrólise de ATP da Hsp70 é comprometida quando não se encontra associada a DnaJ (Mayer 2013). A participação conjunta das proteínas Hsp70 e DnaJ já foi relatada por estar envolvida na regulação da proteína CP do PVA, essa regulação está relacionada a formação de complexos de replicação associados a tradução (Hafren et al. 2010). O envolvimento dessas proteínas vegetais já foi descrito como importante para o movimento célula-a-célula de diferentes vírus (Chen et al. 2008; Hofius et al. 2007; Lu et al. 2009; Mathioudakis et al. 2012; Shimizu et al. 2009).

Além disso, o relato de closteovírus sintetizarem proteínas homologas a Hsp70 e a sua funcionalidade no movimento intracelular viral (Avisar et al. 2008; Medina et al. 1999) reforçam a importância dessas proteínas no favorecimento do desenvolvimento do vírus.

A chaperona AtHsc70 interage com a RDRP do TuMV (Dufresne et al. 2008), o alinhamento entre SIHsp70 e AtHsc70 (Figura 4) indica uma alta identidade entre as sequências, entretanto, o resultado não foi reproduzido entre SIHsp70 e N1b do PepYMV. Mine et al. (2012) sugeriram a associação entre NbHsp70, NbHsp90 e o complexo replicase do RCNMV, a chaperona Hsp90 de tomate pode estar envolvida com a interação entre SIHsp70 e as proteínas do PepYMV.

Durante o processamento da poliproteína de potyvírus são formados intermediários proteicos e esses podem estar interagindo com fatores do hospedeiro. A clivagem pela protease N1a ocorre de maneira sequencial, com afinidades diferentes da protease aos sítios de clivagem. A proteólise em alguns sítios, como entre a 6K₂ e a N1a, só ocorre ao final da replicação viral (Carrington and Dougherty 1988; Dougherty et al. 1988). Sendo assim, a forma como as proteínas dos potyvírus são sintetizadas podem justificar a não interação entre SIHsp70 e SIDj1 com as proteínas do PepYMV.

Outra possibilidade é que as proteínas do hospedeiro analisadas possam interagir com o RNA viral, Hsp70 de mamíferos já foi demonstrada por ligar-se seletivamente a sequências de RNA através de seu domínio ATPase (Zimmer et al. 2001). Métodos diferenciados, tais como, ensaios de *pull down* (Iioka et al. 2011), motilidade eletroforética de RNA (Rio 2014), ensaios de proteção contra RnaseH (Gunzl et al. 2002) ou hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (Vyboh et al. 2012) poderão ser utilizados para verificar interação entre o RNA viral e a SIHsp70 .

O envolvimento de um terceiro fator do hospedeiro pode justificar a não interação entre as proteínas analisadas. Uma rede de interações entre alguma proteína do vírus e proteínas do hospedeiro pode estar envolvida no estabelecimento de infecções virais (Ala-Poikela et al. 2011; Rajamaki et al. 2014; Tomita et al. 2003a; Vijayapalani et al. 2012; Wei et al. 2010). Estudos realizados por (Rajamaki et al. 2014) demonstrou que a proteína SGS3 atua como um adaptador entre a RdRp do hospedeiro e a VPg do PVA.

Uma hipótese que não pode ser descartada é o aumento da expressão gênica da chaperona Hsp70 e sua co-chaperona DnaJ em plantas infectadas pelo PepYMV estar relacionada com o dobramento das proteínas virais e não apresentarem uma correlação direta com a replicação do vírus na célula hospedeira.

4.4 Silenciamento do gene SIDj1 via *A. tumefaciens* em plantas de tomateiro

Estudos anteriores revelaram que a co-chaperona SIDj1 apresenta expressão induzida em plantas de tomateiro infectadas com PepYMV e apontam-a como um importante fator de suscetibilidade que regula positivamente os estágios iniciais da infecção viral (Alfenas Zerbini et al., 2009; Xavier, 2012). As técnicas utilizadas até o momento não permitiram compreender a funcionalidade dessa proteína nas infecções já estabelecidas do PepYMV. Devido a isso, a estratégia de silenciamento gênico induzido por transgenia foi desenvolvida nesse trabalho. Com o intuito de verificar a função da proteína SIDj1 durante o processo de infecção pelo PepYMV, plantas de tomateiro *Moneymaker* foram transformadas com a construção pK7WIW-DnaJ, que induz o silenciamento do gene *SIDJ1*.

Foram realizados 5 repetições com 100 explantes em cada experimento. A média de regenerantes foi de aproximadamente 10%. Os brotos apresentaram um crescimento lento, foram mantidos em meios de regeneração por três meses, após esse período começaram a apresentar sinais de clorose e em seguida morreram. Todas as plantas morreram antes da emissão de raízes, o que impossibilitou a fase de aclimatização e a inoculação com o PepYMV. Devido a isso, não foi possível avaliar o efeito do silenciamento pós transcricional do gene SIDj1 no contexto da infecção viral ocasionada pelo PepYMV.

A morte massiva de brotos regenerados antes da confirmação da inserção do T-DNA, indicou-nos a necessidade de um *screening* precoce de transformantes, ainda em meio de regeneração. De 4 plantas analisadas, houve em 3 a confirmação da integração do T-DNA no genoma via PCR utilizando oligonucleotídeos específicos. O amplicon corresponde a uma região do cassete de aproximadamente 2,0 Kpb, compreendendo desde a extremidade 5' do promotor 35S (*p35S*) até a extremidade 5' do gene *SIDj1*. A presença do amplicon confirmou os eventos de transgenia nos regenerantes (Figura. 8). Esses resultados indicam que possivelmente o silenciamento desta co-chaperona em tomateiro pode estar associado a um fenômeno de letalidade precoce durante a organogênese.

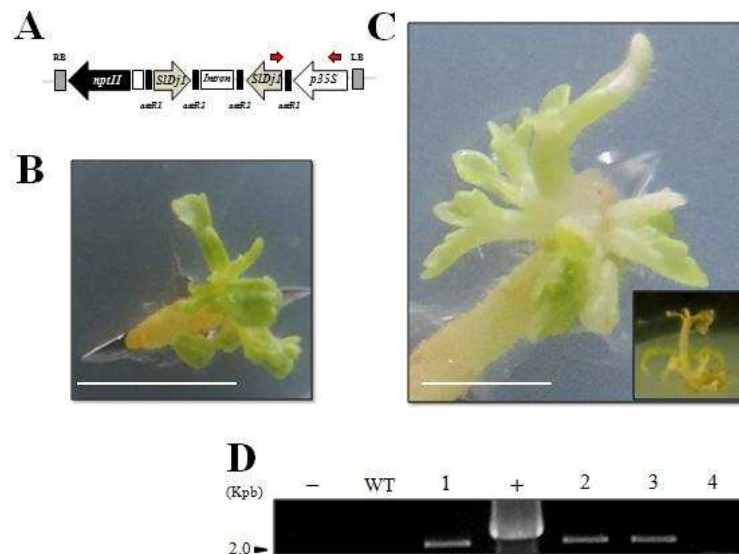


Figura 8: Silenciamento do gene *SIDj1* via *A. tumefaciens* em plantas de tomateiro (A) Representação esquemática da construção utilizada para a transformação de plantas de tomateiro com o objetivo de silenciar o gene *SIDj1*. (B) Regenerante no meio de cultura C, 4 semanas após a transformação. (C) Regenerante no meio de cultura D, 8 semanas após a transformação, apresenta os primeiros sinais de clorose. A foto em menor aumento mostra a morte celular do broto 12 semanas após a transformação. (D) Confirmação da integração do T-DNA nas plantas regeneradas após transformação com a construção pK7WIW-*SIDj1*. -, amplificação sem DNA (controle da reação); WT, amplificação a partir de planta não transformada (controle negativo); +, amplificação a partir de DNA plasmidial da construção pK7WIW-*SIDj1* (controle positivo); 1-4, amplificação a partir das plantas regeneradas.

A alta conservação das co-chaperonas DnaJ em eucariotos torna plausível a ideia de ter ocorrido um fenômeno de silenciamento generalizado nas plantas transgênicas silenciadas para o gene SIDj1. O vetor de expressão utilizado para a transformação foi clonado com a sequência completa da proteína SIDj1. Uma alternativa para contornar o fenômeno de letalidade pode ser a utilização de um fragmento menos conservado da proteína no processo de indução do silenciamento gênico.

Análise no banco de dados *Phytozome* v 9.1 (<http://www.phytozome.net/>) demonstrou que o tomateiro apresenta 83 isoformas da proteína DnaJ. As isoformas estão representadas em 3 classes distintas: 12 representantes da classe 1, 6 da classe 2 e 62 da classe 3. Essa diversidade de DnaJs no tomateiro pode explicar o silenciamento generalizado das plantas transformadas. A predição da localização subcelular indicou a presença das isoformas em diferentes compartimentos celulares, tais como, núcleo, citoplasma, membrana plasmática, cloroplasto, mitocôndria e no meio extracelular (Tabela 2). O efeito da supressão pode ter refletido na expressão das diferentes isoformas presente na planta.

Tabela 2: Localização física em pb de bases dos genes *dnaJ* nos cromossomos de tomateiro, peso molecular e predição da localização subcelular das proteínas Hsp70.

Proteína	Cromossomo	Massa molecular Kda	Posição domínio J	Predição da localização subcelular
Solyc05g055160.2.1	5	46.74	1	Nuclear
Solyc11g006460.1.1	11	46.62	1	Nuclear
Solyc04g009770.2.1	4	46.65	1	Nuclear
Solyc11g071830.1.1	11	46.53	1	Nuclear
Solyc01g090550.2.1	1	47.27	1	Nuclear
Solyc05g050810.2.1	5	28.28	3	Nuclear
Solyc01g079610.2.1	1	39.25	2	Nuclear
Solyc04g005820.2.1	4	35.79	2	Nuclear
Solyc01g086740.2.1	1	48	1	Nuclear
Solyc03g116790.2.1	3	53.56	1	Cloroplasto
Solyc03g044350.1.1	3	32.86	1	Nuclear
Solyc02g077670.2.1	2	37.75	2	Citoplasmática
Solyc06g071110.2.1	6	37.69	2	Nuclear
Solyc01g081330.2.1	1	48.49	1	Mitocondrial
Solyc09g005350.2.1	9	37.38	2	Citoplasmática
Solyc01g105340.2.1	1	37.67	1	Nuclear
Solyc07g053620.2.1	7	23.87	1	Nuclear
Solyc11g044450.1.1	11	38.42	2	Nuclear
Solyc01g109890.2.1	1	38.71	3	Citoplasmática
Solyc03g118500.2.1	3	58.27	1	Cloroplasto
Solyc09g007630.2.1	9	54.71	3	Retículo endoplasmático
Solyc05g009160.2.1	5	45.73	3	Nuclear
Solyc09g005120.2.1	9	62.51	3	Nuclear
Solyc04g007370.2.1	4	45.66	3	Nuclear
Solyc04g063390.2.1	4	43.57	3	Citoplasmática
Solyc12g095800.1.1	12	44.27	3	Citoplasmática

Solyc10g079090.1.1	10	33.1	3	Nuclear
Solyc05g006240.2.1	5	47.04	3	Nuclear
Solyc01g100230.2.1	1	18.36	3	Nuclear
Solyc01g066770.2.1	1	42.45	3	Nuclear
Solyc10g078560.1.1	10	34.63	3	Membrana plasmática
Solyc05g008120.2.1	5	22.09	3	Nuclear
Solyc09g075470.2.1	9	14.98	3	Nuclear
Solyc03g097240.2.1	3	14.76	3	Nuclear
Solyc02g080130.2.1	2	35.53	3	Membrana plasmática
Solyc03g115140.2.1	3	70.68	3	Nuclear
Solyc09g092260.2.1	9	20.93	3	Nuclear
Solyc09g009180.2.1	9	76.48	3	Membrana plasmática
Solyc04g076080.2.1	4	16.92	3	Nuclear
Solyc10g081220.1.1	10	21.17	3	Mitochondrial
Solyc08g078660.2.1	8	59.89	3	Mitochondrial
Solyc09g074610.2.1	9	29.17	3	Nuclear
Solyc02g064740.2.1	2	57.37	3	Mitochondrial
Solyc04g081530.1.1	4	17.01	3	Cloroplasto
Solyc03g007610.2.1	3	79.14	3	Membrana plasmática
Solyc01g044270.2.1	1	87.21	3	Nuclear
Solyc03g019640.1.1	3	104.31	3	Nuclear
Solyc09g015360.2.1	9	34.9	3	Nuclear
Solyc07g065960.1.1	7	18.22	3	Cloroplasto
Solyc03g115120.1.1	3	43.47	3	Nuclear
Solyc05g040050.1.1	5	87.96	3	Nuclear
Solyc03g007280.2.1	3	21.59	3	Nuclear
Solyc03g123560.2.1	3	24.14	3	Nuclear
Solyc02g062160.1.1	2	17.31	3	Cloroplasto
Solyc07g065970.1.1	7	18.3	3	Nuclear
Solyc05g053760.2.1	5	22.7	3	Nuclear

Solyc08g029220.1.1	8	88.37	3	Nuclear
Solyc07g066290.2.1	7	63.76	3	Membrana plasmática
Solyc08g005300.1.1	8	103.36	3	Nuclear
Solyc01g096700.2.1	1	69.38	3	Nuclear
Solyc04g076270.1.1	4	40.78	3	Nuclear
Solyc01g065570.2.1	1	27.64	3	Nuclear
Solyc11g018670.1.1	11	79.77	3	Nuclear
Solyc07g055260.2.1	7	37.77	3	Nuclear
Solyc07g026810.2.1	7	81.96	3	Membrana plasmática
Solyc01g098250.2.1	1	111.61	3	Nuclear
Solyc01g088730.2.1	1	33.13	3	Nuclear
Solyc02g014860.2.1	2	50.92	3	Cloroplasto
Solyc12g056890.1.1	12	25.02	3	Nuclear
Solyc01g067780.1.1	1	102.26	3	Nuclear
Solyc06g072330.2.1	6	11.92	3	Mitocondrial
Solyc04g015090.1.1	4	26.09	3	Nuclear
Solyc01g099260.2.1	1	30.42	3	Extracelular
Solyc03g019630.1.1	3	17.41	3	Nuclear
Solyc07g007230.2.1	7	47.47	3	Nuclear
Solyc11g006170.1.1	11	71.56	3	Nuclear
Solyc10g086040.1.1	10	12.16	3	Mitocondrial
Solyc11g005400.1.1	11	33.19	3	Nuclear
Solyc03g063350.2.1	3	22	3	Nuclear
Solyc07g047690.1.1	7	87.83	3	Nuclear
Solyc12g056850.1.1	12	32.71	3	Nuclear
Solyc11g071930.1.1	11	30.36	3	Nuclear
Solyc09g007390.2.1	9	12.26	3	Extracelular
Solyc06g068500.2.1	6	18.53	3	Nuclear

O uso de proteínas truncadas foi uma alternativa utilizada por Hofius et al., (2007) para contornar os efeitos indesejados da indução do silenciamento. Após constatar a porção da proteína NtCPIP responsável pela interação com a CP do PVY,

os autores induziram mutações nessa região e expressaram a proteína por transformação em plantas via agrobactéria. As plantas transgênicas apresentaram uma redução do acúmulo viral quando comparada com as plantas selvagens.

Outra alternativa muito utilizada é o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), ele tem sido proposto como uma ferramenta para estudos funcionais de genes envolvidos em diversos processos (Becker and Lange 2010; Burch-Smith et al. 2006; Waterhouse and Helliwell 2003). O mecanismo de silenciamento gênico é disparado pela infecção com um vetor viral. A técnica permite a redução drástica dos níveis de transcritos endógenos da planta, no entanto, não ocorre a ausência completa da expressão gênica (Angell and Baulcombe 1999). Essa é uma vantagem importante, pois inibe que a indução do silenciamento seja letal para a planta.

Inibidores químicos para expressão das proteínas Hsp70 e Hsp90 foram utilizados em protoplastos com intuito de verificar se a inibição desses genes estava relacionada com o acúmulo do RCNMV (Mine et al. 2012). Essa alternativa tem sido proposta para responder investigações sobre o envolvimento de fatores do hospedeiro em resposta a alterações abióticas ou bióticas. Baseia-se na utilização de agentes químicos que bloqueiam a expressão da proteína desejada através de ensaios em protoplastos de plantas e podem fornecer uma resposta rápida da atividade funcional de dada proteína.

Diante do exposto, sugerimos que os brotos regenerantes transformados apresentaram um fenótipo de letalidade. Acreditamos que a letalidade das plântulas esteja associada a completa ausência da expressão gênica de *sldj1*, visto que, a proteína codificada por esse gene apresenta funções importantes para a célula.

5. CONCLUSÕES

As análises realizadas permitiram concluir que o envolvimento da chaperona Hsp70 e sua co-chaperona DnaJ no processo infeccioso do PepYMV ocorre de forma indireta. A proteína Hsp70 clonada de *S. lycopersicum* apresenta todos os domínios típicos da chaperona. A localização subcelular de SIHsp70 foi detectada no núcleo e citoplasma, além disso, alguns indícios sugerem a possibilidade da sua co-localização com vesículas replicativas. Interação direta entre as proteínas SIHsp70 e SIDj1 foi detectada, entretanto, não houve interação com as proteínas do PepYMV. O silenciamento do gene *sdj1* induz um fenótipo letal em plantas de tomateiro transformadas. Estudos adicionais necessitam ser realizados para elucidar a função destas proteínas na infecção por PepYMV.

6. REFERÊNCIAS

- Abu-Farha M, Elisma F and Figeys D 2008 Identification of protein-protein interactions by mass spectrometry coupled techniques. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 110, 67-80.
- Adams M J, Zerbini F M, French R, Rabenstein F, Stenger D C and Valkonen J P T 2012 *Family Potyviridae*, London, UK: Elsevier Academic. pp. 1069-1089.
- Agudelo-Romero P, Carbonell P, de la Iglesia F, Carrera J, Rodrigo G, Jaramillo A, Perez-Amador M A and Elena S F 2008 Changes in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana* after infection with Tobacco etch virus. *Virology journal* 5, 92.
- Ala-Poikela M, Goytia E, Haikonen T, Rajam aki M-L and 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.
- Alfenas-Zerbini P, Maia I G, Favaro R D, Cascardo J C, Brommonschenkel S H and Zerbini F M 2009 Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 352-361.
- Allan R K and Ratajczak T 2011 Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress & Chaperones* 16, 353-367.
- Allison R, Johnston R E and 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.
- Altschul S F, Gish W, Miller W, Myers E W and Lipman D J 1990 Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, 403-410.
- Angell S M and Baulcombe D C 1999 Technical advance: potato virus X amplicon-mediated silencing of nuclear genes. *Plant J* 20, 357-362.
- Aparicio F, Thomas C L, Lederer C, Niu Y, Wang D and Maule A J 2005 Virus induction of heat shock protein 70 reflects a general response to protein accumulation in the plant cytosol. *Plant physiology* 138, 529-536.
- Aranda M A, Escaler M, Wang D and Maule A J 1996 Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15289-15293.
-  vila A C d, Inoue-Nagata A K, Costa H I, Boiteux L S, Neves L O d Q, Prates R S and Bertini L A 2004 Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. pp 655-658. *scielo*.
- Avisar D, Prokhnevsky A I and Dolja V V 2008 Class VIII Myosins Are Required for Plasmodesmatal Localization of a Closterovirus Hsp70 Homolog. *Journal of virology* 82, 2836-2843.
- Babu M, Gagarinova A G, Brandle J E and Wang A 2008a Association of the transcriptional response of soybean plants with soybean mosaic virus systemic infection. *The Journal of general virology* 89, 1069-1080.
- Babu M, Griffiths J S, Huang T S and Wang A 2008b Altered gene expression changes in *Arabidopsis* leaf tissues and protoplasts in response to Plum pox virus infection. *BMC genomics* 9, 325.
- Baebler S, Krecic-Stres H, Rotter A, Kogovsek P, Cankar K, Kok E J, Gruden K, Kovac M, Zel J, Pompe-Novak M and Ravnikar M 2009 PVY(NTN) elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular plant pathology* 10, 263-275.

- Basso J, Dallaire P, Charest P J, Devantier Y and Laliberté J-F o 1994 Evidence for an Internal Ribosome Entry Site Within the 5' Non-translated Region of Turnip Mosaic Potyvirus RNA. pp 3157-3165.
- Becker A and Lange M 2010 VIGS--genomics goes functional. Trends in plant science 15, 1-4.
- Belanger K D 2009 Using Affinity Chromatography to Investigate Novel Protein-Protein Interactions in an Undergraduate Cell and Molecular Biology Lab Course. CBE-Life Sciences Education 8, 214-225.
- Bertelsen E B, Chang L, Gestwicki J E and Zuiderweg E R P 2009 Solution conformation of wild-type E. coli Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. pp 8471-8476.
- Bhat R A, Lahaye T and Panstruga R 2006 The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. Plant methods 2, 12.
- Bock K R and Conti M 1974 Cowpea aphid-borne mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 134.
- Bosque G, Folch-Fortuny A, Pico J, Ferrer A and Elena S F 2014 Topology analysis and visualization of Potyvirus protein-protein interaction network. BMC systems biology 8, 129.
- Brasileiro A C M and Carneiro V T C 1998a Manual de Transformação Genética de Plantas. Embrapa Cenargen. Brasília- DF, 143-154.
- Brasileiro A C M and Carneiro V T C 1998b Neomicina fosfotransferase II (nptII), Distrito Federal. pp. 11.
- Bruckner F P 2012 Aspectos da interação entre a proteína TCTP e o potyvírus PepYMV na infecção de tomateiro e *Nicotiana benthamiana*. In Programa de pós graduação em Microbiologia Agrícola. p. 80. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Burch-Smith T M, Schiff M, Liu Y and Dinesh-Kumar S P 2006 Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis. Plant physiology 142, 21-27.
- Cagney G, Emili A, Rajagopala S and Uetz P 2011 Analysis of Protein-Protein Interactions Using High-Throughput Yeast Two-Hybrid Screens. In Network Biology. pp 1-29. Humana Press.
- Carrington J C and Dougherty W G 1988 A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. pp 3391-3395.
- Carrington J C, Freed D D and Oh C S 1990 Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. The EMBO journal 9, 1347-1353.
- Cascardo R S 2011 Estudo do envolvimento das proteínas SI-GAL83 e TCTP na infecção de hospedeiros suscetíveis pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). In Pos graduação em Genética e Melhoramento p. 75. Universidade Federal de Viçosa Viçosa.
- Chen Z, Zhou T, Wu X, Hong Y, Fan Z and Li H 2008 Influence of cytoplasmic heat shock protein 70 on viral infection of *Nicotiana benthamiana*. Molecular plant pathology 9, 809-817.
- Chung B Y, Miller W A, Atkins J F and Firth A E 2008 An overlapping essential gene in the Potyviridae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 5897-5902.
- Cotton S, Grangeon R, Thivierge K, Mathieu I, Ide C, Wei T, Wang A and Laliberte J F 2009 Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. Journal of virology 83, 10460-10471.
- Culver J N and Padmanabhan M S, 221-243. 2007 Virus-induced disease: altering

- host physiology one interaction at a time. *Annual review of phytopathology* 45, 221-243.
- Cunha L C V, Resende R O, Nagata T and Inoue-Nagata A K 2004 Distinct features of Pepper yellow mosaic virus isolates from tomato and sweetpepper. *Fitopatologia Brasileira* 29, 663-667.
- Di Piero R M, Rezende J A M, Yuki V A, Pascholati S r F and Delfino M A 2006 TransmissÃ£o do Passion fruit woodiness Virus por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonizaÃ§Ã£o de maracujazeiro pelo vetor. pp 139-140. scielo.
- Dianese É C, Resende R O and Inoue-Nagata A K 2008 Alta incidência de Pepper yellow mosaic virus em tomateiro em região produtora no Distrito Federal. pp 67-68. scielo.
- Dougherty W G, Carrington J C, Cary S M and Parks T D 1988 Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site. *The EMBO journal* 7, 1281-1287.
- Doyle J J and Doyle J L 1987 A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19, 11-15.
- Dufresne P J, Thivierge K, Cotton S, Beauchemin C, Ide C, Ubalijoro E, Laliberte J F and Fortin M G 2008 Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA- dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology* 374, 217-227.
- Elena S F and Rodrigo G 2012 Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. *Current opinion in virology* 2, 719-724.
- Eskelin K, Hafren A, Rantalainen K I and Makinen K 2011 Potyviral VPg enhances viral RNA Translation and inhibits reporter mRNA translation in planta. *Journal of virology* 85, 9210-9221.
- Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U and Ball L A 2005 *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press., 1259 p
- Frary A and Earle E D 1996 An examination of factors affecting the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation of tomato *Plant Cell Reports* 16, 235-240.
- Gallie D R, Tanguay R L and 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 and Ohshima K 2010 Potyviruses and the digital revolution. *Annual review of phytopathology* 48, 205-223.
- Gietz D, St Jean A, Woods R A and Schiestl R H 1992 Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* 20, 1425.
- Gorovits R, Moshe A, Ghanim M and Czosnek H 2013 Recruitment of the Host Plant Heat Shock Protein 70 by *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* Coat Protein Is Required for Virus Infection. *PLoS ONE* 8, e70280.
- Grangeon R, Agbeci M, Chen J, Grondin G, Zheng H and Laliberte J F 2012 Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of turnip mosaic virus infection. *Journal of virology* 86, 9255-9265.
- Grangeon R, Jiang J, Wan J, Agbeci M, Zheng H and Laliberte J F 2013 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. *Frontiers in microbiology* 4, 351.
- Gunzl A, Palfi Z and Bindereif A 2002 Analysis of RNA-protein complexes by oligonucleotide-targeted RNase H digestion. *Methods (San Diego, Calif)* 26, 162-169.
- Gupta S C, Sharma A, Mishra M, Mishra R K and Chowdhuri D K 2010 Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sciences* 86, 377-384.
- Hafren A, Hofius D, Ronnholm G, Sonnewald U and Makinen K 2010 HSP70 and its cochaperone CPIP promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions. *The Plant cell* 22, 523-535.
- Haikonen T, Rajamaki M-L and Valkonen J P T 2013 Interaction of the Microtubule-

- Associated Host Protein HIP2 with Viral Helper Component Proteinase Is Important in Infection with Potato virus A. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26, 734-744.
- Hartl F U and Hayer-Hartl M 2002 Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Hofius D, Maier A T, Dietrich C, Jungkunz I, Bornke F, Maiss E and Sonnewald U 2007 Capsid protein-mediated recruitment of host DnaJ-like proteins is required for Potato virus Y infection in tobacco plants. *Journal of virology* 81, 11870-11880.
- Huang T S, Wei T, Laliberte J F and Wang A 2010 A host RNA helicase-like protein, AtRH8, interacts with the potyviral genome-linked protein, VPg, associates with the virus accumulation complex, and is essential for infection. *Plant physiology* 152, 255-266.
- Hull R 2002 *Matthew's Plant Virology.*, Londres, Inglaterra.
- Iioka H, Loisel D, Haystead T A and Macara I G 2011 Efficient detection of RNA-protein interactions using tethered RNAs. *Nucleic Acids Research* 39, e53-e53.
- Inoue-Nagata A K, Fonseca M E, Resende R O, Boiteux L S, Monte D C, Dusi A N, de Avila A C and van der Vlugt R A 2002 Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. *Archives of virology* 147, 849-855.
- Ivanov K I, Eskelin K, Lohmus A and Makinen K 2014 Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *The Journal of general virology* 95, 1415-1429.
- Jockusch H, Wiegand C, Mersch B and Rajes D 2001 Mutants of Tobacco mosaic virus with Temperature-Sensitive Coat Proteins Induce Heat Shock Response in Tobacco Leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 914-917.
- Kabani M, Beckerich J-M and Brodsky J L 2002 Nucleotide Exchange Factor for the Yeast Hsp70 Molecular Chaperone Ssa1p. pp 4677-4689.
- Kampinga H H and Craig E A 2010 The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews* 11, 579-592.
- Kunik T, Palanichelvam K, Czosnek H, Citovsky V and Gafni Y 1998 Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *The Plant Journal* 13, 393-399.
- Lee K-C, Lin S S, Yeh S-D and Wong S-M 2002 Interactions between Nuclear Inclusion Protein a (NIa) and Nuclear Inclusion Protein b (NIb) of *Zucchini yellow mosaic virus* and *Papaya ringspot virus*. *Plant Pathology Bulletin* 11, 79-86.
- Lellis A D, Kasschau K D, Whitham S A and Carrington J C 2002 Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr Biol* 12, 1046-1051.
- Léonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin M G and Laliberté J-F 2000 Complex Formation between Potyvirus VPg and Translation Eukaryotic Initiation Factor 4E Correlates with Virus Infectivity. pp 7730-7737.
- Liu J Z and Whitham S A 2013 Overexpression of a soybean nuclear localized type-III DnaJ domain-containing HSP40 reveals its roles in cell death and disease resistance. *Plant J* 74, 110-121.
- Lu L, Du Z, Qin M, Wang P, Lan H, Niu X, Jia D, Xie L, Lin Q, Xie L and Wu Z 2009 Pc4, a putative movement protein of Rice stripe virus, interacts with a type I DnaJ protein and a small Hsp of rice. *Virus genes* 38, 320-327.
- Lucinda N, da Rocha W B, Inoue-Nagata A K and Nagata T 2012 Complete genome sequence of pepper yellow mosaic virus, a potyvirus, occurring in Brazil. *Archives of virology* 157, 1397-1401.
- Mathioudakis M M, Veiga R, Ghita M, Tsikou D, Medina V, Canto T, Makris A M and Livieratos I C 2012 Pepino mosaic virus capsid protein interacts with a tomato heat shock protein cognate 70. *Virus research* 163, 28-39.
- Mayer M P 2013 Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in biochemical sciences* 38, 507-514.

- Mayer M P and Bukau B 2005 Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-684.
- Mayo M A 1995 *The Potyviridae*. By D. D. SHUKLA, C. W. WARD and A. A. BRUNT. 25× 17 cm. Pp. 516 with 110 text-figures and 30 tables, Wallingford: CAB International, 1994. Price: £60.00. *New Phytologist* 131, 289-290.
- Medina V, Peremyslov V V, Hagiwara Y and Dolja V V 1999 Subcellular Localization of the HSP70-Homolog Encoded by Beet Yellows Closterovirus. *Virology* 260, 173- 181.
- Mine A, Hyodo K, Tajima Y, Kusumanegara K, Taniguchi T, Kaido M, Mise K, Taniguchi H and Okuno T 2012 Differential roles of Hsp70 and Hsp90 in the assembly of the replicase complex of a positive-strand RNA plant virus. *Journal of virology* 86, 12091-12104.
- Murashige T and Skoog F A 1962 A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant physiology* 15, 473-479.
- Nicaise V, Gallois J L, Chafiai F, Allen L M, Schurdi-Levraud V, Browning K S, Candresse T, Caranta C, Le Gall O and German-Retana S 2007 Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* 581, 1041-1046.
- Niepel M and Gallie D R 1999 Identification and Characterization of the Functional Elements within the Tobacco Etch Virus 5' Leader Required for Cap-Independent Translation. pp 9080-9088.
- Nitsch J P and Nitsch C 1969 Haploid plants from pollen grains. *Science* 163, 85-87.
- Parrish J R, Gulyas K D and Finley R L, Jr. 2006 Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping. *Current opinion in biotechnology* 17, 387-393.
- Pogany J and Nagy P D 2008 Authentic Replication and Recombination of Tomato Bushy Stunt Virus RNA in a Cell-Free Extract from Yeast. pp 5967-5980.
- Prasch C M and Sonnewald U 2013 Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant physiology* 162, 1849-1866.
- Qiu X B, Shao Y M, Miao S and Wang L 2006 The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* 63, 2560-2570.
- Rainey P B and Travisano M 1998 Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* 394, 69-72.
- Rajamaki M-L, Streng J and Valkonen J P T 2014 Silencing Suppressor Protein VPg of a Potyvirus Interacts With the Plant Silencing-Related Protein SGS3. *Molecular Plant- Microbe Interactions* 27, 1199-1210.
- Rajamaki M-L and Valkonen J T 2004 Detection of a natural point mutation in Potato virus A that overcomes resistance to vascular movement in *Nicotiana glauca*, and studies on seed-transmissibility of the mutant virus. *Annals of Applied Biology* 144, 77-86.
- Rajan V B and D'Silva P 2009 *Arabidopsis thaliana* J-class heat shock proteins: cellular stress sensors. *Functional & integrative genomics* 9, 433-446.
- Reichmann J L, Lain S and Garcia J A 1989 The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of Plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* 70, 2785-2789.
- Riedel D, D., Lesemann E and Maiss E 1998 Ultrastructural localization of non-structural and coat proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of plum pox potyvirus. *Arch. Virol.* 143, 2133-2158.
- Rio D C 2014 Electrophoretic Mobility Shift Assays for RNase Protein Complexes. 2014, [pdb.prot080721](https://doi.org/10.1101/080721).
- Roossinck M J 2012 Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annual review of genetics* 46, 359-369.
- Salazar L F 2003 Potato viruses after the XXth century: effects, dissemination and their control.

- Sambrook J and Russel D 2001 *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York
- Satyanarayana T, Gowda S, Mawassi M, Albiach-Marti M R, Ayllon M A, Robertson C, Garnsey S M and Dawson W O 2000 Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* 278, 253-265.
- Scaria V, Hariharan M, Maiti S, Pillai B and Brahmachari S K 2006 Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology* 3, 68.
- Schaad M C, Jensen P E and Carrington J C 1997 Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *The EMBO journal* 16, 4049-4059.
- Scholthof H B, Alvarado V Y, Vega-Arreguin J C, Ciomperlik J, Odokonyero D, Brosseau C, Jaubert M, Zamora A and Moffett P 2011 Identification of an ARGONAUTE for Antiviral RNA Silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant physiology* 156, 1548- 1555.
- Senthil G, Liu H, Puram V G, Clark A, Stromberg A and Goodin M M 2005 Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses. *The Journal of general virology* 86, 2615-2625.
- Shen W, Yan P U, Gao L E, Pan X, Wu J and Zhou P 2010 Helper component-proteinase (HC-Pro) protein of Papaya ringspot virus interacts with papaya calreticulin. *Molecular plant pathology* 11, 335-346.
- Shimizu T, Yoshii M, Wei T, Hirochika H and Omura T 2009 Silencing by RNAi of the gene for Pns12, a viroplasm matrix protein of Rice dwarf virus, results in strong resistance of transgenic rice plants to the virus. *Plant biotechnology journal* 7, 24-32.
- Shukla D D, Frcnkel M J and 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.
- Simón-Buela L, Guo H S and Garcia J A 1997 Cap-independent leaky scanning as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. pp 2691-2699.
- Soellick T, Uhrig J F, Bucher G L, Kellmann J W and Schreier P H 2000 The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2373-2378.
- Sondermann H, Scheufler C, Schneider C, HÄ¶hfeld J r, Hartl F U and Moarefi I 2001 Structure of a Bag/Hsc70 Complex: Convergent Functional Evolution of Hsp70 Nucleotide Exchange Factors. pp 1553-1557.
- Thivierge K, Cotton S, Dufresne P J, Mathieu I, Beauchemin C, Ide C, Fortin M G and Laliberte J F 2008 Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. *Virology* 377, 216-225.
- Thompson J D, Higgins D G and Gibson T J 1994 CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position- specific gap penalties and weight matrix choice. pp 4673-4680.
- Tomita Y, Mizuno T, DÁ-ez J, Naito S, Ahlquist P and Ishikawa M 2003a Mutation of Host dnaJ Homolog Inhibits Brome Mosaic Virus Negative-Strand RNA Synthesis. pp 2990-2997.
- Tomita Y, Mizuno T, Diez J, Naito S, Ahlquist P and Ishikawa M 2003b Mutation of host DnaJ homolog inhibits brome mosaic virus negative-strand RNA synthesis. *Journal of virology* 77, 2990-2997.
- Truta A A C, Souza A R R e, Nascimento A V S d, Pereira R d C s, Pinto C M F, Brommonschenkel S r H, Carvalho M G d and Zerbini F M 2004

Identidade e propriedades de isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* spp. pp 160-168. scielo.

- Urcuqui-Inchima S, Maia I G, Arruda P, Haenni A L and Bernardi F 2000 Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology* 268, 104-111.
- Vahey M T, Nau M E, Jagodzinski L L, Yalley-Ogunro J, Taubman M, Michael N L and Lewis M G 2002 Impact of viral infection on the gene expression profiles of proliferating normal human peripheral blood mononuclear cells infected with HIV type 1 RF. *AIDS research and human retroviruses* 18, 179-192.
- Valente D D 2013 Caracterização da proteína DnaJ de *Solanum lycopersicum* no processo de infecção pelo PepYMV In Departamento de Pós graduação em Genética. p. 45. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Verchot J 2012 Cellular chaperones and folding enzymes are vital contributors to membrane bound replication and movement complexes during plant RNA virus infection. *Frontiers in plant science* 3, 275.
- Vijayapalani P, Maeshima M, Nagasaki-Takekuchi N and Miller W A 2012 Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS pathogens* 8, e1002639.
- Vyboh K, Ajamian L and Mouland A J 2012 Detection of Viral RNA by Fluorescence in situ Hybridization (FISH). e4002.
- Wang R Y, Stork J, Pogany J and Nagy P D 2009 A temperature sensitive mutant of heat shock protein 70 reveals an essential role during the early steps of tombusvirus replication. *Virology* 394, 28-38.
- Waterhouse P M and Helliwell C A 2003 Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* 4, 29-38.
- Wei T and Wang A 2008 Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *Journal of virology* 82, 12252-12264.
- Wei T, Zhang C, Hong J, Xiong R, Kasschau K D, Zhou X, Carrington J C and Wang A 2010 Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS pathogens* 6, e1000962.
- Wei T, Zhang C, Hou X, Sanfaçon H I n and Wang A 2013 The SNARE Protein Syp71 Is Essential for Turnip Mosaic Virus Infection by Mediating Fusion of Virus-Induced Vesicles with Chloroplasts. *PLoS pathogens* 9, e1003378.
- Whitham S A, Quan S, Chang H S, Cooper B, Estes B, Zhu T, Wang X and Hou Y M 2003 Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J* 33, 271-283.
- Wittmann S, Chatel H, Fortin M G and Lalibertè, J. F. 1997 Interaction of the Viral Protein Genome Linked of Turnip Mosaic Potyvirus with the Translational Eukaryotic Initiation Factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* Using the Yeast Two-Hybrid System. *Virology* 234, 84-92.
- www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/.
- Xavier, A . S. 2012 Efeito do silenciamento dos genes DnaJ e TCTP na infecção de tomateiro e *Nicotiana benthamiana* pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) In Programa de pós graduação em Fitopatologia. p. 61. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Xiao A, Wong J and Luo H 2010 Viral interaction with molecular chaperones: role in regulating viral infection. *Archives of virology* 155, 1021-1031.
- Yang C, Guo R, Jie F, Nettleton D, Peng J, Carr T, Yeakley J M, Fan J B and Whitham S A 2007 Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 358-370.
- Yang H, Huang Y, Zhi H and Yu D 2011 Proteomics-based analysis of novel genes involved in response toward soybean mosaic virus infection. *Molecular biology*

- reports 38, 511-521.
- Young J C, Agashe V R, Siegers K and Hartl F U 2004 Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature reviews* 5, 781-791.
- Zambolim E M, Costa H, Capucho A S, Ávila A C, Inoue-Nagata A K and Kitajima E W 2004 Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, 325- 327.
- Zerbini F M and Zambolim E M 1999 Família Potyviridae. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 7, 1-67.
- Zimmer C, von Gabain A and Henics T 2001 Analysis of sequence-specific binding of RNA to Hsp70 and its various homologs indicates the involvement of N- and C-terminal interactions. *RNA* 7, 1628-1637.