

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae)**

**Renata Faier Calegario**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Renata Faier Calegario  
Engenheira Agrônoma**

**Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do  
ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae)**

Orientador:  
Prof. Dr. **ELLIOT WATANABE KITAJIMA**

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutora em Agronomia. Área de concentração:  
Fitopatologia

**Piracicaba  
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Calegario, Renata Faier

Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae) / Renata Faier Calegario. - - Piracicaba, 2009.

123 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.  
Bibliografia.

1. Ácaros 2. Anticorpos 3. Citricultura 4. Fitopatologia 5. Imunohistoquímica 6. Leprose  
7. Proteínas 8. Vetores de doenças de plantas 9. Vírus de plantas I. Título

CDD 634.3  
C148d

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

***DEDICO***

***Aos meus pais, Gonzaga e Faier,  
à minha filha Pietra e  
ao meu companheiro Mateus.***



## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima, por me transmitir o verdadeiro significado do conhecimento, pela orientação, amizade, confiança e brilhante participação neste trabalho.

À Dra. Juliana Freitas-Astúa pela fundamental co-orientação, amizade, ótimos conselhos e discussões, os quais tornaram este trabalho mais rico e substancial.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Marcos A. Machado e ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Labate e à amiga Dra. Mônica T. V. Labate, pelo auxílio na expressão e sequenciamento das proteínas

À Professora Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado pelo auxílio na produção de antissoro e ao Dr. Luís A. Peroni, pela amizade e acompanhamento durante esta etapa do trabalho.

À Dra. Eliane C. Locali-Fabris por gentilmente ceder o antissoro contra a proteína p29 do CiLV-C utilizado neste trabalho.

Ao Professor Dr. Shaker Chuck Farah e ao M.Sc. Maxuel de Oliveira Andrade pelo auxílio na árdua etapa de purificação das proteínas e por contribuírem com boas opiniões.

Ao Professor Dr. Jorge Alberto Rezende pela amizade, auxílio acadêmico e emocional, e por contribuir com ótimas idéias durante os testes dos antissoros.

Às amigas do laboratório de Virologia Vegetal da ESALQ/USP, Adriana Moreira e Adriana Jadão, e à amiga Ana Paula, pelo carinho, apoio e por sempre me transmitirem pensamentos positivos tornando minha vida mais alegre.

Ao técnico do Laboratório de Virologia Vegetal da ESALQ/USP, José Edivaldo Buriolla, pelo auxílio nas imunizações dos coelhos.

Aos amigos e professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP.

Ao amigo e técnico do NAP/MEPA-ESALQ/USP, Renato Barbosa Salaroli, pela ajuda técnica, bom humor e por ter me socorrido nas horas difíceis.

Ao amigo e Professor Dr. Francisco André Tanaka por estar sempre ao meu lado apoiando, ajudando e ouvindo.

Às amigas do NAP/MEPA-ESALQ/USP Renata Takassugui Gomes, Renata Antonioli-Luizon e Aline.

Ao meu grande amigo Gleiber, pela maravilhosa e irreverente amizade e, pelo apoio em todos os momentos difíceis e agradáveis que passei em Piracicaba.

Aos meus amigos do coração e ex-viçosenses Felipe, Patrícia, Luan, Flora e Luciana, por me receberem em Piracicaba de braços abertos e por se tornarem a extensão da minha família.

À Escola Waldorf Novalis por terem sempre cuidado da minha filha Pietra com amor, dando-me tranquilidade para poder trabalhar neste projeto.

Aos amigos e Pais Waldorfs Carla, Léo, Janaína, Patrícia, Marcelo, Magali, Reinaldo, Balu e Luciene que me ofereceram apoio cuidando da Pietra nos momentos em que estive trabalhando.

À Pietra, minha filha maravilhosa, grande companheira e incentivadora, pelo amor incondicional e por surpreendentemente compreender a importância do meu trabalho.

Ao meu grande amor Mateus, pelo companheirismo, amizade e compreensão, por sempre me transmitir tranquilidade e paz de espírito, e por cuidar de mim e da Pietra com muito amor e carinho.

À minha irmã Fagoni, por sempre acreditar no meu potencial e à minha maravilhosa sobrinha Natasha, por me proporcionar bons momentos de relaxamento com sua música.

Aos meus pais Gonzaga e Faier que me apoiaram em todos os momentos da minha vida acadêmica me fortalecendo com muito amor.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Vírus transmitidos por <i>Brevipalpus</i> .....	15
2.2 Leprose dos citros.....	17
2.3 O vetor.....	22
2.4 Expressão de proteínas virais.....	24
2.5 Expressão <i>in vitro</i> de proteínas em <i>E.coli</i> .....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Amplificação das ORFs <i>mp</i> e <i>helicase</i> .....	33
3.2 Clonagem das ORFs <i>mp</i> e <i>helicase</i> .....	34
3.3 Subclonagem das ORFs <i>mp</i> e <i>helicase</i> no vetor pDEST <sup>TM</sup> 17.....	35
3.4 Expressão <i>in vitro</i> das proteínas MP e Helicase.....	37
3.4.1 Transformação.....	37
3.4.2 Expressão em <i>E. coli</i> BL21-AI <sup>TM</sup> (Tecnologia Gateway).....	38
3.4.3 Expressão em <i>E. coli</i> BL21-DE3, BL21-DE3-pLysS e BL21-DE3-RP.....	39
3.5 Extração de proteínas.....	40
3.5.1 Proteína Helicase.....	40
3.5.2 Proteína de Movimento.....	41
3.6 Espectrometria de Massa.....	42
3.6.1 Digestão das proteínas.....	42
3.6.2 Sequenciamento das proteínas.....	43
3.7 Purificação das proteínas.....	44
3.7.1 Helicase.....	44
3.7.2 Proteína de Movimento.....	45
3.8 Produção dos antissoros.....	47
3.9 Testes Sorológicos dos anticorpos.....	49
3.9.1 PTA-ELISA (“Plate Trapped Antigen - Enzyme Linked Immunosorbent Assay”...)	49

3.9.2 Western Blot.....	50
3.9.3 Tissue Blotting.....	51
3.9.4 Microscopia eletrônica de transmissão do ácaro.....	52
3.9.5 Imunolocalização.....	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 Amplificação das ORFs <i>helicase</i> e <i>mp</i> .....	57
4.2 Clonagem das ORFs <i>helicase</i> e <i>mp</i> .....	58
4.3 Expressão <i>in vitro</i> .....	64
4.4 Purificação das proteínas.....	72
4.4.1 Helicase.....	72
4.4.2 Proteína de movimento (MP).....	73
4.5 Testes sorológicos dos antissoros.....	77
4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Imunolocalização <i>in situ</i> .....	89
4.6.1 Em planta.....	89
4.6.2 Ácaro vetor <i>Brevipalpus phoenicis</i> .....	95
4.6.2.1 Discussão sobre o modelo de circulação do CiLV-C no ácaro vetor.....	100
5 CONCLUSÕES.....	107
Referências.....	109

## RESUMO

### **Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae)**

A leprose é uma das principais doenças na citricultura brasileira devido à sua ocorrência difundida nos pomares e aos altos custos para o controle químico do ácaro vetor. A doença compromete a produção da planta e sua vida útil, manifestando-se através de lesões locais cloróticas ou necróticas em folhas, ramos e frutos, levando à queda prematura destes órgãos e à seca de ramos. O patógeno, Citrus leprosis virus C (CiLV-C), recentemente classificado como espécie tipo de um novo gênero de vírus de planta, *Cilevirus*, é transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). Apesar de haver consenso de que a doença tem etiologia viral, ainda existem muitas questões pendentes sobre as interações vírus-planta-vetor, cujas soluções contribuirão para o controle integrado da doença. O presente trabalho teve como objetivo obter informações sobre a interação do vírus com células hospedeiras através de ensaios de imunolocalização das proteínas MP (putativa proteína de movimento), helicase (associada à replicação) e p29 (putativa proteína capsidial) do CiLV-C. Para tal, as sequências codificadoras das ORFs *mp* e *hel* foram amplificadas via RT-PCR e clonadas em vetor de expressão. Em seguida, promoveu-se a expressão *in vitro* das respectivas proteínas em células de *E. coli* e purificação por cromatografia de afinidade e troca iônica. A proteína MP pura foi utilizada para produção de antissoro policlonal específico que foi testado quanto à especificidade por métodos sorológicos. Os resultados do ELISA mostraram que o antissoro apresentou reação positiva com extratos foliares de lesões lepróticas em todos os estágios de desenvolvimento da doença, quando utilizado em altas concentrações. Além disso, lesões maduras reagiram mais intensamente que lesões mais novas. Por Western Blot, detectou-se somente a proteína pura, não sendo possível obter reação positiva em extrato de lesões foliares. Também não foi possível detectar a MP por imunolocalização *in situ*. Os resultados em conjunto sugerem que ocorre baixo nível de expressão da MP nos tecidos do hospedeiro. Empregando-se anticorpo policlonal contra proteína p29 do CiLV-C, foi possível detectar o CiLV-C em extratos de lesões foliares de leprose por ambos os métodos sorológicos testados e também por Tissue Blotting. Ensaios de imunolocalização *in situ* permitiram confirmar que as partículas baciliformes presentes em cisternas do retículo endoplasmático de tecidos de lesões lepróticas em plantas representam de fato vírions do CiLV-C. Além disso, também demonstrou-se que o viroplasma que ocorre no citoplasma representa o sítio de acúmulo da proteína p29. Este mesmo ensaio revelou que partículas baciliformes que ocorrem entre membranas de células adjacentes (intestino médio, glândulas prosomais, músculos e epiderme) de *B. phoenicis* virulíferos são de fato do CiLV-C. A ausência de viroplasma no ácaro sugere que a relação vírus/vetor seria do tipo circulativo, sem replicação. Baseado neste fato discutem-se alternativas para explicar como o vírus trafegaria do lúmen do intestino até o duto salivar para causar infecção numa planta sadia.

Palavras-chave: Citrus leprosis virus C (CiLV-C); *Brevipalpus phoenicis*; *Citrus sinensis*; Expressão de proteínas; Antissoro policlonal; Imunolocalização *in situ*



## ABSTRACT

### **Detection of Citrus leprosis virus C (CiLV-C) in the tissues of infected plants and of mite vector *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae)**

Citrus leprosis is one of the most important diseases in the Brazilian citrus production due to the wide occurrence in orchards and also to the high costs involved in the chemical control of the mite vector. The disease affects the plant production and longevity and it is characterized by localized chlorotic and/or necrotic spots on the leaves, stems and fruits. Affected leaves and fruits may drop prematurely and dieback can be observed in stems. The pathogen, Citrus leprosis virus C (CiLV-C), recently considered as the type member of a new genus, *Cilevirus*, is transmitted by the mite *Brevipalpus phoenicis* Geijskes. Despite the consensus that citrus leprosis has viral etiology, there are many pending questions regarding the viral interactions with the infected plant and the viruliferous mites. The solution of these questions may contribute to a better disease integrated management. This work aimed to obtain a better understanding about the virus-plant-vector relationship with the host cell by immunolocalization assays of the putative movement protein (MP), helicase (protein involved in the viral replication) and p29 (putative coat protein) of the CiLV-C. ORFs coding sequences of *mp* and *hel* was amplified by RT-PCR and cloned in the expression vector. Afterwards, *in vitro* expression of these proteins in *E. coli* and its purification by affinity chromatography were realized. The purified MP was used to produce specific polyclonal antibody that was tested for specificity by serological methods. The ELISA results showed that high concentration antibody reacted with the leaves extracts from lesions in all the disease stage of development. Furthermore, the old lesions reacted more intensely than the younger. Western blot (which detected only the pure protein) and *in situ* immunolocalization assays failed to detect the native MP in lesioned leaf extracts. The results as a whole suggest the occurrence of low expression of MP in host tissue. The polyclonal antibody against p29 was able to detect the virus in lesioned plant extracts by PTA-ELISA, Western Blot, and Tissue Blotting. The viral nature of the putative viral particles, present within endoplasmic reticulum cisternae of infected leaf tissue, was confirmed by immunogold label. The labeling also occurred intensely in the viroplasmas, indicating that these structures represent p29 protein accumulation site. Putative virus particles, visualized in viruliferous *B. phoenicis*, between membranes of adjacent cells (midgut, prosomal glands, epidermis, muscles), was also immunogold labeled indicating that they represent CiLV-C. The absence of viroplasma in the mite tissues suggests that CiLV-C / *B. phoenicis* relationship is of the circulative type, without replication. Based on this finding, we search for possible alternatives for the viral circulation in the mite body from the midgut lumen to the salivary duct for the infection of a healthy plant to occur.

**Keywords:** Citrus leprosis virus C (CiLV-C); *Brevipalpus phoenicis*; *Citrus sinensis*, Protein expression; Polyclonal antibody; *in situ* Immunolocalization



## 1 INTRODUÇÃO

A leprose dos citros, causada pelo Citrus leprosis virus C (CiLV-C), é considerada uma das principais doenças viróticas da citricultura brasileira por afetar *Citrus spp.*, principalmente laranjas-doce (MULLER et al., 2005). No Brasil são gastos aproximadamente U\$100 milhões por ano para o controle químico do ácaro vetor, o *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (BASTIANEL et al., 2006). Além da relevância na citricultura brasileira, a leprose vem aumentando de importância no cenário internacional, uma vez que foi recentemente relatada em pomares na América Central e, aparentemente, está se disseminando em direção ao norte do continente. A doença manifesta-se através de lesões locais cloróticas à necróticas nas folhas, frutos com lesões deprimidas cloróticas ou marrons e seca de ramos. Além disso, pode levar à queda prematura de folhas e frutos comprometendo seriamente a produção e vida útil das plantas (RODRIGUES et al., 2003; BASTIANEL et al., 2006).

Apesar dos avanços nas pesquisas sobre o CiLV-C, como a obtenção de ferramentas moleculares para diagnóstico da doença e o sequenciamento completo do genoma viral, as informações disponíveis sobre as interações que ocorrem entre vírus-ácaro-planta ainda não estão totalmente esclarecidas. Há carência de informações essenciais como o processo de infecção e replicação do vírus nos tecidos hospedeiros, razões da ausência de infecção sistêmica e sobre a relação do vírus com o vetor. Estas informações são fundamentais para compreender melhor a epidemiologia da doença e estabelecer estratégias mais econômicas de controle.

A dificuldade na obtenção do vírus purificado pelo fato do CiLV-C não infectar suas hospedeiras sistemicamente, apresentar baixo título e labilidade das partículas, compromete a obtenção de antissoro a partir de partículas puras. Um dos fatores limitantes para o acompanhamento da expressão de proteínas virais em células infectadas inclui a falta de ferramentas sorológicas. Como parte das estratégias para avançar nesta linha de pesquisa, procurou-se expressar *in vitro* algumas proteínas essenciais ao ciclo de vida do CiLV-C e utilizá-las na produção de anticorpos específicos para detecção do vírus.

A detecção de proteínas expressas pelo CiLV-C *in situ* poderá fornecer inúmeras informações como o sítio de replicação viral, local de acúmulo de determinadas proteínas, morfogênese dos vírions, tipo de relacionamento vírus-vetor e processo de aquisição e inoculação viral. Além disso, será possível confirmar a identidade dos vírions e explicar a natureza e função do viroplasma citoplasmático.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Vírus transmitidos por *Brevipalpus*

Os vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (VTBs) dividem-se em dois grupos, nuclear e citoplasmático, que, além do vetor, possuem em comum a morfologia das partículas e os efeitos citopáticos. Numerosos casos de VTBs já foram identificados em diferentes espécies de plantas, todos eles se caracterizando por causarem infecções localizadas (manchas anelares/cloróticas/verdes/necróticas) em folhas, ramos e frutos (KITAJIMA et al., 2003).

O tipo nuclear apresenta partículas nuas em forma de bastonetes curtos (40 nm x 100 nm), presentes no núcleo ou citoplasma das células, comumente associadas perpendicularmente às membranas do invólucro nuclear e ao retículo endoplasmático. Frequentemente formam configurações conhecidas como “roda de carroça”, nas quais as membranas ficam arranjadas em círculos e os vírions organizados radialmente (KITAJIMA et al., 2003). A principal característica destes vírus é a formação de um viroplasma elétron-transparente localizado no núcleo da célula hospedeira (KITAJIMA et al., 2003). Os vírus do tipo nuclear foram encontrados pela primeira vez em orquídeas infectadas pelo vírus da mancha da orquídea (Orchid fleck virus - OFV) (DOI et al., 1969, 1977; KITAJIMA et al., 1974a, 2003) e, posteriormente, em vários casos como em alguns isolados de leprose dos citros do tipo nuclear (Citrus leprosis virus nuclear type - CiLVC-N), mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus - CoRSV), mancha clorótica do *Clerodendrum* (*Clerodendrum* ringspot virus - CIRSV), mancha clorótica de *Solanum violaefolium* (*Solanum violaefolium* chlorotic spot virus - SvCSV), mancha clorótica do *Hibiscus* (*Hibiscus* chlorotic spot virus - HCSV), mancha anular do *Malvaviscus* (*Malvaviscus* ringspot virus - MRSV), entre outros (KITAJIMA et al., 2003).

O tipo citoplasmático apresenta partículas baciliformes, envoltas por membranas (50-60 nm x 110-120 nm), acumulando-se em cisternas do retículo endoplasmático. Em células infetadas, ocorre usualmente uma inclusão densa e vacuolada no citoplasma referida como viroplasma. O tipo citoplasmático foi encontrado pela primeira vez na Argentina, em amostras de folhas afetadas por “lepra explosiva”, e identificado como um isolado do CiLV (KITAJIMA et al., 1974b). Posteriormente, a maioria dos isolados

brasileiros encontrados têm sido referidos como leprose dos citros tipo citoplasmático (Citrus leprosis virus C - CiLV-C) (COLARICCIO et al., 1995; RODRIGUES et al., 2003). Fazem parte deste grupo, além do CiLV-C, outros vírus como o da mancha verde do maracujá (Passion fruit green spot virus - PFGSV) (KITAJIMA et al., 1997), mancha anular do *Solanum violaefolium* (*Solanum violaefolium* ringspot virus - SvRSV) (FERREIRA et al., 2007), mancha verde do *Hibiscus* (*Hibiscus* green spsot virus - HibGSV) (KITAJIMA et al., 1999a), mancha anular do *Ligustrum* (*Ligustrum* ringspot virus - LigRSV) (VERGANI, 1942; RODRIGUES et al., 1995b), mancha anular de *Schefflera* (*Schefflera* ringspot virus - SchefRSV) (KITAJIMA et al., 1999b), mancha anular do manacá (*Brunfelsia* ringspot virus - BrRSV) (NOGUEIRA et al., 2001), dentre outros.

Além da semelhança morfológica entre as partículas dos VTBs e dos rhabdovírus, embora mais curtas, esta dicotomia também é similar aos rhabdovírus de plantas, que são divididos em dois gêneros, *Nucleorhabdovirus* e *Cytorhabdovirus*, de acordo com o local da sua replicação (WALKER et al., 2000). Em razão destas semelhanças, os VTBs eram considerados membros tentativos da família *Rhabdoviridae*. O OFV, primeiro VTB a ser caracterizado molecularmente, possui genoma composto por duas fitas de ssRNA sentido negativo, cada uma com cerca de 6.000 nucleotídeos. Baseado em semelhanças com os nucleorhabdovírus de estrutura genômica, morfologia da partícula, características de distribuição celular e formação de viroplasma no núcleo das células (KONDO et al., 1998, 2003), Kondo et al. (2006) propuseram a classificação do OFV como espécie tipo de um novo gênero, *Dichorhabdovirus*, dentro da família *Rhabdoviridae*, porém, possuindo genoma bipartido.

Por outro lado, o sequenciamento completo do genoma do CiLV-C (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006) mostrou que suas características moleculares são bem distintas dos rhabdovírus típicos. De fato, a maior similaridade com vírus de partículas rígidas alongadas e com genoma composto de ssRNA sentido positivo reforçou a hipótese de que o CiLV-C não fazia parte da família *Rhabdoviridae* (LOCALI et al., 2003b; LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006). Desta

forma, atualmente o CiLV-C encontra-se classificado como espécie tipo de um novo gênero de planta denominado *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2006, 2008a).

A falta de conhecimento mais profundo das inúmeras viroses transmitidas por *Brevipalpus*, assim como das exatas relações existentes entre elas, deixa claro a necessidade de melhor estudá-las para ampliar as informações disponíveis. Dentro deste contexto, muitas das informações geradas poderão esclarecer os parâmetros epidemiológicos destas viroses, além de permitir o estabelecimento de estratégias de manejo integrado mais adequadas e eficientes do que as atuais, principalmente em relação àquelas de maior importância econômica, como a mancha anular do cafeeiro, a pinta verde do maracujazeiro e a leprose dos citros. (FERREIRA, 2007).

## 2.2 Leprose dos citros

A leprose dos citros, cujo agente etiológico é um vírus transmitido pelo *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) (MUSUMECI; ROSSETTI, 1963; CHIAVEGATO; MISCHAN, 1987; RODRIGUES et al., 2003), é considerada uma das principais enfermidades dos citros no Brasil (ROSSETTI et al., 1993; BASTIANEL et al., 2006). A doença manifesta-se através de lesões locais circulares cloróticas ou necróticas nas folhas, frutos com lesões deprimidas cloróticas ou marrons e seca de ramos devido à confluência de lesões. A infecção resulta na queda prematura de folhas e frutos, comprometendo seriamente a produção. Além disso, a morte descendente dos ramos reduz a vida útil das plantas, podendo levá-las à morte (RODRIGUES et al., 2003; BASTIANEL et al., 2006). A doença pode ocorrer em qualquer época do ano, sendo sua disseminação mais frequente em períodos de seca, entre abril e setembro, época favorável à expansão da população do ácaro (FUNDECITRUS, 2009).

Dentro do gênero *Citrus*, as laranjas doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) são consideradas as mais suscetíveis ao CiLV-C, sendo a variedade 'Pêra', uma das mais plantadas no estado de São Paulo, amplamente afetada pela doença. As tangerinas (*C. reticulata* Blanco, *C. reshni* Tanaka, *C. deliciosa* Tenore) e híbridos como "Murcott" são menos suscetíveis ao vírus, enquanto os limões (*C. limon* L. Osbeck) e as limas [*C. aurantifolia* Christmann Swingle] são considerados imunes. (RODRIGUES et al., 1995a, 2000, BASTIANEL et al., 2006, 2008).

Até recentemente, nenhum outro gênero de planta era conhecido por servir como hospedeiro natural do vírus causador da leprose. Entretanto, León et al. (2008), na região de Llanos Centrais na Colômbia, encontraram *Swinglea glutinosa*, uma rutácea arbustiva frequentemente usada como cerca viva ao redor de pomares de citros, naturalmente infectada pelo CiLV-C. Em condições experimentais e com algumas dificuldades, lesões locais foram obtidas em hospedeiros herbáceos inoculados mecanicamente (*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reynaud, *C. quinoa* Willdenow e *Gomphrena globosa* L.) (COLARICCIO et al., 1995). Nos últimos anos, outras espécies vegetais como *Solanum violaefolium*, feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.), urucum (*Bixa orellana* L.), malvavisco (*Malvaviscus arboreus* DC.), hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) e gravílea (*Gravilea robusta* A. Cunn.) foram relatadas como hospedeiras do CiLV-C em ensaios de transmissão com ácaros (RODRIGUES et al., 2005; GROOT et al., 2006; NUNES et al., 2006; NUNES, 2007).

A doença ocorre nas Américas do Sul, Central e do Norte, estando atualmente ausente nos EUA (CHILDERS et al., 2003c), onde foi relatada pela primeira vez (FAWCETT, 1907) no Estado da Flórida. Há descrições de leprose em citros no sudeste asiático e África do Sul (FAWCETT, 1936), mas sem comprovações posteriores a respeito (MURAYAMA et al., 2000), exceto pelo relato feito na Índia por Choudhari (1978), descrevendo os sintomas em citros. Este relato, contudo, seria uma interpretação equivocada de lesões de sorose (E.W.KITAJIMA, *comunicação pessoal*).

No Brasil, a doença foi identificada pela primeira vez em 1933, no Estado de São Paulo (BITANCOURT, 1940, 1955), onde atualmente ocorre de forma endêmica em todas as áreas do planalto paulista, principalmente nas regiões Norte e Noroeste. Também já foi descrita em quase todos os estados que produzem citros (BASTIANEL et al., 2006; FUNDECITRUS, 2009).

A etiologia da leprose dos citros inicialmente foi controversa, atribuindo-se o envolvimento de fungos, sendo apontados *Colletotrichum gloesporioides*, *Hormodendron* sp. e *Clamidosporum herbarium* var. *citri* como possíveis patógenos (FAWCETT, 1936). Na década de 30, constatou-se doença similar em pomares cítricos no Paraguai e Argentina, tendo-se demonstrado ser transmissível por *B. obovatus* Donnadieu (VERGANI, 1945). Nos EUA, Knorr (1950, 1968) mostrou que *B. phoenicis*,

*B. obovatus* e *B. californicus* (Banks) transmitiam a leprose, enquanto, no Brasil, há relatos apenas da transmissão por *B. phoenicis* (MUSUMECI; ROSSETTI, 1963). Posteriormente, vários estudos sobre a transmissão da leprose pelo ácaro foram realizados, verificando-se que todas as fases ativas de seu desenvolvimento (larva, ninfa e adulto) poderiam adquirir e inocular o vírus, e que, possivelmente, o vírus se replicaria no ácaro (CHAGAS et al., 1983; CHIAVEGATO, 1995; RODRIGUES et al., 2003). Evidências de que os sintomas não seriam causados pela toxina do ácaro, mas por um vírus, foram obtidas por Knorr (1968), que observou a expansão da lesão em ramo do enxerto para o tecido sadio, e por Kitajima et al. (1972), que detectaram presumíveis partículas virais do tipo nuclear em secções de tecido de citros com lesão leprótica. Contudo, trabalhos posteriores envolvendo microscopia eletrônica de transmissão observaram prevalentemente partículas do tipo citoplasmático (KITAJIMA et al., 1974b; COLARICCIO et al., 1995). Também foi demonstrada a transmissibilidade mecânica do CiLV-C de citros para citros e outras hospedeiras herbáceas (COLARICCIO et al., 1995).

O conhecimento sobre CiLV-C teve um grande avanço quando Colariccio et al. (2000) e Rodrigues (2000) puderam extrair dsRNA de tecidos lesionados, obtendo duas bandas de alto peso molecular. Os materiais sadios não apresentaram bandas indicando que, em alguma fase do seu ciclo de vida, o CiLV-C gera dsRNA (LOCALI, 2002). Locali et al. (2003a) confirmaram a presença de dsRNA em CiLV-C e a partir destes, Locali et al. (2003b) clonaram parte do genoma do vírus e desenvolveram primers capazes de amplificar por RT-PCR dois fragmentos do RNA viral apresentando similaridades com genes codificadores de proteínas de movimento e replicase de vírus de plantas. Este trabalho abriu caminho para a detecção molecular do CiLV-C, tendo sido demonstrado a ocorrência generalizada do vírus no Brasil, através da análise de amostras de laranjeiras com sintomas de leprose coletadas em várias unidades da federação (LOCALI et al., 2004) e também em vários países da América do Sul e Central (BASTIANEL et al., 2006). O método também foi sensível para detecção do vírus em todas as fases de desenvolvimento do ácaro, exceto nos ovos, demonstrando que não existe transmissão transovariana do vírus (FREITAS-ASTUA et al., 2003).

Os estudos moleculares do CiLV-C realizados pelos autores referidos anteriormente serviram como base para que seu genoma fosse completamente sequenciado em 2006 (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006). Até pouco tempo atrás, o CiLV-C era considerado um possível membro da família *Rhabdoviridae* por possuir partícula morfológicamente semelhante à destes vírus. No entanto, após a comparação da sequência completa do CiLV-C com as demais sequências depositadas no GenBank, ficou nítida a ausência de similaridade com rhabdovírus típicos. De fato, enquanto estes possuem genoma monopartido composto por ssRNA sentido negativo, o CiLV-C apresenta genoma bipartido composto por ssRNA sentido positivo. Além disso, a maior similaridade com vírus de partículas rígidas alongadas e com genoma composto de ssRNA sentido positivo, como furovírus e tobamovírus, reforça a hipótese de que o CiLV-C é significativamente distinto dos rhabdovírus (LOCALI et al., 2003b; LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006). De acordo com a nova taxonomia aceita pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), o CiLV-C encontra-se classificado como espécie tipo de um novo gênero de plantas denominado *Cilevirus*, o qual possivelmente incluirá outros vírus com partículas baciliformes, transmitidos por *Brevipalpus* e similares ao CiLV-C (LOCALI-FABRIS et al., 2006, 2008a).

O genoma do CiLV-C possui duas partículas de ssRNA, totalizando aproximadamente 14Kb. O RNA 1, com 8.793 nucleotídeos (nt), é composto por duas ORFs. A primeira é formada por quatro domínios funcionais conservados (metiltransferase, cisteína-protease, helicase e RNA polimerase) que codificam uma poliproteína com possível função de replicase, e a segunda que codifica uma proteína de aproximadamente 29KDa (p29), cuja possível função é de capa protéica (LOCALI-FABRIS et al., 2006). O RNA 2, com 5.064 nt, é composto por quatro ORFs, porém, apenas a ORF3 ou MP apresenta domínio funcional conservado (possível proteína de movimento). As outras três ORFs, p15, p61 e p24, apresentam domínios funcionais desconhecidos (Figura 1) (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006). Análises filogenéticas agruparam a sequência do domínio de helicase próxima às sequências dos gêneros *Benyvirus*, *Hepevirus* e *Vitivirus*. A RdRp aparece junto com membros dos gêneros *Tobamovirus*, *Furovirus*, *Pomovirus*, *Tobravirus* e *Bromovirus*, e

a possível proteína de movimento agrupa-se com membros dos gêneros *Furovirus*, *Bromovirus* e *Umbravirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2006).

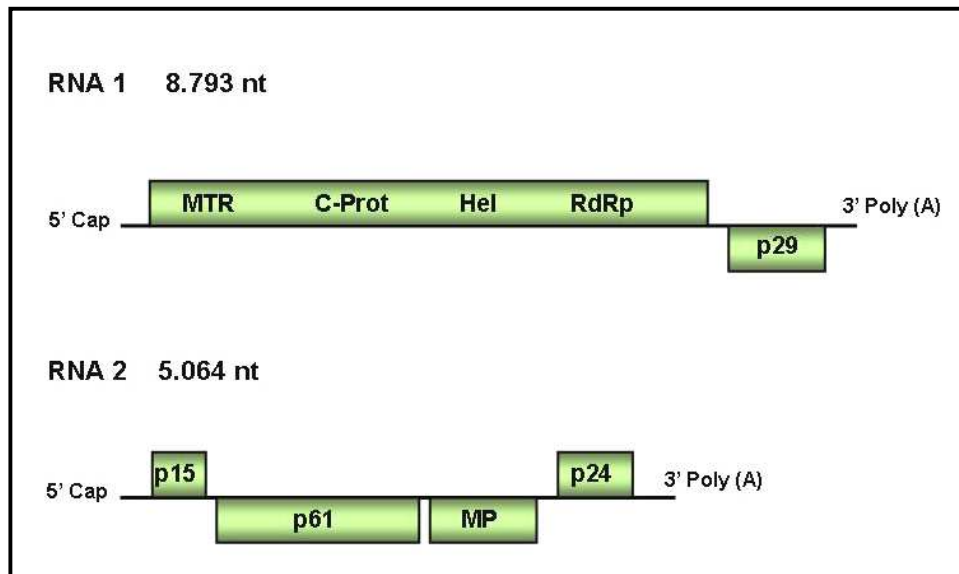


Figura 1 - Organização do genoma do CiLV-C. **RNA 1:** composto por duas ORFs, as quais estão indicadas pelos retângulos. A primeira ORF é composta por quatro domínios: metiltransferase (MTR), cisteína-protease (C-Prot), helicase (Hel) e RNA polimerase (RdRp). A segunda ORF codifica uma proteína deduzida de 29KDa (possível proteína capsial). **RNA 2:** composto por quatro ORFs que estão indicadas nos retângulos. A primeira codifica uma proteína de 15KDa, a segunda uma de 61 KDa, a terceira uma de aproximadamente 32 KDa (possível proteína de movimento) e a quarta uma proteína de 24 KDa. Fonte: Locali-Fabris et al. (2006)

A sequência do CiLV-C obtida por Pascon et al. (2006) foi patenteada pela empresa de biotecnologia Alellyx Genomics, que já gerou laranjeiras transgênicas expressando genes do CiLV-C. Algumas plantas mostraram-se resistentes à infecção experimental pelo CiLV-C em condições de casa de vegetação e, atualmente, encontram-se na fase dos testes de campo (Alellyx Genomics, *comunicação pessoal*).

Do lado epidemiológico, há evidências de que plantas que servem como quebra-vento ou cerca-viva ao redor de pomares podem abrigar ácaros e o CiLV-C (NUNES, 2004, 2007). O tipo nuclear (CiLV-N), embora tenha sido o primeiro a ser visualizado em amostra oriunda do município de Santo Antonio da Posse, SP (KITAJIMA et al., 1972), é de rara ocorrência. Só em 2001 foi reencontrado durante um levantamento no Panamá, na localidade de Boquete, província de Chiriqui, numa área mais fria e de maior altitude. Em uma localidade próxima, porém mais baixa e quente (Potrerillos) ocorria apenas o tipo citoplasmático (DOMINGUES et al., 2001). Isto levou a suspeitar

de que o tipo nuclear tendesse a ocorrer em zonas mais frias. De fato, levantamentos recentes feitos no estado de São Paulo permitiram a detecção de dois focos pequenos em pomares caseiros, localizados nos municípios de Monte Alegre do Sul, Amparo (KITAJIMA et al., 2004) e São Roque, além de um foco no estado de Minas Gerais, em Andradas,(CHAGAS; KITAJIMA, dados não publicados), todos ocorrendo em zonas montanhosas com altitude superior a 800m. Os primers para CiLV-C não amplificam CiLV-N, o que leva a presumir que sejam vírus distintos (FREITAS-ASTÚA et al., 2005).

### 2.3 O vetor

A importância dos ácaros do gênero *Brevipalpus* vem crescendo, tornando-se evidente seu potencial como praga de plantas, especialmente por sua capacidade de transmitir vírus (CHILDERS et al., 2003b; KITAJIMA et al., 2003; KONDO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2003).

A espécie *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) é polífaga e apresenta distribuição cosmopolita (RODRIGUES, 1995), assegurada em grande parte pela capacidade de colonizar efetivamente um grande número de gêneros vegetais, entre elas plantas daninhas e cercas vivas em pomares cítricos, que favorecem sua multiplicação e disseminação (CHILDERS et al., 2003a). É encontrado na África, Ásia, Austrália, Europa, Ilhas do Pacífico e Américas do Sul e do Norte (HARAMOTO, 1969), tendo sua presença confirmada em citros no Brasil em 1959 (ROSSETTI; SALIBE, 1959). As fêmeas se reproduzem principalmente por partenogênese telítoca originando novas fêmeas e os machos, raramente encontrados, representam cerca de 1% da população. Não há evidências de reprodução sexuada nas espécies de *Brevipalpus* que atuam como vetores (CHILDERS et al., 2003a). As fêmeas são haplóides, com dois cromossomos geneticamente distintos (HELLE; BOLLAND, 1972; WEEKS et al., 2001). Weeks et al. (2001) demonstraram de que a feminilização de *B. phoenicis* devia-se à presença de uma bactéria endossimbionte, posteriormente identificada como *Cardinium*. O fato também foi constatado entre outras espécies de *Brevipalpus* (CHIGIRA; MIURA, 2005; NOVELLI et al., 2005b; GROOT; BREEUWER, 2006). Ainda não se sabe ao certo qual a influência do endossimbionte nas relações patógeno-hospedeiro, no entanto, estudos realizados por Novelli et al. (2008) sobre a eficiência de



transmissão do vírus da leprose dos citros por populações apossimbióticas (ácaros naturalmente livres do simbiote) sugerem que a bactéria não influencia na inoculação do CiLV-C por *B. phoenicis*, porém, há indícios de eficiência diferencial neste processo entre populações do ácaro (ARRIVABEN et al., 2007). Estudos ultraestruturais revelaram que o endossimbionte *Cardinium* encontra-se disseminado em todos os tecidos do ácaro *Brevipalpus*, alojando-se diretamente no citoplasma (KITAJIMA et al., 2007).

O ciclo biológico do ácaro da leprose é constituído pelas fases de ovo, larva, protoninfa, deutoninfa e adulto. A duração destes estágios é variável em função principalmente da temperatura, atingindo aproximadamente, em várias condições de laboratório, nove gerações por ano (LAL, 1978). A postura é realizada em locais protegidos, como frestas na superfície de plantas, sendo os ovos colocados individualmente. Entretanto, é comum verificar a presença de ovos agrupados (HARAMOTO, 1969).

O principal método empregado no controle do ácaro é a pulverização de produtos químicos, sendo a seleção de linhagens resistentes à acaricida a principal ameaça dos programas de controle (OMOTO, 1995). Anualmente são gastos no estado de São Paulo aproximadamente 100 milhões de dólares com acaricidas, visando manter a densidade populacional desta praga abaixo do nível de dano econômico (RODRIGUES et al., 2003). Há cerca de uma década, mais de 60% dos pomares paulistas apresentavam sintomas de leprose (SALVA; MASSARI, 1995). A situação atual não parece ter mudado muito, sendo que, quando não tratados, esses pomares podem servir como fonte de ácaros e vírus, contribuindo desta forma para a disseminação da doença para outras áreas cultivadas.

O CiLV-C seria transmitido de maneira circulativa-propagativa pelo ácaro vetor *B. phoenicis* (RODRIGUES et al., 2003). Rodrigues (2000) descreveu o que julgou ser partículas similares a vírus observadas por MET nos tecidos de *B. phoenicis* virulífero para CiLV-C. Estudos posteriores de Kitajima et al. (2008) não confirmaram estas observações, mas detectaram presumíveis vírions localizados entre as membranas de células adjacentes do intestino médio, glândulas prosomais, músculos e epiderme do ácaro vetor. A ausência de partículas virais e viroplasmas no interior das células do

ácaro foi o primeiro indício de que o vírus não se replicaria no vetor. Além disso, apesar de ter sido possível detectar o vírus no ácaro por RT-PCR (FREITAS-ASTÚA et al., 2003), estudos de RT-qPCR indicam que, aparentemente, não ocorre aumento do título viral em ácaros virulíferos após a alimentação em plantas doentes, reforçando esta hipótese (NICOLINI -TEIXEIRA, 2008; FREITAS-ASTÚA et al., 2008a).

#### **2.4 Expressão de proteínas virais**

O entendimento do complexo vetor/vírus/hospedeira da leprose dos citros é uma premissa básica para a montagem de estratégias de controle integrado da doença. Como parte destes esforços, o sequenciamento completo do genoma do CiLV-C gerou informações essenciais para proposição de novas investigações envolvendo expressão *in vitro* de proteínas virais. Dentro desta linha de pesquisa, o presente trabalho teve como foco estudar as interações do vírus com as células hospedeiras, acompanhando a expressão *in situ* das proteínas MP, Rep (domínio de helicase) e p29 (putativa proteína capsidial) nos tecidos da planta hospedeira e do ácaro vetor. Tais proteínas foram escolhidas como modelo por estarem envolvidas em mecanismos essenciais do ciclo de replicação e infecção viral.

Teoricamente, um vírus de planta necessita de pelo menos três proteínas para completar o seu ciclo de vida: uma replicase, uma proteína de movimento célula-a-célula e uma proteína capsidial. A expressão do genoma viral é feita dominando a maquinaria de síntese de proteínas da célula suscetível. Muitos vírus, contudo, codificam várias outras proteínas com funções diversas como fatores de transmissão por afídeos, proteases, glicoproteínas, etc. Em todas estas etapas, as proteínas codificadas pelo vírus devem interagir com proteínas do hospedeiro, a fim de executar suas funções e permitir o sucesso da infecção viral, além de superar mecanismos de resistência da célula hospedeira como o silenciamento gênico (HULL, 2002). A regulação da expressão de proteínas determina a quantidade de proteína produzida ao longo do ciclo de vida do vírus ou permite a produção da proteína apenas durante pontos específicos do ciclo. Muitas vezes, está intimamente relacionada com a estratégia de replicação do genoma e de expressão dos genes virais, incluindo segmentação do genoma como ocorre com *Potyvirus*, síntese de RNAs subgenômicos

como os *Tobamovirus*, mudança de fase durante a tradução, entre outras (ZERBINI et al., 2002).

A grande maioria dos vírus que infectam plantas possui genoma composto de RNA de fita simples (ssRNA). Como as plantas não possuem enzimas capazes de replicar a molécula de RNA viral, as enzimas polimerases de RNA dependente de RNA, ou RdRps, devem ser codificadas pelo vírus. As replicases já foram caracterizadas para muitos vírus de plantas e, na maioria dos casos, existem duas funções principais que muitas vezes podem estar presentes em duas proteínas distintas: helicase e polimerase. Cada uma dessas funções está associada à sequências específicas de aminoácidos. Atualmente, uma proteína viral pode ser designada helicase ou polimerase, com base simplesmente na presença dessas regiões (HULL, 2002; ZERBINI et al., 2002).

As helicases são enzimas que catalisam a separação das fitas duplas do DNA ou RNA, desempenhando papel importante na replicação e recombinação do genoma viral (HULL, 2002). São capazes de desenovelar as estruturas duplex dos ácidos nucléicos através da ruptura das pontes de hidrogênio que mantém as duas fitas unidas. As helicases agrupam-se dentro de cinco superfamílias de acordo com a presença de regiões com sequências conservadas de aminoácidos (KADARÉ; HAENNI, 1997; (HULL, 2002; CORDIN et al., 2006). O CiLV-C, assim como a maioria dos vírus de planta com ssRNA sentido positivo, possui helicase pertencente à superfamília I, incluindo Furo-, Clostero-, Bromo-, Tobamo-, Tobavírus, entre outros (KADARÉ; HAENNI, 1997; HULL, 2002; LOCALI-FABRIS et al., 2006). As superfamílias I e II possuem sete regiões conservadas enquanto a superfamília III tem apenas três. As três superfamílias representativas das helicases de vírus de planta (SFI, SFII e SFIII) possuem duas regiões comuns que apresentam variações do domínio de ligação em ATP e as sequências conservadas GXXXXGKT/S e  $\emptyset\emptyset\emptyset$ D, onde X é um aminoácido específico e  $\emptyset$  um resíduo hidrofóbico (HULL, 2002). As DNA e RNA helicases podem estar ativas como monômeros ou dímeros (CORDIN et al., 2006).

Os trabalhos com proteínas helicases geralmente envolvem estudos de sua ação enzimática como ATPase e RNA helicase. Jin e Peterson (1995), investigaram a região carboxi-terminal da proteína não estrutural 3 (NS3) do vírus da hepatite C (Hepatite C

virus - HCV), possivelmente envolvida com a função de ATPase/RNA helicase. Para tal, promoveram a expressão *in vitro* e a purificação da proteína, medindo-se posteriormente sua atividade enzimática. Foi possível identificar que a região estudada possui ambas as atividades, NTPase e RNA helicase; que ATP é o substrato preferido para atividade da NTPase; e que a atividade de RNA helicase depende de ATP e de cátions divalentes, podendo ser utilizado o magnésio.

Estudos realizados por Fernández et al. (1995) para avaliar o envolvimento da proteína CI do *Plum pox virus* (PPV) no processo replicação do RNA viral (putativa helicase) e sua possível participação no movimento célula-a-célula durante a infecção viral, mostraram que a proteína expressa *in vitro* por meio de células bacterianas era extremamente insolúvel. Vários métodos de solubilização e renaturação testados pelo grupo não foram eficazes para permitir a avaliação de sua atividade como RNA helicase. A solução encontrada foi promover a expressão da proteína fusionada com maltose e sua purificação por cromatografia de afinidade utilizando resina carregada com amilose. Neste experimento, além de grandes perdas da CI no “flow-through”, a quantidade de proteína pura eluída foi muito baixa, porém, sendo suficiente para que as atividades enzimáticas de RNA helicase e NTPase fossem identificadas.

Assim, a expressão *in vitro* do domínio de helicase do CiLV-C é possível de ser promovida, porém, não descartamos a existência de dificuldades na obtenção da proteína solúvel e na etapa de sua purificação. Desta forma, sua utilização para produção de antissoro seria um terceiro desafio, devido a grande probabilidade de a proteína estar presente na fração insolúvel. Por outro lado, se o antissoro produzido for antigênico, a comprovação de existência ou não de replicação viral no interior do ácaro vetor seria esclarecedora a respeito do tipo de relacionamento que ocorre entre o vírus e o ácaro.

A movimentação do vírus dentro da planta requer dois passos: movimento célula-a-célula (curta distância) e movimento pelo sistema vascular para diferentes partes da planta (longa distância) (WAIGMANN et al., 2004; LUCAS, 2006). O movimento célula-a-célula envolve a participação de pelo menos uma proteína não estrutural com função de permitir ou auxiliar o processo, denominada proteína de movimento. As MPs possuem dois mecanismos de ação já elucidados. O primeiro através de formação de

túbulos conectando células adjacentes, pelos quais os vírions passam de uma célula para outra. Os túbulos são formados pela proteína de movimento por meio de modificações estruturais dos plasmodesmas primários (KASTEEL, 1999; ZERBINI et al., 2002, WAIGMANN et al., 2004; LUCAS, 2006). O segundo mecanismo pelo qual os vírus se deslocam de uma célula para outra é através do aumento no limite de exclusão dos plasmodesmas, de modo a permitir a passagem de complexos formados pelo genoma viral e uma ou mais proteínas virais. Este limite de exclusão em células vegetais saudáveis é muito inferior à massa molecular dos menores fitovírus, ou mesmo de seus RNAs ou DNAs genômicos. Dessa forma, o transporte do ácido nucléico viral através dos plasmodesmas deve necessariamente levar ao aumento do limite de exclusão (DEON et al., 1990; CITOVSKY; ZAMBRYNSKI, 1993; ZERNINI et al., 2002; LUCAS, 2006).

Para alguns vírus, por exemplo, o vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus* - TMV) e o vírus do mosaico da couve-flor (*Cauliflower mosaic virus* - CaMV), a necessidade da proteína de movimento para o movimento célula-a-célula foi comprovada realizando-se mutações na MP e produção de plantas transgênicas (DEOM et al., 1987; THOMAS et al., 1993). Deom et al. (1990) produziram plantas transgênicas de fumo expressando a MP do TMV e demonstraram que a proteína estava associada às membranas celulares de todos os tecidos da planta. Além disso, a quantidade da MP-TMV detectada em folhas maduras foi maior do que em folhas jovens.

A localização *in situ* da proteína de movimento tem sido pesquisada em vários trabalhos através de técnicas de imunomarcação, e as conclusões mostram que as MPs estão frequentemente localizadas nas paredes celulares das plantas infectadas, mais precisamente nos plasmodesmas ou próximas a eles, aumentando seu limite de exclusão e a permeabilidade plasmodesmal (TOMENIUS et al., 1987; WOLF et al., 1989; LENT et al., 1990; CHEN et al., 2000).

Enquanto as interações entre proteínas do hospedeiro e replicases virais parecem ser pouco específicas, o oposto ocorre com interações envolvendo proteínas virais responsáveis pelo movimento. Essa observação é decorrente de estudos de replicação viral em protoplastos, quando se observa que muitos fitovírus são

normalmente capazes de se replicar em protoplastos de plantas que não permitem o estabelecimento de infecção sistêmica. Assim, pode-se supor que a restrição ao movimento, e não à replicação, vai determinar o sucesso ou fracasso da infecção de determinados fitovírus. Esse fato demonstra a importância do estudo dos processos envolvidos no movimento célula-a-célula e a longa distância, pois novas formas de controle de doenças virais podem surgir à proporção que esses processos sejam elucidados (ZERBINI et al., 2002).

Em estudos envolvendo interação entre proteínas do hospedeiro e do patógeno (sistema de duplo híbrido). Chen et al. (2000) demonstraram haver interação entre a proteína pectina metilesterase (PME), frequentemente associada à parede celular de várias espécies de plantas, com as MPs do TMV, do vírus do clareamento das nervuras do nabo (*Turnip vein clearing virus* - TVCV) e do CaMV. Adicionalmente, além de identificar o domínio da MP responsável pela ligação à PME, ensaios de imunolocalização *in situ* utilizando antissoro contra PME permitiram a marcação específica da proteína na parede celular de células do mesófilo da folha de fumo. Os autores sugerem a possível participação da PME como auxiliadora do movimento célula-a-célula e distribuição do TMV.

A peculiaridade do CiLV-C em causar somente lesões locais nos leva a indagar inúmeras questões sobre o que acontece com a proteína de movimento após a infecção. Desta forma, a identificação tanto da helicase como da MP em células do hospedeiro e do ácaro vetor poderá esclarecer diversos pontos fundamentais sobre as interações que ocorrem neste patossistema.

O capsídeo viral é uma camada ou “capa” protetora que reveste o ácido nucléico, constituída de moléculas de proteína (as subunidades) compactadas lateralmente umas às outras. Além da função de encapsidação da partícula viral, as proteínas capsidiais (CP) podem estar envolvidas com transmissão por afídeos (ATREYA et al., 1991, 1995), movimento célula-a-célula (DOLJA et al., 1995), movimento a longa distância (DOLJA et al., 1994), replicação viral (MAHAJAN et al., 1996), determinação de sintomas (HALDEMAN-CAHILL et al., 1998), entre outros.

Evidências genéticas demonstraram que a função da CP do potyvírus *Tobacco etch virus* (TEV) é independente da formação de vírions. Mutantes na região central da

CP do TEV não foram capazes de se movimentar célula-a-célula e, deleções na região amino-terminal da proteína também implicaram em redução no movimento, podendo esta região atuar de forma acessória (DOLJA et al., 1995). Em outro experimento, mutantes do TEV nos quais ocorreu terminação prematura da tradução apresentaram replicação deficiente, enquanto mutantes nos quais a fase de leitura foi modificada, porém sem terminação prematura, se replicaram normalmente. Estes resultados indicam que a tradução completa da região codificadora da CP, porém não a proteína propriamente dita, é essencial para replicação (MAHAJAN et al., 1996).

Verificou-se envolvimento da CP na movimentação a longas distâncias em mutantes de TEV-GUS apresentando deleções nas porções amino- e carboxi-terminais da CP. O movimento a longa distância destes mutantes não pode ser restabelecido pela expressão da CP a partir de plantas transgênicas. No caso do *Pea seed born mosaic virus* (PSbMV), verificou-se por meio da análise genética de quimeras que a substituição de uma serina na posição 47 da CP era suficiente para permitir o movimento a longa distância em *Chenopodium quinoa* de um isolado normalmente restrito às folhas inoculadas (ANDERSEN; JOHANSEN, 1998).

A produção de antissoros específicos para detecção de fitovírus geralmente utiliza como antígeno o vírus purificado. No caso do CiLV-C, fatores como baixo título viral na planta e instabilidade de suas partículas, dificultam a sua purificação, caracterização e detecção (ROSSETTI, 1980; MÜLLER et al., 2005). Alternativamente, quando não é possível obter a partícula viral purificada, utilizam-se como imunógenos a CP e outras proteínas virais expressas *in vitro* (ZERBINI et al., 2002). A utilização da CP para produção de antissoro com fins de diagnóstico costuma ser mais frequente do que outras proteínas virais não estruturais. Isto acontece, pois, geralmente, a proteína do capsídeo é expressa em maior quantidade na planta infectada, facilitando sua detecção.

Com a utilização de técnicas de biologia molecular, tem se tornado comum a clonagem do gene da proteína capsidial (*cp*) de vírus em vetores que permitem sua expressão em *Escherichia coli* (COLINET et al., 1994), uma vez que, para a grande maioria dos vírus de plantas, a proteína capsidial costuma ser a mais imunogênica. Desta forma, um antissoro produzido a partir da proteína livre apresentará as mesmas

propriedades daquele produzido a partir de partículas virais purificadas (BARBIERI et al., 2004). Um antissoro policlonal específico para o vírus do mosaico da melancia, (*Watermelon mosaic virus* - WMV), foi produzido a partir da proteína capsidial purificada, expressa *in vitro* em células de *E. coli*. O antissoro, testado por Western Blot, DAS-ELISA, imunodifusão e ELISA indireto, apresentou alta especificidade para a detecção do WMV em extratos foliares, não tendo sido observada nenhuma reação heteróloga interespecífica (BARBIERI et al., 2004).

Em relação ao CiLV-C, Locali-Fabris et al. (2008b) promoveram a expressão *in vitro* da proteína p29 (putativa proteína capsidial) em *E. coli*. Para tal, a proteína foi clonada em vetor de expressão pET28 e purificada por meio de cromatografia de afinidade em coluna de Ni<sup>+</sup>-NTA, a partir a fração solúvel de proteínas expressas. A partir da p29 purificada, produziu-se um antissoro policlonal específico contra esta proteína, possibilitando as investigações realizadas no presente trabalho. Este antissoro, até então não testado, foi utilizado como ferramenta para estudos de imunodetecção e imunolocalização *in situ* do CiLV-C, na tentativa de elucidar aspectos relacionados à interação vírus-vetor-planta.

Tais informações sobre a localização e funções das proteínas MP, helicase e CP poderão ainda fornecer subsídios para se compreender os mecanismos de resistência ao vírus nas plantas cítricas resistentes à leprose. A detecção destas proteínas no ácaro poderá constituir em mais uma evidência para indicar se ocorre ou não a replicação do vírus no seu interior e, conseqüentemente, definir o tipo de relação vírus/vetor.

## **2.5 Expressão *in vitro* de proteínas em *E.coli***

Existem diferentes sistemas utilizados para expressão de proteínas heterólogas, no entanto, o mais comum é o procarioto, que utiliza a bactéria *E. coli* como célula hospedeira. Este sistema é amplamente difundido devido à facilidade e baixo custo de cultivo, pela reprodutibilidade e abundância de proteína que produz. Além disso, modificações nos vetores e linhagens de *E. coli* são frequentemente realizadas no sentido de aumentar a eficiência e versatilidade do sistema original. Basicamente, o gene que codifica a proteína de interesse é clonado em um vetor de expressão



apropriado, o qual é utilizado para transformar células bacterianas, que são geralmente *E. coli* (NASCIMENTO et al., 2003).

O procedimento de clonagem de um fragmento de DNA para expressão é exatamente igual a qualquer clonagem, no entanto, deve se ter em mente que o propósito será obter a proteína correta. Para tanto, é necessário respeitar o sinal de tradução de genes procarióticos (sinal de Shine-Dalgarno), ou seja, o DNA deve ser clonado de maneira que sua fase de leitura correta fique em fase com o iniciador ATG. O vetor para expressão em *E. coli* deve apresentar características essenciais como origem de replicação, gene que confere resistência a antibióticos, promotor para transcrição, sinal de terminação da transcrição, sítio múltiplo de clonagem, e sequências para controle da tradução (Shine-Dalgarno, ATG e códon de terminação). Uma vez construído, o vetor de expressão contendo a sequência codificadora da proteína de interesse é introduzido em *E.coli* por transformação. De maneira ideal, quando se pensa em expressão heteróloga, espera-se que a proteína de interesse seja estável, não tóxica para a bactéria, solúvel, produzida em grande quantidade e possa ser facilmente purificada. Um procedimento muito utilizado é o de expressar a proteína de interesse em fusão com um “tag” específico que permita a fácil purificação da mesma através de cromatografia por afinidade em resinas às quais se encontram acopladas ligantes, aos quais o “tag” possa se ligar especificamente (NASCIMENTO et al., 2003).

No entanto, apesar das vantagens deste sistema, alguns problemas podem ocorrer durante a produção de proteínas heterólogas em *E. coli*. Algumas proteínas expressas são tóxicas para a célula hospedeira e, neste caso, uma alternativa à produção de proteína citoplasmática é a produção de proteínas que são secretadas. Para tanto basta clonar o DNA codificante em fusão com uma sequência codificante para um peptídeo sinal de procarioto. Este peptídeo é clivado pela peptidase sinal quando a proteína é secretada para o periplasma. Embora este método frequentemente traga problemas com o rendimento ou a clivagem do peptídeo sinal, há vantagens em alguns casos. Outros problemas que podem ocorrer são baixo nível de expressão da proteína devido a instabilidade do mRNA, término prematuro da mensagem, tradução ineficiente e baixa eficiência de purificação devido a interferência com sua fusão

inibindo a proteína de se ligar à resina de afinidade. A ocorrência de expressão de proteínas instáveis pode ser resolvida reduzindo-se a temperatura de crescimento ou mudando-se para uma linhagem de bactéria deficiente em uma ou mais proteases. Mesmo assim, é comum obter algum nível de fragmentação da proteína expressa. Existe ainda a possibilidade de ocorrência de proteínas insolúveis, ou seja, formação de agregados extremamente insolúveis que requerem procedimentos adicionais de desnaturação para solubilizá-las e de renaturação para mantê-las solúveis e funcionais. Isto nem sempre é um problema, pois a formação de corpos de inclusão pode proteger a proteína contra a degradação por proteases bacterianas e também facilitar a purificação, uma vez que são corpos densos precipitados à baixa velocidade de centrifugação, enquanto a maior parte das proteínas bacterianas permanece no sobrenadante. Mas, algumas vezes, não se consegue renaturação adequada da proteína purificada. Neste caso deve-se tentar atenuar a formação de corpos de inclusão alterando as condições de expressão, por exemplo, crescendo-se a cultura a temperatura mais baixa após a indução ou utilizando um promotor mais fraco (NASCIMENTO et al., 2003).

Com o advento de novos sistemas de expressão em células de eucariotos (levedura, insetos, mamífero), a expressão de proteínas clonadas tornou-se uma abordagem poderosíssima que vem revolucionando os estudos de estrutura, função, purificação e identificação de novas proteínas. Nestes outros sistemas, o recombinante a ser introduzido no hospedeiro alvo pode ser facilmente construído e amplificado em *E. coli*. Por isso os plasmídeos de levedura, mamífero, etc. são construídos por fusão de uma porção de um plasmídeo de *E. coli* (origem de replicação e resistência a um antibiótico) com sequências específicas para se obter expressão em célula eucariótica (NASCIMENTO et al., 2003).

Neste trabalho, a expressão *in vitro* das proteínas helicase e MP do CiLV-C será realizada em sistema bacteriano. Isto permitirá a produção de antissoros específicos contra estas proteínas os quais serão utilizados em estudos de imunodeteção do vírus em plantas hospedeiras e no ácaro vetor.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amplificação das ORFs *mp* e *helicase*

Oligonucleotídeos específicos foram desenhados (Tabela 1) a partir de sequências das ORFs que codificam, tentativamente, as proteínas de movimento (*mp*) e da replicase (domínio de *helicase*) do CiLV-C, obtidas pelo grupo do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (LOCALI-FABRIS et al., 2006). Na extremidade 5' de cada primer forward foram adicionadas quatro bases com sequência **CACC**, necessárias para a clonagem direcional dos amplicons no vetor pENTR Directional TOPO Cloning (Invitrogen).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos específicos utilizados para a amplificação das ORFs *helicase* e *mp*

ORF	Sequência (5' - 3')
Hel Forward	5' - <b>CACC</b> ATGGGTACAAGCTGTG - 3'
Hel Reverse	5' - CTAACCTACGTAGACCTAACGC - 3'
MP Forward	5' - <b>CACC</b> ATGGCTCTTTCTACCAATAACAA - 3'
MP Reverse	5' - TTATTCGCTTGTAGAAGTTGAGC - 3'

As sequências codificadoras das ORFs *mp* e *helicase* do CiLV-C foram amplificadas via reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa (RT-PCR) utilizando programa composto de 30 ciclos (desnaturação: 94°C por 30 segundos; anelamento: 56°C por 30 segundos; extensão: 72°C por 40 segundos) e visualizadas em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídio. Utilizou-se como molde cDNA obtido a partir da extração de ácidos nucléicos totais de folhas com lesões de leprose, de acordo com protocolo de Locali et al. (2003b).

Os fragmentos amplificados foram purificados através do kit GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences) e quantificados em gel de agarose

1% (p/v) utilizando 25, 50 e 100 ng de DNA  $\lambda$  (Promega) como padrão de peso molecular.

### 3.2 Clonagem das ORFs *mp* e *helicase*

A clonagem dos amplicons foi realizada com o auxílio do “Kit pENTR Directional TOPO<sup>®</sup> Cloning” (Invitrogen) para utilização do sistema Gateway seguindo-se as normas do fabricante. Para cada reação TOPO<sup>®</sup> cloning utilizou-se 2  $\mu$ L do amplicon purificado (20 ng), 1  $\mu$ L da solução salina, 2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O milli-Q estéril e 1  $\mu$ L do vetor TOPO<sup>®</sup>. A reação foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos, sendo posteriormente utilizados 2  $\mu$ L para a transformação em 25  $\mu$ L de células quimicamente competentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Os tubos contendo as células acrescidas do vetor recombinante foram incubados por 5 minutos no gelo e em seguida transferidos e mantidos por 50 segundos a 42°C. Após o choque térmico e nova incubação em gelo por 5 minutos, foram adicionados às células 250  $\mu$ L de meio de cultura SOC (Tryptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glicose 20 mM, pH 7,0) previamente mantido à temperatura ambiente, permanecendo sob agitação (200 rpm) a 37°C durante 2 horas. Após recuperação das células, realizou-se o plaqueamento em meio LB (Tryptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 10 g, ágar 1,5%, pH 7,5), acrescido de 50  $\mu$ g/mL de canamicina. Os clones recombinantes foram selecionados após 16 horas de incubação a 37°C.

Para confirmação da clonagem, realizou-se teste de PCR utilizando como molde 3  $\mu$ L das colônias recombinantes, previamente repicadas e desnaturadas em 100  $\mu$ L de água milli-Q por 95°C durante 12 minutos. O programa de amplificação e os primers específicos utilizados para as reações foram os mesmos da amplificação inicial das ORFs supracitadas (Tabela 1). Adicionalmente, a autenticidade dos clones recombinantes pENTR D-TOPO/*mp* e pENTR D-TOPO/*helicase* também foi confirmada via sequenciamento. Para tal, extraiu-se o DNA plasmidial das colônias transformadas através do método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989), os quais foram utilizados como molde nas reações.

O sequenciamento foi realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular – FFCLRP/USP, sob coordenação da Dra. Maria Helena Goldman, através do sequenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As amostras de DNA foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos em termociclador *GeneAmp 9700* e mantidas em gelo por 2 minutos antes de serem transferidas para o sequenciador. Os primers utilizados nas reações foram M13 Reverse e M13 Forward. As sequências geradas foram analisadas através da página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), pelo *link* de análise de dados Blast (Basic Local Alignment Search Tool), na opção Blast 2 Sequences, comparando as sequências dos clones com as das ORFs presentes no GenBank.

### 3.3 Subclonagem das ORFs *mp* e *helicase* no vetor pDEST<sup>TM</sup>17

A subclonagem das ORFs de interesse no vetor de expressão pDEST<sup>TM</sup>17 requer que o códon de iniciação ATG dos genes fiquem posicionados logo após ao promotor T7 de expressão em procaríotos. Desta forma, os genes foram inseridos direcionalmente, sendo a sequência de direcionamento CACC do primer forward inserida por recombinação no sítio *attR1* (Figura 2).

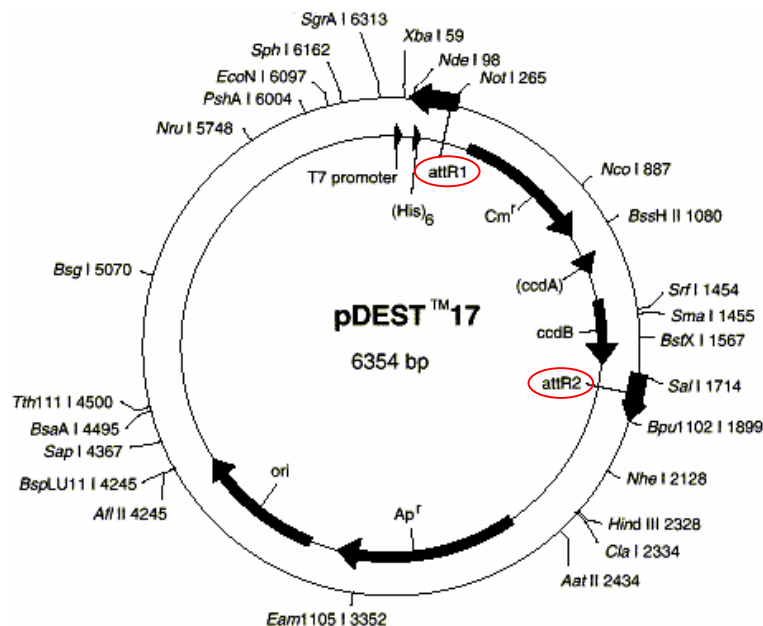


Figura 2 - Representação esquemática da construção do vetor *Gateway*, pDEST<sup>TM</sup>17, com indicação do sítio de clonagem delimitado por sítios de restrição únicos (*attR1* e *attR2*) e do promotor T7

É interessante ressaltar a presença de 6 histidinas alinhadas no vetor de expressão (6xHis), posicionadas na região N-terminal, cuja finalidade é de detecção e purificação da proteína recombinante. A localização da cauda de histidina é indicada para auxiliar a verificar se o gene inserido estará “in frame” com as 6xHis após a recombinação. Além disso, outras características da região de recombinação presentes no clone de expressão (p DEST<sup>TM</sup> 17 x pENTR D-TOPO/gene) também podem ser observadas (Figura 3).

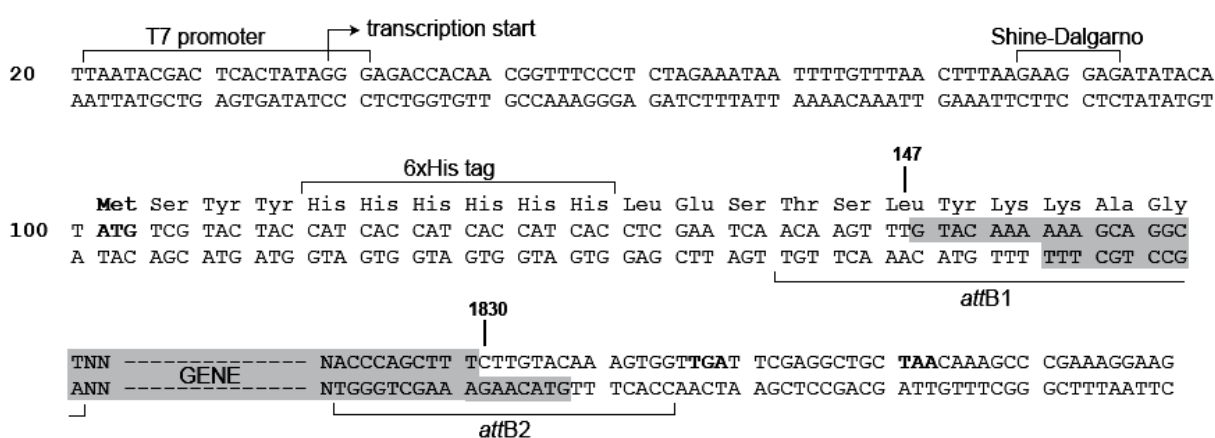


Figura 3 - Características da região de recombinação entre o vetor pDEST<sup>TM</sup>17 e o vetor pENTR D-TOPO. As regiões sombreadas correspondem às sequências de DNA transferidas por recombinação do vetor de entrada pENTR D-TOPO para o vetor de expressão pDEST<sup>TM</sup>17, enquanto as regiões sem sombreado são derivadas do vetor pDEST<sup>TM</sup>17. Os nucleotídeos sublinhados, flanqueando as regiões sombreadas, correspondem às bases 147 e 1830, respectivamente, da sequência do vetor pDEST<sup>TM</sup>17. Potenciais stop códons estão indicados em negrito

A transferência das ORFs *mp* e *helicase* do vetor de entrada pENTR D-TOPO para o vetor de expressão Gateway pDEST<sup>TM</sup>17 ocorreu através da reação de recombinação entre os dois plasmídeos. A clonagem em células competentes DH5α foi realizada utilizando-se o *kit* LR *clonase*<sup>TM</sup> *Enzyme Mix* (Invitrogen), conforme normas do fabricante. Para cada reação foram adicionados 300 ng do vetor de entrada (pENTR D-TOPO/*mp* ou pENTR D-TOPO/*helicase*), 300 ng do vetor de destino (pDEST<sup>TM</sup>17), 4 μL do tampão de reação (5X LR *Clonase*<sup>TM</sup>), q.s.p. 16 μL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e 4 μL de LR *Clonase*<sup>TM</sup> *enzyme mix*. A reação foi mantida a 25°C por 4 horas, à qual posteriormente foram adicionados 2 μL de proteinase K (2 μg/μL em Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, glicerol 50%, CaCl<sub>2</sub> 20 mM), seguida de incubação por 10

minutos a 37°C. Em seguida, 25 µL de células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas acrescentando-se 1 µL da reação LR *clonase*. As células foram mantidas em gelo por 30 minutos e, em seguida, submetidas a choque térmico de 42°C por 45 segundos, sendo imediatamente transferidas para gelo. Após 5 minutos, 450 µL de meio SOC foram acrescentados às células que foram incubadas a 37°C sob agitação (200 rpm) por 1 hora. Alíquotas de 20, 50 e 100 µL foram transferidas para placas contendo meio LB sólido acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e os clones recombinantes selecionados após incubação de 16 horas a 37°C. As clonagens foram confirmadas por PCR e sequenciamento assim como descrito anteriormente, porém, para cada reação de sequenciamento foi utilizado o primer T7 Forward associado com os Reverses específicos de cada ORF (T7 Forward e MP Reverse; T7 Forward e Helicase Reverse).

### 3.4 Expressão *in vitro* das proteínas MP e Helicase

Os plasmídios pDEST<sup>TM</sup>17/*mp* e pDEST<sup>TM</sup>17/*helicase* foram extraídos da *E. coli* DH5α pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989) e quantificados em gel de agarose 1%, tendo 50 e 100 ng de DNA λ (Promega) como padrão de peso molecular. Após o isolamento, foram utilizados para a transformação química de diferentes cepas de *E. coli* BL21, a fim de identificar aquela mais eficiente para expressão de cada proteína. As cepas testadas foram: BL21-AI<sup>TM</sup>, BL21-DE3, BL21-DE3-pLysS e BL21-DE3-RP.

#### 3.4.1 Transformação

A cepa BL21-AI<sup>TM</sup> foi transformada como descrito para DH5α, porém, com algumas modificações. Foram acrescentados 10 ng de DNA plasmidial (pDEST<sup>TM</sup>17/*mp* ou pDEST<sup>TM</sup>17/*helicase*) em 50 µL de células quimicamente competentes. Após o choque térmico acrescentou-se 450 µL de meio SOC, e o período de crescimento das células foi de 1 hora. As colônias recombinantes selecionadas foram isoladas para posterior utilização em experimento de expressão *in vitro*.

Para transformação das cepas BL21-DE3, BL21-DE3-pLysS e BL21-DE3-RP acrescentou-se 10 ng de DNA plasmidial (pDEST<sup>TM</sup>17/*mp* ou pDEST<sup>TM</sup>17/*helicase*) em

200  $\mu$ L de células quimicamente competentes. Estas foram mantidas no gelo por 30 minutos e, em seguida, submetidas a choque térmico de 42°C por 90 segundos, sendo imediatamente transferidas para o gelo. Após 5 minutos, 1mL de meio 2XTY (Tryptona 16 g, extrato de levedura 10 g, NaCl 5g, pH 7,4) foi adicionado às células que foram mantidas em banho maria de 37°C por 1 hora. Em seguida, foram centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado, deixando-se apenas uma alíquota de 100 $\mu$ L para ressuspender o pellet formado pela centrifugação. Este volume final foi plaqueado em meio 2XTY sólido acrescido de ampicilina (100  $\mu$ g/mL) para a cepa BL21-DE3 e ampicilina e cloranfenicol (100  $\mu$ g/mL) para as cepas BL21-DE3-pLysS e BL21-DE3-RP. Os clones recombinantes foram selecionados após 16 horas de incubação a 37°C.

#### 3.4.2 Expressão em *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup> (Tecnologia Gateway)

Os clones recombinantes da cepa *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup>/*mp* e BL21-AI<sup>TM</sup>/*helicase* foram analisados quanto ao nível de expressão das proteínas de interesse através de um experimento piloto inicial. Para isso, os mesmos foram cultivados em 5 mL (pré-inóculo) de meio LB acrescido de 100 mg/L de ampicilina, a 37°C sob agitação (200 rpm) até atingirem OD<sub>600nm</sub> entre 0,6 e 1,0. Estas pré-culturas foram utilizadas como inóculos de novas culturas, mantidas sob as mesmas condições, para atingirem OD<sub>600nm</sub> entre 0,05 e 0,1 (diluição 1:20, a partir do pré-inóculo). Esta diluição permite o retorno rápido das células para a fase *log* do crescimento bacteriano e, portanto, o alcance da densidade de células adequado. As células foram mantidas neste meio até a fase *mid-log* (OD<sub>600nm</sub> = 0,4), indicada para a expressão gênica. Cada cultura bacteriana foi dividida em duas partes de igual volume. Em uma das partes foi adicionada L-arabinose numa concentração final de 0,2%, necessária para indução das proteínas no sistema de expressão em *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup> (Gateway<sup>®</sup> - Invitrogen). Desta forma, foram obtidas duas culturas de cada colônia transformante: uma induzida e outra não-induzida pela L-arabinose. Após a adição de L-arabinose e 3 horas de cultivo a 37°C, alíquotas de 500  $\mu$ L foram coletadas e centrifugadas a 16.300xg por 1 minuto a 4°C. Os precipitados foram utilizados para análise de proteínas solúveis e insolúveis, e para isso, foram ressuspensos em 80  $\mu$ L de tampão da amostra 1X SDS-PAGE (Tris HCl



0,5 M, pH 6,8, glicerol 50%, DTT 100 mM, SDS 20%, azul de bromofenol 1%), antes de serem submetidos à fervura por 2 minutos. Os géis de poliacrilamida foram carregados com 7,5  $\mu$ L das amostras dos clones induzidos e 2,5  $\mu$ L dos clones não induzidos e submetidos à eletroforese a 70 V por 3,5 horas. Posteriormente foram corados com Comassie Blue R250 sob agitação por 3 horas, seguido de descoloração por mais 14 horas.

Os clones selecionados de BL21-AI<sup>TM</sup> com maior expressão foram cultivados separadamente em 5 mL de meio LB acrescido de 100 mg/L de ampicilina, a 37°C sob agitação (200 rpm) até atingir OD<sub>600nm</sub> entre 0,6 e 1,0. Essa cultura foi utilizada como pré-inóculo de novas culturas em 50 mL de meio LB contendo ampicilina, as quais foram mantidas sob as mesmas condições. Quando as novas culturas atingiram OD<sub>600nm</sub> = 0,4, acrescentou-se L-arabinose a uma concentração final de 0,2% para indução da expressão das proteínas. Após 3 horas, as culturas de 50mL foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 6.000xg por 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos contendo os pellets foram armazenados a -80°C para posterior extração da proteína.

### **3.4.3 Expressão em *E. coli* BL21-DE3, BL21-DE3-pLysS e BL21-DE3-RP**

Este experimento teve como objetivo a obtenção de um sistema de expressão das proteínas MP e helicase mais eficiente do que o previamente testado com a cepa BL21-AI<sup>TM</sup>. Para tal, clones recombinantes das cepas BL21-DE3, BL21-DE3-pLysS e BL21-DE3-RP foram analisados quanto ao nível de expressão através de um experimento piloto inicial.

Os mesmos foram cultivados em 3mL de meio 2XTY acrescido de 100 mg/L de ampicilina e/ou cloranfenicol, a temperatura de 37°C para todas as cepas e, adicionalmente, a 25°C para a BL21-DE3, sob agitação (200 rpm) até atingirem OD<sub>600nm</sub> = 0,6. Neste ponto, alíquotas de 100  $\mu$ L de cada cultura foram coletadas para servirem de controle negativo (colônias não induzidas). Em seguida, adicionou-se ao meio IPTG (0,2 mM) para indução da expressão da proteína de movimento, e após 3 horas de cultivo a 37°C, novas alíquotas de 100  $\mu$ L foram coletadas para análise da expressão (colônias induzidas). Antes de submeter as alíquotas à fervura por 10 minutos,

acrescentou-se 20  $\mu\text{L}$  de tampão da amostra 5X SDS-PAGE (Tris-HCl 260 mM, pH 6,8, glicerol 50%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,5%,  $\beta$ -mercaptoetanol 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) em cada uma das amostras. Os géis SDS-PAGE 19% foram carregados com 10  $\mu\text{L}$  dos clones induzidos e não induzidos, submetidos à eletroforese a 250 V, e, posteriormente, corados com Coomassie Blue R250 (Etanol 50%, ácido acético glacial 7%, coomassie Blue R250 0,4%) por 2 minutos sob fervura em microondas. Em seguida, procedeu-se a descoloração do gel em ácido acético 7% por aproximadamente 2 horas em estufa a 50°C.

O clone recombinante com maior expressão da MP resultante da cepa BL21-DE3-pLysS foi cultivado em 20 mL de meio 2XTY acrescido de 100 mg/L de ampicilina e cloranfenicol (pré-inóculo), a 37°C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Posteriormente, erlemeyers contendo 500 mL de meio 2XTY acrescido dos antibióticos foram inoculados com 5mL do pré-inóculo cada um, os quais foram mantidos sob agitação de 180 rpm a 37°C até atingirem  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$ . Neste momento, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do cultivo não induzido foi coletada e, em seguida, acrescentou-se IPTG a uma concentração final de 0,2 mM para indução da expressão protéica. Após 3 horas de cultivo, as células foram transferidas para tubos apropriados com capacidade de 500 mL, centrifugadas a 5.000 rpm por 12 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Os tubos contendo os pellets bacterianos foram armazenados a -80°C para posterior extração de proteínas.

### **3.5 Extração de proteínas**

#### **3.5.1 Proteína Helicase**

O precipitado derivado dos 50 mL da cultura bacteriana BL21-AI<sup>TM</sup>/helicase foi ressuspendido em 5 mL de Tampão de Lise ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; Tris 0,01 M, pH 8,0). Em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de PMSF (100 mM) e 50  $\mu\text{L}$  de lisozima (100 mg/mL). A solução foi incubada por 30 minutos no gelo e, após este período, sonicada (5 pulsos, 10 segundos/pulso e amplitude 100%). Em seguida, esta solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C para que houvesse precipitação das membranas rompidas. O sobrenadante, contendo a fração protéica solúvel, foi coletado e guardado

para análise via SDS-PAGE a fim de verificar a presença da proteína de interesse nesta fração. O pellet resultante da centrifugação, que consistia da fração insolúvel, foi ressuspendido em 5 mL de Tampão de Lise contendo uréia 8 M, homogeneizado com sonificador (5 pulsos, 10 segundos/pulso e amplitude 100%) e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado com micropipeta, evitando-se entrar em contato com o precipitado, e analisado por SDS-PAGE para verificar se a proteína helicase estaria presente nesta fração.

### **3.5.2 Proteína de Movimento**

Para dar início ao processo de extração de proteínas, precipitados derivados de dois frascos de 500 mL de cultura bacteriana BL21-pLysS/MP foram ressuspendidos em 8 mL de Tampão de Lise (Tris 50 mM, EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 14 mM, 25% sacarose, pH 8,5) cada um, totalizando um volume final de 16mL a partir de 1L de cultura induzida. Em seguida, todo o volume (16 mL) foi submetido à “French Press” para rompimento mecânico das células bacterianas e liberação de proteínas solúveis para o meio aquoso. Posteriormente, esta solução foi centrifugada a 15.000 rpm por 30 minutos a 4°C para precipitação das membranas rompidas. O sobrenadante, contendo a fração protéica solúvel, foi coletado e guardado para análise via SDS-PAGE. O pellet resultante da centrifugação, que consistia da fração insolúvel, foi ressuspendido em 20 mL de Tampão de Solubilização (Tris 50 mM, Uréia 6 M, EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 14 mM, pH 8,5), homogeneizado e incubado por 50 minutos em temperatura ambiente sob agitação lenta. Após incubação, a solução foi centrifugada a 15.000 rpm por 40 minutos a 4°C e 20 mL correspondente ao sobrenadante (fração insolúvel) cuidadosamente coletado, evitando-se entrar em contato com o precipitado. A análise de proteínas solúveis e insolúveis foi feita carregando-se um volume 10  $\mu$ L de cada fração protéica - volume resultante da mistura de 10  $\mu$ L da amostra (solúvel ou insolúvel) com 20  $\mu$ L de tampão da amostra 5X SDS-PAGE - em gel SDS PAGE 19%.

### 3.6 Espectrometria de Massa

Para verificar se o processo de expressão *in vitro* havia funcionado, as supostas proteínas helicase e MP foram sequenciadas. Para tal procedimento, foram necessárias várias etapas de preparação da amostra, a começar pela corrida de um gel SDS-PAGE 12% com 20 µL da fração insolúvel de cada proteína por cavidade.

#### 3.6.1 Digestão das proteínas

A região do gel SDS-PAGE contendo a proteína de interesse foi extraída com um bisturi, cortada em segmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>, transferida para tubos de 1,5 mL e armazenada a 4°C. A digestão da proteína em gel foi realizada conforme descrito abaixo:

Remoção do corante: Os segmentos de gel contendo a proteína foram lavados em água deionizada, descorados por três vezes na solução contendo 50% v/v de acetonitrila (ACN) e 25 mM de bicarbonato de amônio (AMBIC) por 30 minutos, e desidratados duas vezes em 100% ACN por 10 minutos. A acetonitrila foi removida e o resíduo remanescente do gel deixado para evaporar em temperatura ambiente.

Redução e alquilação: Os fragmentos foram reidratados e reduzidos em DTT (20 mM DTT / 50 mM AMBIC) a 60°C por 40 minutos e alquilados com iodoacetamida (55 mM IAA / 50 mM AMBIC) no escuro por 30 minutos. A iodoacetamida foi removida, os fragmentos lavados em 25 mM AMBIC e posteriormente desidratados em 100% de acetonitrila. A acetonitrila foi descartada e o resíduo remanescente no gel deixado evaporar em temperatura ambiente.

Digestão das proteínas: Os fragmentos foram reidratados com 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina em 25 mM de bicarbonato de amônio e mantidas a 37°C por 12 horas. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (50% v/v acetonitrila e 5% v/v ácido fórmico).

Extração dos peptídeos: Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com três lavagens de 15 minutos com solução de eluição (60% v/v metanol e 1% v/v ácido fórmico) a 45°C sob sonicação. O aparelho de sonicação usado foi o ULTRA-SOM (Thornton-INPEC Eletrônica LTDA) modelo G/T, tipo T7, com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos foi submetida à secagem em um

concentrador (Eppendorf) em temperatura ambiente, por 2-3 horas. Os peptídeos foram ressuspensos em 1% (v/v) de ácido fórmico e sequenciados por espectrometria de massas.

### 3.6.2 Sequenciamento das proteínas

As proteínas foram sequenciadas em espectrômetro de massas Q-TOF-Ultima API (ESI-MS/MS *quadrupole/aceleração orthogonal time-of-flight*) da Water-Micromass acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar, CapIC (Waters®). A separação dos peptídeos foi realizada usando-se uma pré-coluna C18 (Sentry™ Guard Column C18 Waters®) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry® C18 5 µm 0,32 x 150 mm Waters®). Os peptídeos foram eluídos através da variação do gradiente do tampão A (95% v/v H<sub>2</sub>O, 5% v/v acetonitrila e 0,1% v/v ácido fórmico) e do tampão B (95% v/v acetonitrila, 5% v/v H<sub>2</sub>O e 0,1% v/v ácido fórmico). Durante a corrida, o fluxo usado foi de 5 µL.min<sup>-1</sup> nos primeiros 15 min, 2 µL.min<sup>-1</sup> entre 15 min e 40 min e de 5 µL.min<sup>-1</sup> entre 40 min e 45 min. A variação de gradiente do tampão B foi de 10% (v/v) a 15% (v/v) em 5 min, de 15% (v/v) a 35% (v/v) em 20 min, de 35% (v/v) a 45% (v/v) em 5 min, 45% (v/v) a 80% (v/v) em 5 min, mantido por 5 min em 80% (v/v) e os últimos 5 minutos em 10% (v/v). A ionização das moléculas por *electrospray* foi realizada com uma voltagem fixa de 3.000 V, temperatura de 90°C sob 5 psi de nitrogênio. Os espectros foram adquiridos em modo MS/MS automaticamente com um limiar de 25 *counts*, dentro de uma amplitude de 50 a 2000 m/z. As aquisições foram realizadas simultaneamente com o peptídeo padrão GFP através do sistema Nanolock Spray da Micromass, para corrigir as variações de calibração que ocorrem ao longo do tempo.

Os espectros de massas das amostras foram processados pelo programa ProteinLynx V 2.1 e analisados pelo programa Mascot, sendo submetidos a identificação em dois bancos de dados: SWISS-PROT e NCBI, através do programa Blast .

### 3.7 Purificação das proteínas

#### 3.7.1 Helicase

Após confirmação da insolubilidade e do sequenciamento da proteína helicase, a fração insolúvel de proteínas foi submetida à purificação, sob condições desnaturantes, utilizando Kit ProBond™ Purification System (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante.

Para tal, uma coluna com capacidade para 10 mL foi carregada com 2 mL de resina ProBond (Invitrogen). Após 15 minutos de incubação, tempo necessário para sedimentação da resina, o sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma micropipeta e a resina lavada por inversão em 6 mL de água Milli-Q autoclavada. Após nova incubação, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se a resina por inversão em 6 mL de Desnaturing Binding Buffer (Tampão fosfato 20 mM, NaCl 500mM, Uréia 8M, pH 7,5). Esperaram-se mais 15 minutos para a sedimentação e, após este período, o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, a resina foi novamente equilibrada com Desnaturing Binding Buffer repetindo-se o passo anterior. Em seguida, foram adicionados 5mL do extrato protéico insolúvel, e a coluna submetida à agitação por 60 minutos em temperatura ambiente. Neste ponto, ocorre a “ligação” da proteína recombinante helicase contendo a cauda de histidina na resina carregada com níquel. Em seguida, a coluna foi incubada por 20 minutos e o sobrenadante coletado e reservado para análise via SDS-PAGE. No passo seguinte, a coluna foi lavada por duas vezes em 4 mL de Desnaturing Binding Buffer pH 7,5, uma vez em 4 mL de Desnaturing Binding Buffer pH 6,0 e uma vez em Desnaturing Binding Buffer pH 5,3. Todas as lavagens foram feitas por inversão durante 2 minutos, coletando-se após incubação os sobrenadantes para análise em SDS-PAGE.

O processo de eluição da proteína foi realizado lavando-se a coluna em 5 mL de Desnaturing Binding Buffer pH 4,0, os quais foram misturados por inversão durante 2 minutos. Após sedimentação da resina, a ponta inferior da coluna foi retirada e o eluato recolhido em cinco frações separadas de 1 mL para análise via SDS-PAGE. Ao final da purificação, 20 µL de cada eluato foram colocados em eppendorfs já contendo 20 µL de

tampão de amostra 1X SDS-PAGE para análise via gel SDS-PAGE. Correu-se um volume final de 15  $\mu$ L de cada eluato por cavidade a 70 V.

### 3.7.2 Proteína de Movimento

Após verificar a solubilidade da MP, a fração insolúvel de proteínas foi submetida a duas purificações por cromatografia de troca iônica sucessivas utilizando as colunas SQ e SP Sepharose (GE Healthcare). Em seguida, uma terceira purificação por cromatografia de afinidade foi realizada utilizando a coluna HisTrap<sup>TM</sup> HP. Esta etapa do trabalho foi realizada no laboratório de Estrutura e Função de proteínas do Instituto de Química da USP, coordenado pelo professor Shaker Chuck Farah, e com o auxílio do Msc. Maxuel de Oliveira Andrade.

A primeira etapa do processo foi passar a alíquota de 20 mL, referente à fração insolúvel de proteínas, em uma coluna de troca aniônica - SQ Sepharose - carregada com 40 mL de resina e acoplada em aparelho de cromatografia ÄKTA (GE Healthcare). Antes da aplicação da amostra, a coluna foi equilibrada com 3 volumes do Tampão A (Uréia 6 M, Tris 50 mM, EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 14 mM, pH 8,5) injetando-se em seguida todo volume da fração insolúvel com fluxo contínuo de 0,8 mL/min. O volume da amostra que passou através da coluna foi coletado em frações de 20 mL, denominados "flow through", uma vez que a proteína de interesse não seria capaz de ligar-se à sepharose. Em seguida, a coluna foi lavada com 5 volumes de Tampão A para que houvesse a retirada das proteínas que se ligaram à coluna. Após a lavagem, passou-se pela coluna Tampão B (Uréia 6 M; Tris 50 mM, EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 14mM, NaCl 400 mM, pH 8,5) coletando-se frações de 10 mL para garantir a recuperação da proteína MP, caso houvesse alguma ligação da mesma na coluna. Ao final do processo, todas as frações que apresentaram altos picos de absorbância no cromatograma foram analisadas via SDS-PAGE 19% para verificar a presença da MP. Carregou-se no gel 10  $\mu$ L de cada amostra (10  $\mu$ L de amostra + 20  $\mu$ L de tampão da amostra 1X SDS-PAGE).

Após a constatação de que a MP encontrava-se no "flow through" resultante da primeira purificação, e que esta fração ainda continha muitas proteínas indesejáveis, uma nova purificação foi realizada utilizando-se uma coluna de troca catiônica - SP

Sepharose – carregada com 40 mL de resina acoplada em aparelho de cromatografia ÄKTA. Antes da aplicação da amostra (flow through/SQ), a coluna foi equilibrada com 3 volumes do Tampão A, injetando-se em seguida a alíquota de 20 mL, correspondente ao flow through coletado da coluna SQ Sepharose, com fluxo contínuo de 0,8 mL/min. Todo volume da amostra que passou através da coluna (flow through/SP) foi coletado em frações de 10 mL. Em seguida a coluna foi lavada com 5 volumes de Tampão A, para que houvesse a retirada das proteínas que não se ligaram à resina, coletando-se posteriormente frações de 10 mL. Após a lavagem passou-se pela coluna Tampão B, responsável pela eluição de proteínas que se aderiram à resina, coletando-se frações de 10 mL para garantir a recuperação da MP, caso houvesse alguma ligação da mesma. Ao final da purificação, todas as frações com altos picos de absorbância foram analisadas via SDS-PAGE 19% da mesma forma como descrito na primeira purificação.

Constatando-se que a proteína de interesse estava presente em grande quantidade tanto no flow through/SP quanto nas frações eluídas da coluna SP sepharose, a fração mais concentrada e limpa foi selecionada para ser purificada em coluna de 5 mL HisTrap™ HP, acoplada no aparelho de cromatografia ÄKTA. Antes da aplicação da amostra, a coluna foi equilibrada com 3 volumes do Tampão A (Uréia 6 M; Tris 50 mM, Imidazol 50 mM, pH 8,5), injetando-se em seguida uma alíquota do flow through/SP de 10 mL com fluxo contínuo de 0,8 mL/min. Todo volume da amostra que passou através da coluna foi coletado em frações de 2 mL. Em seguida a coluna foi lavada com 5 volumes de Tampão A para que houvesse a retirada do restante de possíveis proteínas contaminantes, coletando-se frações de 5 mL. Após a lavagem, passou-se pela coluna Tampão B (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Imidazol 500 mM, pH 8,5) responsável pela eluição da proteína, coletando-se frações de 2 mL para garantir a recuperação da MP. Posteriormente, todas as frações que apresentaram altos picos de absorbância foram analisadas via SDS-PAGE 19% como descrito anteriormente.

Ao final da série de purificações, a MP encontrava-se presente em tampão B de eluição com alta concentração de uréia e imidazol, fazendo-se necessária a troca de tampões para as imunizações em coelhos. Realizou-se diálise lenta utilizando uma membrana com limite de retenção de 15 KDa, previamente lavada abundantemente com água destilada. Após a lavagem, uma das pontas foi vedada com o auxílio de um



prendedor e 2 mL da proteína pura, proveniente da eluição da coluna HisTrap™ HP, cuidadosamente adicionados em seu interior. Em seguida, todas as bolhas formadas com a pipetagem foram retiradas e a outra ponta da membrana vedada com outro prendedor, deixando uma pequena folga para que as trocas acontecessem sem que houvesse rompimento. A membrana foi então colocada no interior de um becker contendo 2 L de tampão (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 14 mM, pH 8,5) e mantida sob leve agitação em câmara fria a 4°C durante 8 horas. Após este período, o volume de 2,5 mL referente à MP pura foi recuperado do interior da membrana e uma alíquota de 10 µL misturada com 20 µL de tampão da amostra 1X SDS-PAGE para análise via SDS-PAGE. Desta mistura foram carregados no gel apenas 10 µL para verificar possível precipitação da proteína e fazer uma estimativa de sua concentração. Posteriormente a quantificação da proteína de movimento foi realizada medindo-se sua absorbância a  $\lambda = 280$  nm com o auxílio de espectrofotômetro.

### **3.8 Produção dos antissoros**

Devido à dificuldade na obtenção da MP pura e em quantidade suficiente para realização das imunizações, duas estratégias foram elaboradas para produção do antissoro com objetivo de serem desenvolvidas paralelamente.

O primeiro antissoro foi produzido no laboratório de Imunologia do Instituto de Biologia (I.B.) da UNICAMP, sob coordenação da professora Dra. Dagmar Ruth Stach - Machado e do Dr. Luís Antônio Peroni. Naquela ocasião, como ainda não havia sido possível a obtenção da MP totalmente pura, utilizou-se como antígeno a proteína purificada pelo método ProBond™ Purification System (Invitrogen), assim como realizado para proteína helicase descrito anteriormente. Como mesmo após várias tentativas de purificação ainda havia a presença de proteínas contaminantes, optamos por utilizar como antígeno somente a banda referente à MP recortada do SDS-PAGE. O esquema de imunização realizado está descrito a seguir na Tabela 2.

Tabela 2 - Esquema de imunização (I.B./Unicamp)

<b>Dose</b>	<b>Quantidade de antígeno MP por dose (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Tempo (dias após a 1ª imunização)</b>
1 <sup>a</sup>	100	0
2 <sup>a</sup>	160	7
3 <sup>a</sup>	230	21
4 <sup>a</sup>	340	28
<b>Coleta do Sangue</b>	-	36

O segundo antissoro foi produzido no laboratório de Estrutura e Função de proteínas do Instituto de Química (I.Q.) da USP, coordenado pelo professor Shaker Chuck Farah, e com o auxílio do Msc. Maxuel de Oliveira Andrade. A nova estratégia utilizou como antígeno a MP com alto grau de pureza e concentração, resultante da purificação realizada por meio de colunas de troca iônica e de afinidade como descrito no item 3.7.2 O novo antissoro foi produzido conforme programa de imunização descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Esquema de imunização (I.Q./USP)

<b>Dose</b>	<b>Quantidade de antígeno MP por dose (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Tempo (dias após a 1ª imunização)</b>
1 <sup>a</sup>	200	0
2 <sup>a</sup>	200	7
3 <sup>a</sup>	200	14
4 <sup>a</sup>	200	21
<b>Coleta do sangue</b>	-	28

Para os dois programas de imunização realizados, a primeira dose foi realizada na proporção 1:1(v/v) de antígeno MP para adjuvante completo de Freund. As imunizações subsequentes foram realizadas como descrito acima, porém utilizando adjuvante incompleto de Freund. Todas as imunizações foram realizadas através de

injeções subcutâneas no dorso de coelhos da raça Nova Zelândia com 30 dias de idade, após a coleta de sangue para obtenção do soro normal (pré-imune).

Desta forma, ao final dos programas de imunização, foram gerados dois antissoros distintos: um produzido a partir da MP recortada de gel SDS-PAGE purificada pelo ProBond™ Purification System (Invitrogen), e outro produzido a partir da proteína pura obtida por cromatografia de troca iônica e afinidade.

O antissoro contra a proteína p29, putativa proteína capsidial do CiLV-C, foi produzido e gentilmente cedido pela Dra. Eliane Locali (LOCALI-FABRIS et al., 2008b), pesquisadora do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”-IAC e colaboradora deste projeto. É importante ressaltar que, neste caso, foi possível a produção do antissoro utilizando a p29 isolada da fração solúvel de proteínas. Isto indica que a proteína não sofreu alteração conformacional em decorrência do tratamento com solvente orgânico, e que conseqüentemente, existe uma maior probabilidade de detecção da p29 presente em plantas infectadas pelo CiLV-C por este antissoro do que a detecção da MP com o antissoro contra MP, que utilizou como antígeno a proteína desnaturada.

### **3.9 Testes Sorológicos dos anticorpos**

Para verificar se os anticorpos produzidos contra as proteínas MP e helicase iriam reconhecer as proteínas presentes em tecido infectado pelo CiLV-C, procedeu-se diferentes testes sorológicos. O primeiro a ser realizado foi o ELISA e, de acordo com o resultado obtido, o antissoro continuaria sendo testado por Western Blot, Tissue Blot e Imunolocalização *in situ*. Adicionalmente, realizou-se também a validação do antissoro contra a p29 (LOCALI-FABRIS et al., 2008b) que, na ocasião, encontrava-se pronto para ser testado.

#### **3.9.1 PTA-ELISA (“Plate Trapped Antigen - Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)**

O ELISA foi realizado a partir de folhas de plantas cítricas sadias e infectadas pelo CiLV-C. Para o teste do antissoro contra a proteína p29 outras plantas infectadas por vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBs) do tipo citoplasmático também foram analisadas.

As amostras foram maceradas individualmente em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido e na presença de tampão carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,59g,  $\text{NaHCO}_3$  2,93 g;  $\text{NaN}_3$  0,2g,  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1L; pH 9,6) diluído 1:50 (p/v). Em seguida, duas repetições de 100 $\mu\text{L}$  de cada amostra foram adicionadas à placa de ELISA que, posteriormente, foi incubada por 40 minutos a 37°C. Após incubação, a placa foi lavada por 3 vezes com PBS-Tween ( $\text{NaCl}$  8,0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,15g,  $\text{KCl}$  0,2g,  $\text{NaN}_3$  0,2g, Tween 20 0,05%,  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1L, pH 7,4) e 100  $\mu\text{L}$  do antissoro primário diluído em PBS-TPB (PBS-Tween, PVP 2%, BSA 0,2%), seguindo-se de incubação por 2 horas a 37°C. É importante ressaltar que foram testadas diferentes diluições dos antissoros produzidos, para seleção daquela mais adequada na realização do teste. Posteriormente, a placa foi novamente lavada e 100  $\mu\text{L}$  do antissoro secundário IgG (Sigma) diluído 1:40.000 em PBS-TPB adicionados. Em seguida, procedeu-se nova incubação por 2 horas a 37°C, última lavagem da placa e a adição de 100  $\mu\text{L}$  de p-fosfato de nitrofenil (0,6 mg/mL) diluídos em tampão dietanolamina (Dietanolamina 97mL,  $\text{NaN}_3$  0,2g,  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1L, pH 9,8). A reação foi incubada no escuro em temperatura ambiente, medindo-se a absorbância a 405 nm na leitora de ELISA a cada 30 minutos conforme mudança de cor observada visualmente. Na avaliação do antissoro contra MP, uma duplicata de cada amostra testada foi submetida à fervura por 5 minutos, para que houvesse desnaturação das proteínas presentes nas plantas. Esta investigação teve como objetivo a tentativa de detecção da MP desnaturada nas plantas doentes, uma vez que a proteína utilizada para produção do antissoro também havia sido desnaturada no processo de extração.

### 3.9.2 Western Blot

Tecidos vegetais de plantas cítricas sadias e infectadas pelo CiLV-C foram macerados individualmente em tampão Tris 0,5 M pH 6,8 com o auxílio de almofariz e nitrogênio líquido. Em seguida, o macerado foi transferido para eppendorfs, os quais foram centrifugados por 30 segundos a 1000 rpm. Uma alíquota do sobrenadante foi recolhida e misturada em igual proporção com tampão de dissociação (Tris 0,5 M pH 6,8, SDS 3,8%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,1% e glicerol 19%) sendo em seguida submetida à fervura por 5 minutos. As amostras, 10  $\mu\text{L}$  de cada, foram

então carregadas em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS, que foi submetido a corrida por 20 minutos a 60 V aumentando-se em seguida a velocidade de corrida para 100 V até que as amostras alcançassem o final do gel. A transferência das amostras do gel para a membrana de nitrocelulose “Immobilon-NC transfer membranes” (Millipore) foi realizada pelo aparelho “Mini trans-blot cell” (BioRad) por 80 minutos a 45 V. Após a transferência, a membrana foi submetida à lavagem com TBS (Tris 0,02 M, NaCl 0,15M, pH 7,4) por 5 minutos, e em seguida, à incubação com TBS contendo 1% de BSA por 60 minutos em temperatura ambiente sob agitação constante. Após incubação, adicionou-se à solução o antissoro policlonal específico contra as proteínas MP ou p29, diluídos 1:1.000 ou 1:500 em TBS, seguindo-se de incubação à temperatura ambiente durante a noite. O antissoro contra MP foi avaliado também na diluição 1:100. No dia seguinte, a membrana foi lavada durante 5 minutos por 3 vezes consecutivas com TBS contendo 0,1% de Tween 20. Posteriormente, procedeu-se à incubação com antissoro secundário conjugado à fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:32.000 em TBS contendo 1% de BSA. Após incubação, a membrana foi novamente lavada como descrito anteriormente e incubada em 10 mL de solução contendo 1 mL de tampão de substrato 10X (Tris 12,11 g, NaCl 5,84 g, MgCl<sub>2</sub> 1,02 g, H<sub>2</sub>O q.s.p. 80mL, pH 9,5), 9mL de água destilada deionizada, 25 µL de BCIP e 50 µL de NBT, na ausência de luz até o aparecimento da reação.

### **3.9.3 Tissue Blotting**

As amostras foram preparadas a partir de folhas apresentando lesões lepróticas proveniente de diferentes localidades (Tabela 4). As folhas frescas foram inicialmente higienizadas com álcool 70% e, em seguida, enroladas e cortadas uma por uma na região das lesões com auxílio de uma lâmina. A face cortada das folhas foi levemente pressionada contra uma membrana de nitrocelulose “Immobilon-NC transfer membranes” (Millipore) que, posteriormente, foi seca em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 20 mL de solução PBS (Tampão fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, KCl 3mM, NaN<sub>3</sub> 3 mM, pH 7,4) contendo 1% de BSA por 30 minutos em temperatura ambiente sob leve agitação. Após o período de bloqueio, acrescentou-se à solução o antissoro contra a proteína p29 na diluição 1:1.000 e

procedeu-se nova incubação de 95 minutos. Em seguida, a membrana foi lavada por três vezes consecutivas em PBS contendo 0,05% de Tween durante 5 minutos. Posteriormente, procedeu-se incubação com antissoro secundário conjugado à fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:32.000 em PBS contendo 1% de BSA por 95 minutos. Após incubação, a membrana foi novamente lavada como descrito anteriormente e incubada em 10 mL de solução contendo 1mL de tampão de substrato 10X (Tris 12,11 g, NaCl 5,84 g, MgCl<sub>2</sub> 1,02 g, H<sub>2</sub>O q.s.p. 80mL, pH 9,5), 9mL de água destilada deionizada, 25 µL de BCIP e 50 µL de NBT, na ausência de luz até o aparecimento da reação.

Tabela 4 - Amostras utilizadas nas impressões tissulares

<b>Planta</b>	<b>Origem</b>
Laranja Pêra	Centro APTA Citros, Cordeirópolis, SP, Brasil
Laranja não identificada	Destilaria, ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil
Tangerina Cravo	Destilaria, ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil
Laranja não identificada	Tabasco, México

### 3.9.4 Microscopia eletrônica de transmissão do ácaro

Adultos de *B. phoenicis* provenientes de colônias virulíferas e avirulíferas tiveram o final da região do abdômen cortada com o auxílio de uma lâmina e de microscópio estereoscópico para que houvesse boa fixação, conservação dos tecidos e infiltração. Os ácaros foram fixados em solução de glutaraldeído 3%, tampão cacodilato 0,1 M, sacarose 1,8%, pH 7,2 (R.DALLAI, *comunicação pessoal*) durante 24 h e pós-fixados em OsO<sub>4</sub> 1% no mesmo tampão por 2 horas. Em seguida foram desidratados em acetona e emblocados em resina de baixa viscosidade Spurr. O material emblocado foi seccionado em cortes de 70 nm em ultramicrotomo Leica Ultract U6 equipado com navalha de diamante. As secções foram montadas em telinhas de cobre de 300 mesh, contrastadas com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo e examinadas em um MET Zeiss EM 900.

### 3.9.5 Imunolocalização

A localização *in situ* da proteína p29 foi investigada de acordo com o procedimento descrito por Maunsbach & Afzelius (1999), utilizando-se como amostras

folhas de laranja infectadas pelo CiLV-C provenientes de várias regiões e de outras plantas infectadas por vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBs) do tipo citoplasmático citadas a seguir:

- *Solanum violaefolium* - *Solanum violaefolium* ringspot virus (SvRSV) (FERREIRA et al., 2007);
- *Hibiscus rosa-sinensis* - *Hibiscus* green spsot virus (HibGSV) (KITAJIMA et al., 1999a);
- *Ligustrum lucidum* - *Ligustrum* ringspot virus (LigRSV) (VERGANI, 1942; RODRIGUES et al., 1995b);
- *Passiflora edulis* f. - Passion fruit green spot virus (PFGSV) (KITAJIMA et al., 1997);
- *Schefflera actinophylla* - *Schefflera* ringspot virus (SchefRSV) (KITAJIMA et al., 1999b);
- *Brunfelsia uniflora* - *Brunfelsia* ringspot virus (BrRSV) (NOGUEIRA et al., 2001).

Pequenos fragmentos (1 mm x 3 mm) de lesões recém formadas nas folhas foram fixados na solução Karnovsky modificada (Paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5%, tampão cacodilato 0,05 M, sacarose 1,8%, pH 7,2) (R.DALLAI, *comunicação pessoal*), desidratados em gradiente de etanol e emblocados na resina LR White (própria para imunomarcção devido a sua maior porosidade).

Com intuito de avaliar melhor a especificidade do antissoro contra a p29, algumas amostras infectadas pelo CiLV-C da coleção pessoal do Dr. Elliot W. Kitajima (Tabela 5), guardadas em resina SPURR e provenientes de diversas localidades foram submetidas à imunomarcção como descrito a seguir, porém, antes da pré-incubação para bloqueio, as secções foram submetidas ao tratamento com solução de periodato de sódio 0,56 M por 15 minutos para que houvesse exposição dos epitopos (VANDENBOSCH, 1990). Além das plantas, ácaros virulíferos para CiLV-C provenientes da Allellyx Genomics e avirulíferos do Centro APTA Citros Sylvio Moreira também foram utilizados como amostras, porém, os mesmos foram fixados somente em glutaraldeído e, após desidratação com etanol, embebidos em resina LR White.

Previamente à fixação, os ácaros tiveram a parte posterior do histerosoma cortada como descrito no item 3.9.4.

Tabela 5 - Amostras provenientes de diferentes localidades utilizadas na imunomarcção

Planta	Origem	Resina
Laranja Pêra	Centro APTA Citros, Cordeirópolis, Brasil	SPURR/LR White
Laranja não identificada	Destilaria, ESALQ, Piracicaba, Brasil	SPURR/LR White
Tangerina Cravo	Destilaria, ESALQ, Piracicaba, Brasil	SPURR/LR White
Laranja não identificada	Tabasco, México	SPURR/LR White
Laranja	Rio Branco, Acre, Brasil	SPURR
Laranja Valência	Maracay, Venezuela	SPURR
Laranja Valência	Santa Cruz, Bolívia	SPURR
Laranja	Bahia, Brasil	SPURR
Laranja	Goiás, Brasil	SPURR
Laranja Valência	Potrerrillos, Panamá	SPURR
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Mercana	Amsterdam, Holanda (infecção experimental)	SPURR
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Una	Piracicaba, Brasil (infecção experimental)	SPURR
Hibiscus	Jaboticabal, Brasil (infecção experimental)	SPURR
Swinglea	Gamal, Colômbia	SPURR
<i>Solanum violaefolium</i>	(Infecção experimental)	SPURR

Secções com 70 nm de espessura foram obtidas em ultramicrotomo Leica EM U6 equipado com navalha de diamante e montadas em telinhas de níquel cobertas com



película de Formvar. Para imunolocalização seguiu-se uma pré-incubação das secções por 30 minutos em solução de bloqueio [(PBS 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, BSA 1%, azida sódica 0,02%) acrescida de glicina 0,05M) flutuando as telinhas sobre uma gota (20-30  $\mu$ L) da solução mantida em uma superfície de Parafilm, com o lado da secção em contato com o líquido. Em seguida as telinhas foram removidas da solução de bloqueio com auxílio de uma pinça, incubadas por 5 horas sobre gotas do antissoro policlonal contra proteína p29 do CiLV-C (LOCALI-FABRIS et al, 2008b) diluído 1:1.000 em solução para diluir o anticorpo (solução de bloqueio sem glicina) e mantidas em câmara úmida à temperatura ambiente.

Terminada a incubação, as telinhas foram lavadas por 4 vezes em gotas de solução de bloqueio e, posteriormente, tratadas com proteína A conjugada a ouro coloidal de 10 nm (Sigma) diluído 1:50 em solução de bloqueio acrescida de PVP 1% e gelatina de peixe 2% por 1 hora. Em seguida, as telinhas foram lavadas por 4 vezes com solução de bloqueio sem glicina e depois por 3 vezes com água destilada. Após as lavagens, as partículas de ouro foram amplificadas com prata para aumentar o sinal, utilizando o Kit R-Gent SE-EM (Aurion) de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, as telinhas foram incubadas por 5 minutos em solução de glutaraldeído 1% para que através da formação de pontes de hidrogênio houvesse a consolidação da união entre antígeno e anticorpo, sendo posteriormente lavadas com água destilada. Após secarem ao ar, as secções foram contrastadas em acetato de uranila 3% por 10 minutos e citrato de chumbo por mais 10 minutos, sendo em seguida examinadas em MET Zeiss EM 900. Como controles negativos foram examinadas secções de folhas de laranja Pêra sadias e ácaros avirulíferos provenientes do Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" e folha de laranja Valência infectada com CiLV-N de Monte Alegre (São Paulo).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Amplificação das ORFs *helicase* e *mp*

Os fragmentos referentes às ORFs *helicase* e *mp* foram amplificados com sucesso via RT-PCR, apresentando tamanhos esperados de aproximadamente 830 pares de bases (pb) para a *helicase* e 890 pb para a *mp* (Figura 4). Posteriormente, os produtos da amplificação foram purificados (Figura 5) para serem utilizados nas subsequentes reações de clonagem.

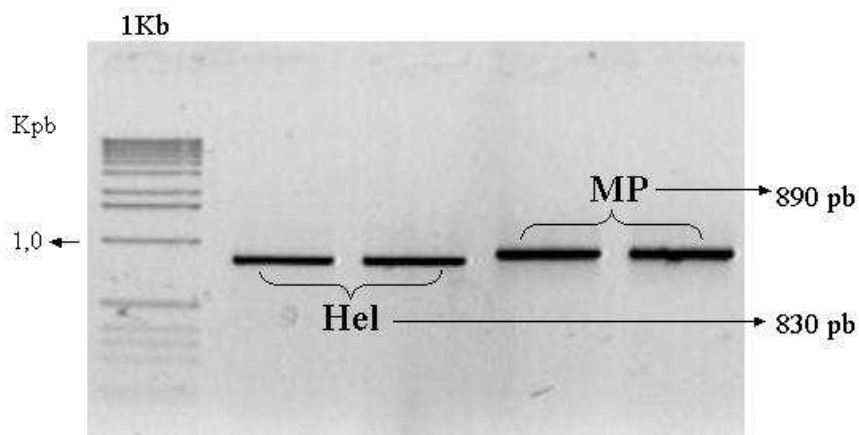


Figura 4 - Padrão eletroforético em gel de agarose 1% do produto da amplificação das ORFs *helicase* e *mp*. **1Kbp plus DNA ladder**, Marcador Molecular; **Hel**, Helicase; **MP**, Proteína de Movimento

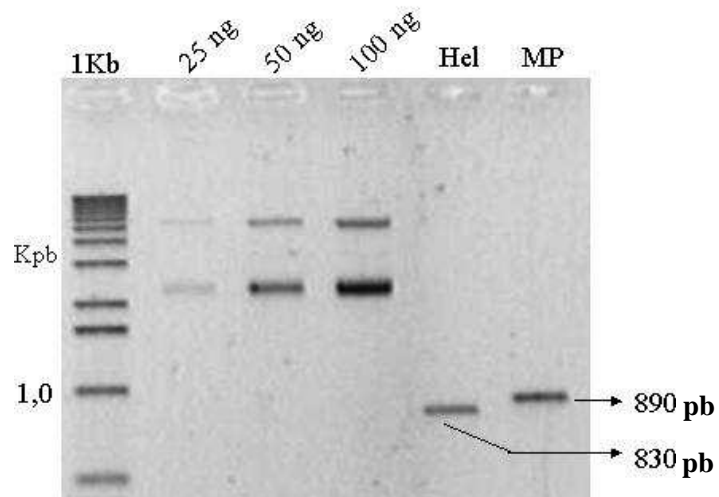


Figura 5 - Padrão eletroforético em gel de agarose 1% dos fragmentos purificados das ORFs *helicase* e *mp*. **1Kbp plus DNA ladder**, Marcador Molecular; **25 ng, 50 ng e 100 ng**; **Hel**, Helicase; **MP**, Proteína de Movimento

#### 4.2 Clonagem das ORFs *helicase* e *mp*

A estratégia utilizada foi a tecnologia “Gateway” (Invitrogen), que consiste em um método de clonagem baseado em propriedades de recombinação sítio-específicas do bacteriófago lambda, promovendo uma rápida e eficiente via de transferência de sequências de DNA em múltiplos sistemas de vetores para análise funcional e expressão de proteínas.

Utilizando-se o vetor de entrada pENTR Directional TOPO, vários clones foram obtidos para as duas ORFs, no entanto, apesar de ter sido usada a mesma proporção inserto:vetor em ambas as reações, a eficiência de clonagem da ORF *mp* foi mais baixa do que a da *helicase*. A clonagem foi confirmada por PCR, onde os fragmentos amplificados apresentaram tamanhos compatíveis de 830 pb (Figura 6) para *helicase* e 890 pb para *mp* (Figura 7).

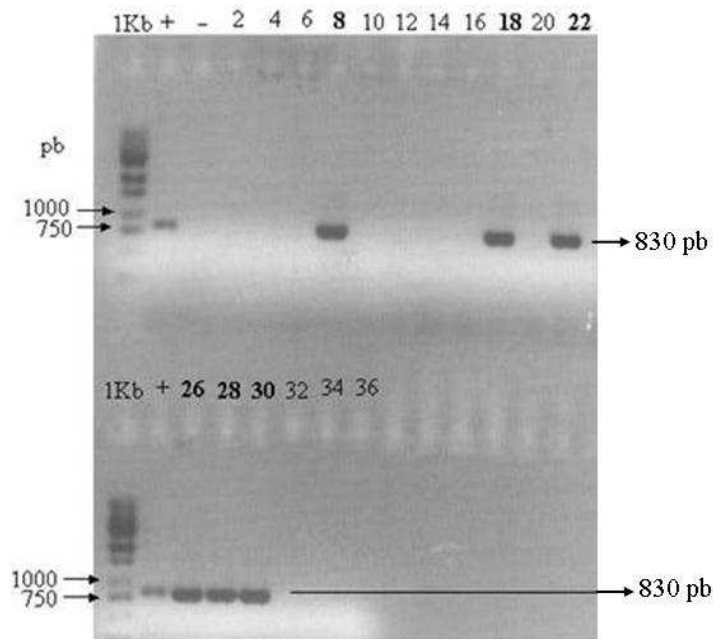


Figura 6 - Padrão eletroforético em gel de agarose 1% dos plasmídeos recombinantes pENTR-TOPO/*helicase* identificados por PCR. **1Kbp plus DNA ladder**, Marcador Molecular; **+**, cDNA de laranja Pêra infectada pelo CiLV-C; **-**, cDNA de laranja Pêra sadia; **2 a 6, 10 a 16, 20 e 32 a 36**, plasmídeos vazios; **8, 18, 22 e 26 a 30**, plasmídeos contendo o inserto da *helicase*

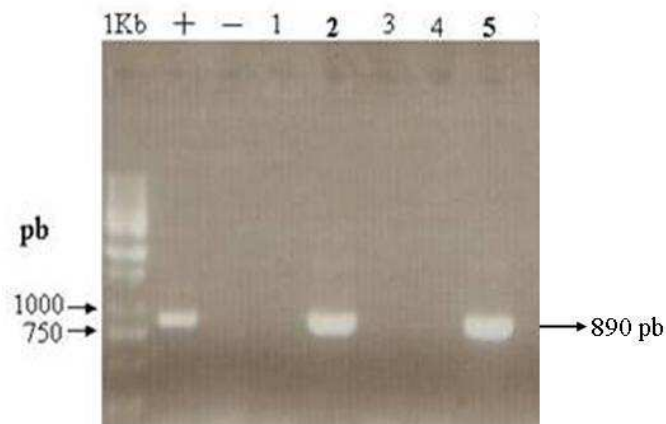


Figura 7 - Padrão eletroforético em gel de agarose 1% dos plasmídeos recombinantes pENTR-TOPO/*mp* identificados por PCR. **1Kbp DNA ladder**, Marcador Molecular; + ; cDNA de laranja Pêra infectada pelo CiLV-C; - , cDNA de laranja Pêra sadia; 1, 3 e 4, plasmídeos vazios; 2 e 5, plasmídeos contendo o inserto da *mp*

Além da PCR, a presença dos insertos nos vetores de entrada foi confirmada também por sequenciamento. O resultado mostrou que ambos os fragmentos foram inseridos na orientação correta e sem mutação de nucleotídeos, características necessárias para o sucesso da clonagem seguinte. Além disso, a similaridade das sequências geradas foi superior a 96%, quando comparadas às sequências do genoma do CiLV-C presentes no GeneBank (gb\_DQ352194 para o RNA 1 e gb\_DQ352194 para o RNA 2) (Figuras 8 e 9). Também foi possível identificar a sequência de direcionamento CACC adicionada antes do códon de iniciação ATG, assim como os códons de terminação das ORFs *helicase* (Figura 8) e *mp* (Figura 9).

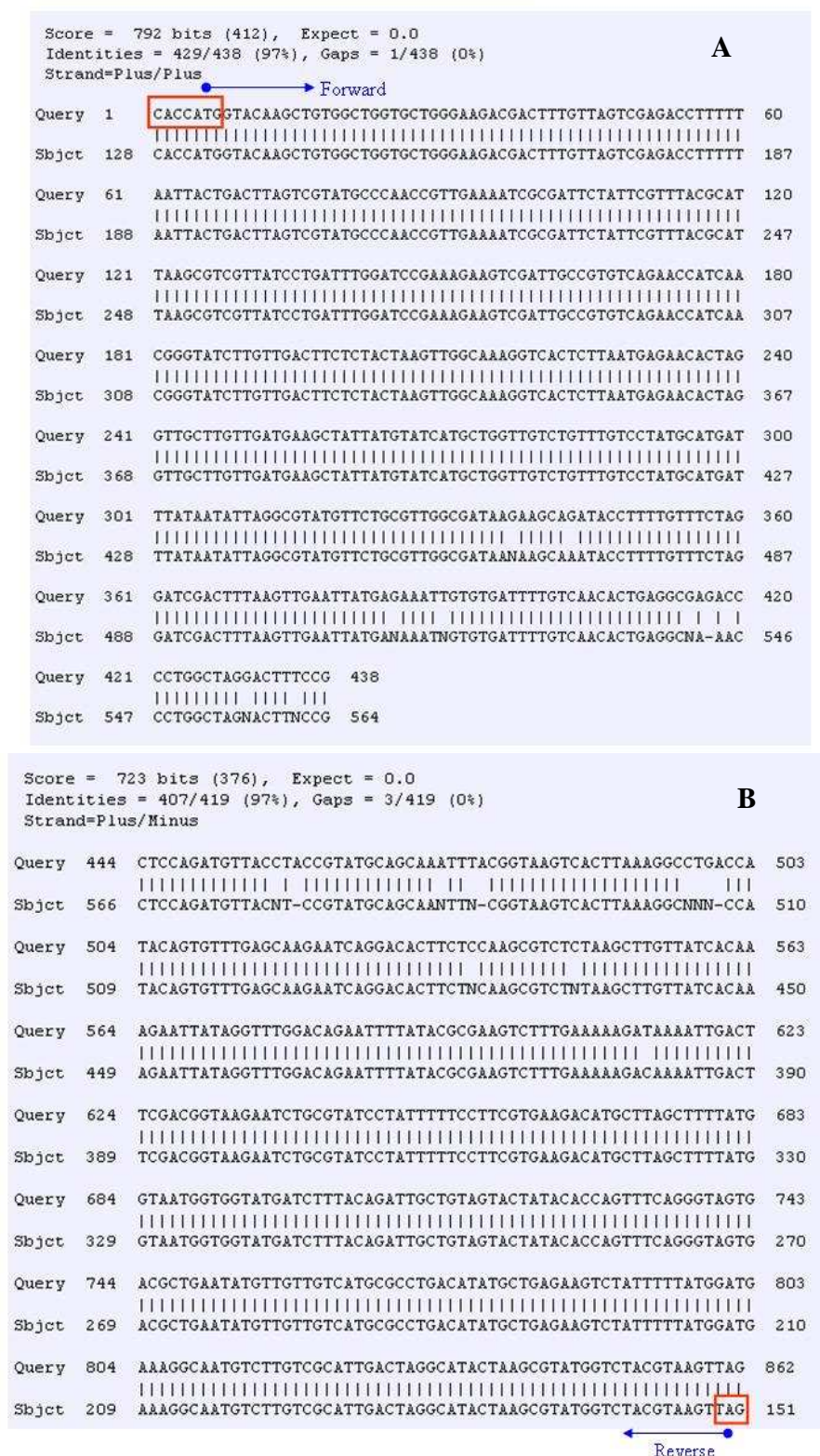


Figura 8 - Análise das seqüências dos clones pENTR D-TOPO/*helicase* pelo programa Blast 2 Sequences. **A**, Alinhamento da seqüência gerada Forward com a seqüência presente no GenBank (DQ352194); **B**, Alinhamento da seqüência gerada Reverse com a seqüência presente no GenBank

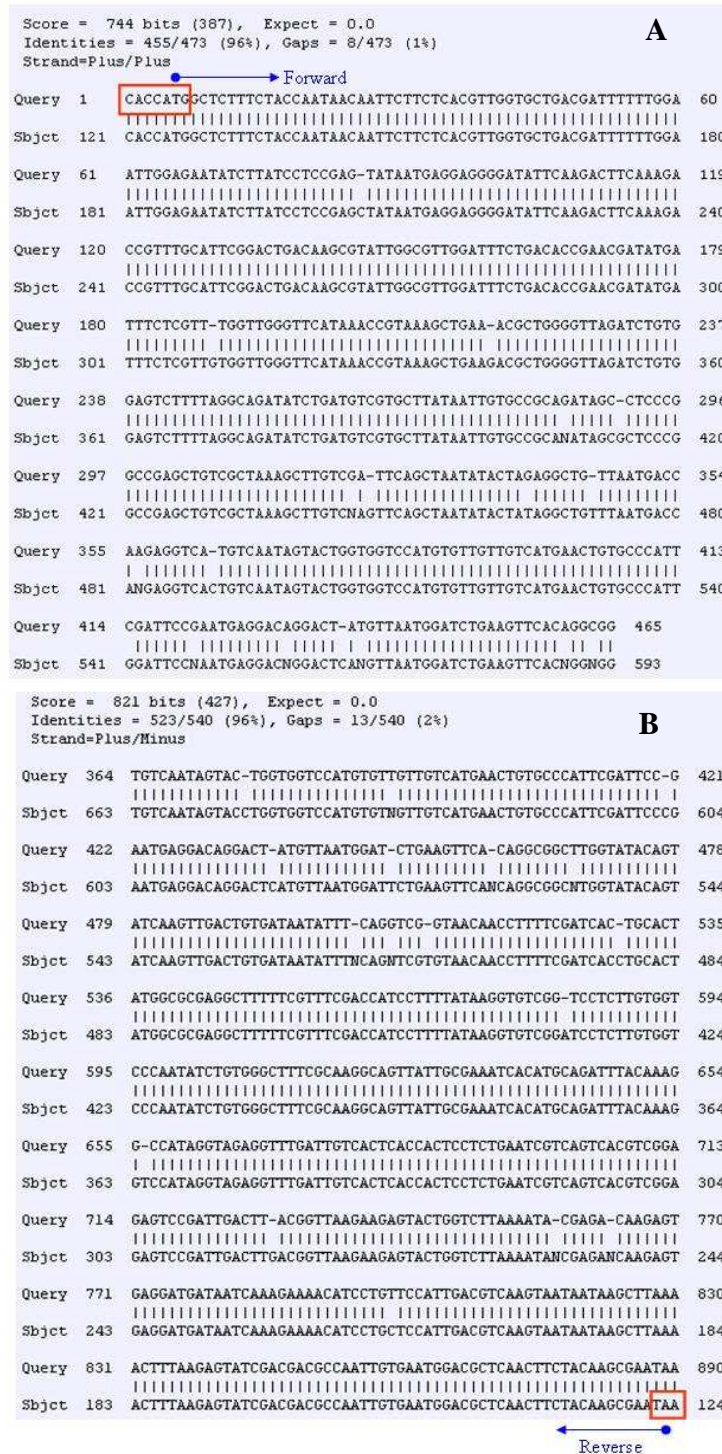


Figura 9 - Análise das seqüências dos clones pENTR D-TOPO/*mp* pelo programa Blast 2 Sequences. **A**, Alinhamento da seqüência gerada Forward com a seqüência presente no GenBank (DQ352195); **B**, Alinhamento da seqüência gerada Reverse com a seqüência presente no GenBank

A transferência das ORFs *helicase* e *mp* do vetor de entrada pENTR D-TOPO para o vetor de expressão pDEST<sup>TM</sup>17 ocorreu através da reação de recombinação entre os dois plasmídeos gerando dois clones da *mp* e nove clones da *helicase*. A clonagem no vetor de expressão de ambos os fragmentos foi confirmada primeiramente verificando-se a sensibilidade das colônias transformantes em placas de Petri contendo meio LB com o agente seletivo cloranfenicol. A ausência de crescimento bacteriano consistiu na primeira constatação de que a clonagem havia funcionado, indicando a interrupção do gene de resistência ao antibiótico pela inserção dos fragmentos.

Posteriormente, realizou-se PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada ORF, obtendo-se o tamanho esperado de aproximadamente 830 pb e 890 pb, respectivamente, para *helicase* (Figura 10) e *mp* (Figura 11).

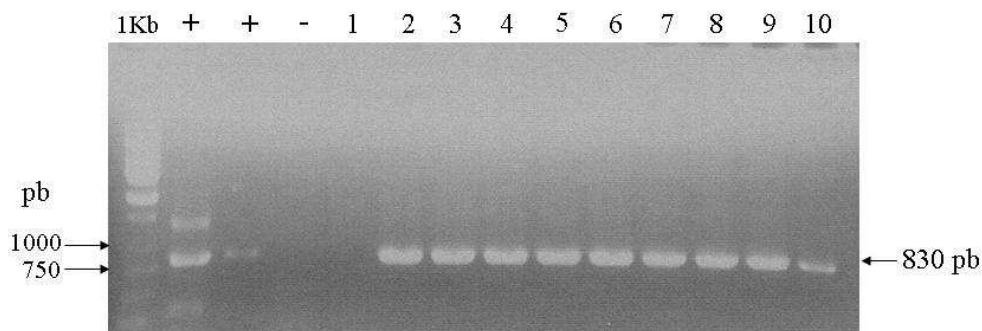


Figura 10 - Padrão eletroforético em gel de agarose 1% dos plasmídeos recombinantes pDEST/*helicase* identificados por PCR. **1Kb plus DNA ladder**, Marcador Molecular; +, cDNA laranja Pêra infectada pelo CiLV-C; -, cDNA de laranja Pêra sadia; 1, plasmídeo vazio; 2 a 10, plasmídeos contendo o inserto da *helicase*

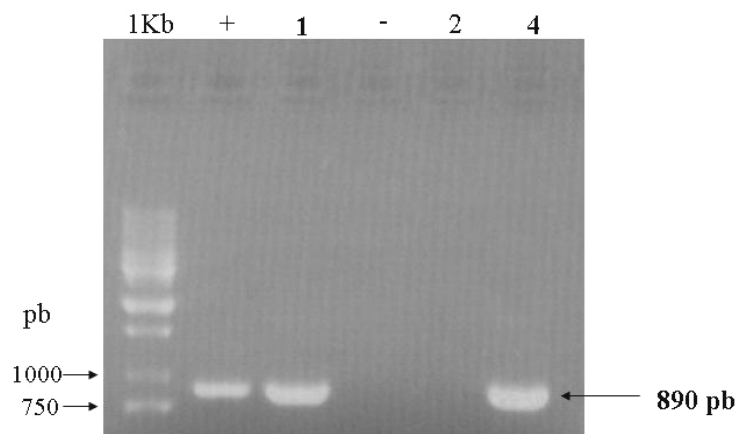


Figura 11 - Padrão eletroforético em gel de agarose 1% dos plasmídeos recombinantes pDEST/*mp* identificados por PCR. **1Kb plus DNA ladder**, Marcador Molecular; +, cDNA de laranja Pêra infectada pelo CiLV-C; -, cDNA de laranja Pêra sadia; 2, plasmídeo vazio; 1 e 4, plasmídeos contendo o inserto da *mp*



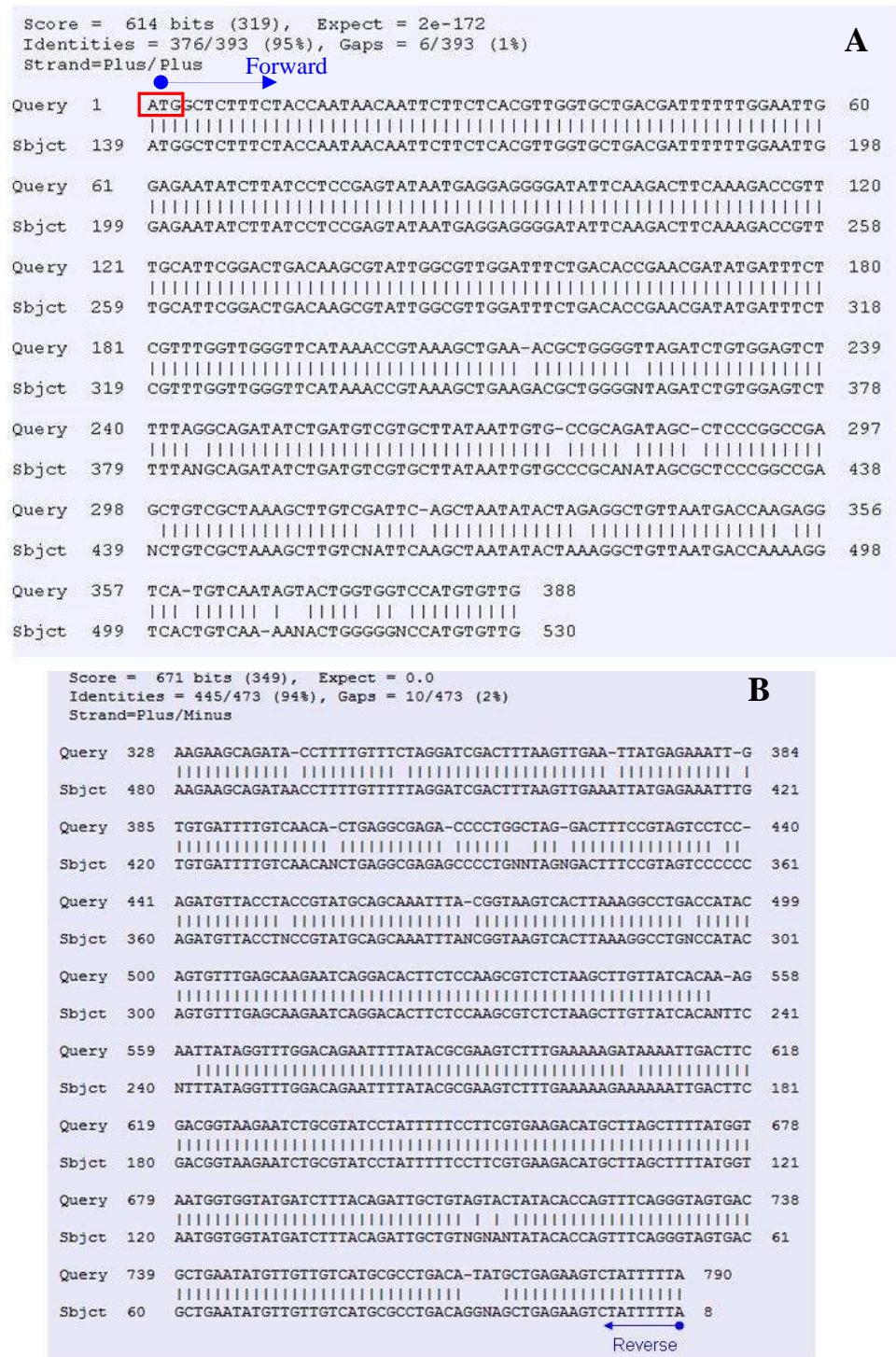


Figura 12 - Análise da sequência do pDEST<sup>TM</sup>17/*helicase* e pDEST<sup>TM</sup>17/*mp* pelo programa Blast 2 Sequences. **A**, Alinhamento entre a sequência Forward gerada para a *mp* com a sequência presente no GenBank. **B**, Alinhamento entre a sequência Reverse gerada para *helicase* com a sequência presente no GenBank

Os clones positivos na PCR foram sequenciados e o resultado do alinhamento entre as sequências geradas e as presentes no GenBank mostrou similaridade acima de 94% para ambas as ORFs (Figura 12). Além disso, sequências fundamentais como o sítio de ligação dos ribossomos (Shine-Delgarno) e as seis histidinas alinhadas também foram identificadas nos clones (Figura 13).

```

CAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATTATACATATGTC
CTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
CCGCGGCCCGCCCCCTCACCATGGCTCTTTCTACCAATAACAATTCTTCTCACGTGGT
GCTGACGATTTTTTGGAAATTGGAGAATATCTTATCCTCCGAGTATAATGAGGAGGGGAT
ATTCAAGACTTCAAAGACCGTTTGCATTCGGACTGACAAGCGTATGGCGTTGGATTTCT
TGACACCGAACGATATGATTTCTCGTTTGGTTGGGTTCATAAACCGTAAAGCTGAAGAC
GCTGGGGNTAGATCTGTGGAGTCTTTANGCAGATATCTGATGTCGTGCTTATAAATTGT
GCCCCGA

```

- ◆ Shine-Delgarno    ◆ Localização da cauda de 6xHis    ◆ Sítio de recombinação *attB1*
- ◆ Sequência para clonagem direcional adicionada antes do códon    ◆ Sequência da ORF *mp* de iniciação

Figura 13 - Demonstração da região de recombinação na sequência forward do clone pDEST<sup>TM</sup>17/*mp*

### 4.3 Expressão *in vitro*

Os plasmídeos pDEST<sup>TM</sup>17/*helicase* e pDEST<sup>TM</sup>17/*mp*, depois de extraídos da *E. coli* DH5 $\alpha$ , foram utilizados para a transformação química das linhagens *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup>, BL21-DE3, BL21-DE3-pLysS e BL21-DE3-RP. Após a transformação, algumas colônias recombinantes foram selecionadas ao acaso para análise do nível de expressão das proteínas, através do experimento piloto descrito no item 3.4.3.

Os resultados para proteína helicase mostraram que não houve diferença de expressão entre clones induzidos e não induzidos para as cepas BL21-DE3, BL21-DE3-pLysS e BL21-DE3-RP na temperatura de indução de 37°C (Figura 14). Além disso, não foi possível verificar claramente a massa da proteína em torno de 29 KDa como esperado. O mesmo resultado foi observado para a cepa BL21-AI<sup>TM</sup> (Figura 15). Desta forma, algumas hipóteses foram formuladas na tentativa de explicar a não visualização da helicase em células induzidas. Dentre elas, a formação de corpos de inclusão impedindo que a proteína ficasse disponível mesmo após a fervura celular, havendo neste caso, necessidade de sua solubilização com solvente orgânico. Outra hipótese é

de que a temperatura inicialmente utilizada para a expressão da proteína (37°C) tenha sido elevada, sendo a diminuição da temperatura uma possível forma de contornar este problema, promovendo assim a expressão mais lenta da proteína exógena à *E. coli*. No entanto, esta hipótese foi descartada após verificarmos a repetição dos resultados para as cepas BL21-DE3, BL21-DE3-pLysS e BL21-DE3-RP, testadas com temperatura de indução de 25°C (Figura 14). A cepa BL21-AI<sup>TM</sup> não foi avaliada nesta temperatura.

Por fim, não podemos descartar a possível ineficiência do sistema de expressão utilizado para a disponibilização da proteína helicase, uma vez que não encontramos este problema na expressão da proteína de movimento utilizando os mesmos conjuntos de vetores. Além disso, devemos considerar que, nem sempre, proteínas distintas apresentam o mesmo comportamento durante a expressão *in vitro*. Assim, o clone 1 da cepa BL21-AI<sup>TM</sup>/*helicase* foi selecionado ao acaso para ser utilizado no experimento de expressão em larga escala.

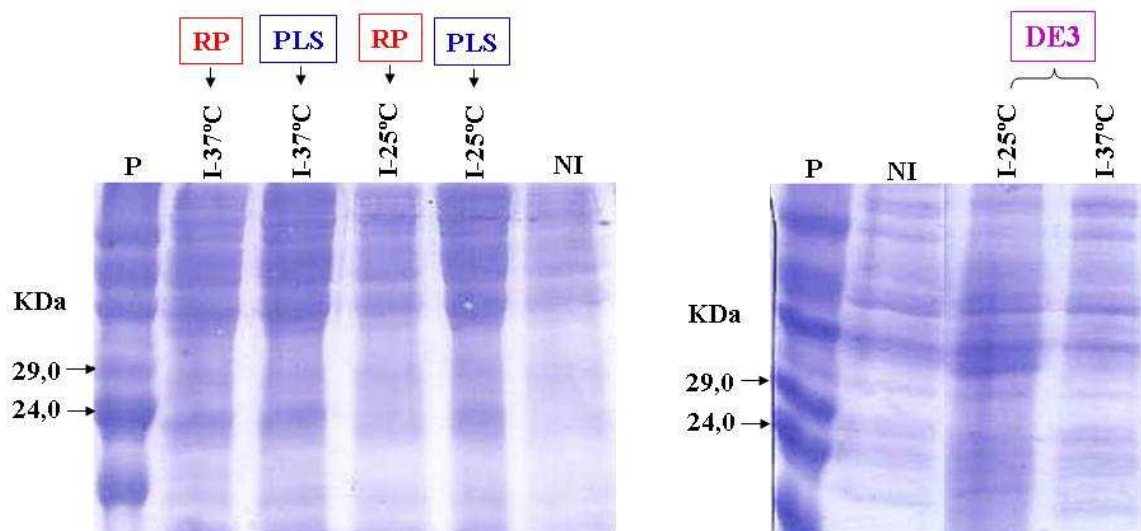


Figura 14 - Eletroforese em gel SDS-PAGE 19% de células lisadas por fervura dos clones de diferentes cepas *E. coli* BL21/*helicase* para verificação do nível de expressão. P, Padrão; NI, clone não induzido; I-37°C-RP, clone induzido a 37°C da cepa BL21-DE3-RP; I-25°C-RP, clone induzido a 25°C da cepa BL21-DE3-RP; I-37°C-PLS, clone induzido a 37°C da cepa BL21-DE3-pLysS; I-25°C-PLS, clone induzido a 25°C da cepa BL21-DE3-pLysS; I-25°C-DE3, clone induzido a 25°C da cepa BL21-DE3; I-37°C-DE3, clone induzido a 37°C da cepa BL21-DE3

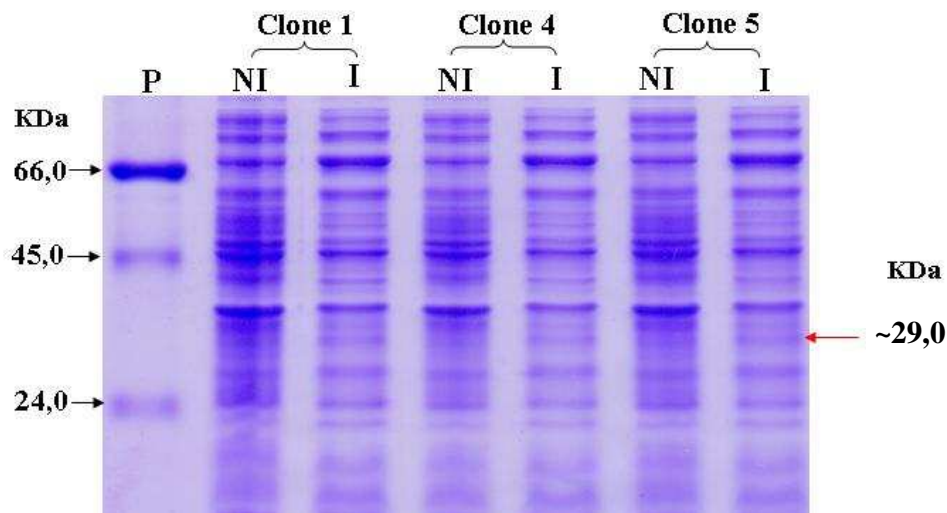


Figura 15 - Eletroforese em SDS-PAGE 12% de células lisadas por fervura dos clones de *E. coli* BL21-AI™/*helicase* para verificação do nível de expressão. **P**, Padrão; **NI**, clone não induzido; **I**, clone induzido

A comparação do nível de expressão entre clones de *E. coli* BL21-AI™ para MP mostrou que o clone 6 foi capaz de expressar a proteína em quantidade levemente superior à dos clones 4 e 5 (Figura 16). Além disso, também verificamos que a massa da proteína expressa estava em torno de 35 KDa, coincidindo com a estimada por Locali et al., (2006).

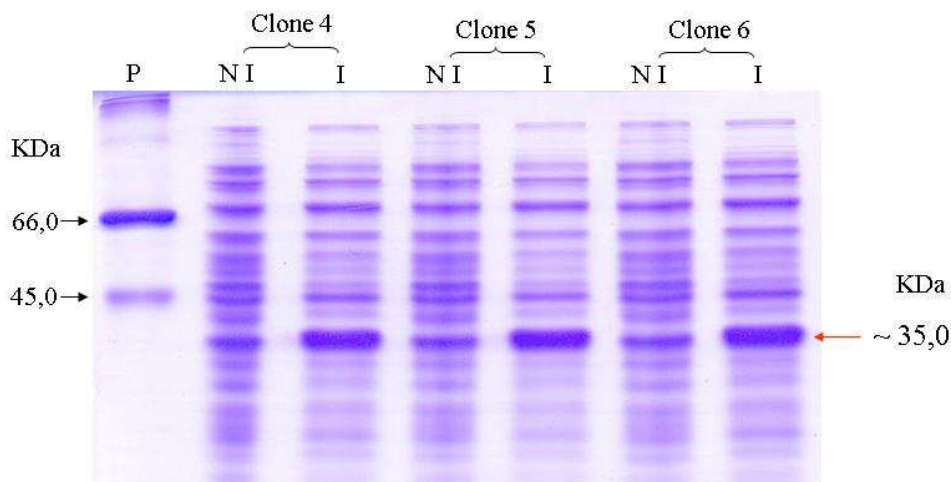


Figura 16 - Eletroforese em SDS-PAGE 12% de células lisadas dos clones de *E. coli* BL21-AI™/*mp* para verificação do nível de expressão. **P**, Padrão Bread Range (BioRad); **NI**, clone não induzido; **I**, clone induzido

A expressão da MP em diferentes cepas de *E. coli* BL21 (BL21-DE3, BL21-DE3-pLysS e BL21-DE3-RP) visou testar um sistema de expressão mais eficiente e que pudesse nos fornecer a proteína em maior concentração, menos contaminada na etapa de purificação e, se possível, presente na fração solúvel (o que nos garantiria a preservação de sua conformação original sem perda de epítopos conformacionais). O resultado deste experimento mostrou que todas as cepas de *E. coli* testadas foram capazes de expressar a MP em grande quantidade (Figura 17), não havendo diferença significativa de expressão entre elas. Desta forma, a cepa selecionada para expressão em larga escala foi a BL21-DE3-pLysS/*mp*.

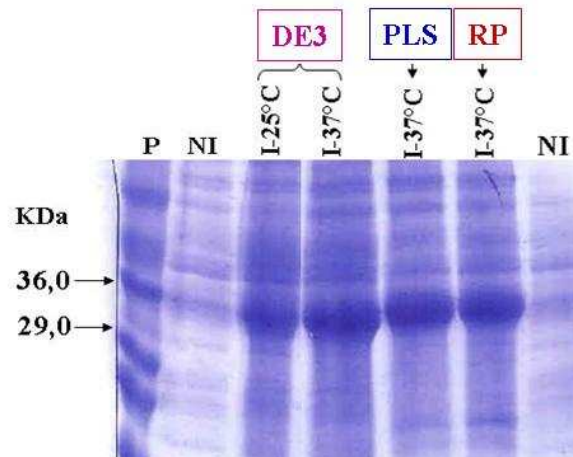


Figura 17 - Eletroforese em SDS-PAGE 19% de células lisadas por fervura dos clones de diferentes cepas *E. coli* BL21/*mp* para verificação do nível de expressão. **P**, Padrão; **NI**, clone não induzido; **I-25°C-DE3**, clone induzido a 25°C da cepa BL21-DE3; **I-37°C-DE3**, clone induzido a 37°C da cepa BL21-DE3; **I-37°C-PLS**, clone induzido a 37°C da cepa BL21-DE3-pLysS; **I-37°C-RP**, clone induzido a 37°C da cepa BL21-DE3-RP

No entanto, previamente ao ensaio de expressão em larga escala, ambas as proteínas foram extraídas para que fosse determinada a solubilidade. O resultado da extração protéica de células de *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup> mostrou que a helicase estava presente na fração insolúvel de proteínas e que sua massa era próxima de 29KDa (Figura 18). Tal fato, como já mencionado anteriormente, pode ocorrer porque a *E. coli*, quando expressa determinadas proteínas exógenas, tende a formar corpos de inclusão que só são solubilizados na presença do solvente orgânico (uréia) durante a extração de proteínas insolúveis. Infelizmente, a liberação da proteína para o meio aquoso resulta em sua desnaturação e perda de conformação tridimensional.

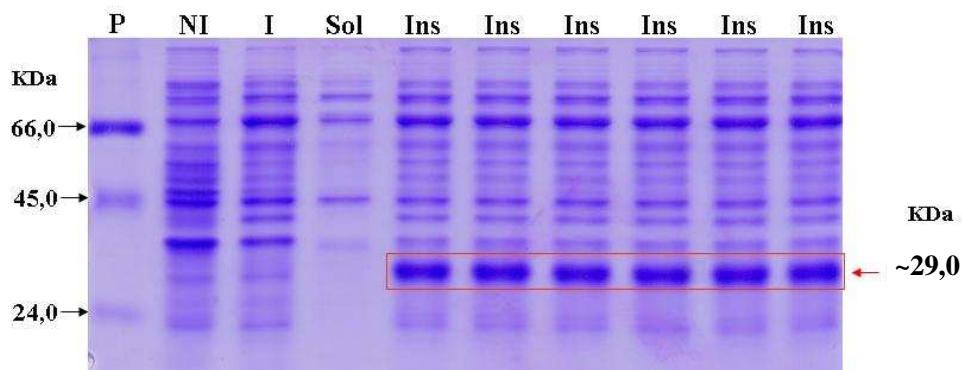


Figura 18 - Eletroforese SDS-PAGE 12% da extração de proteínas solúveis e insolúveis dos clones induzidos de *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup>/*helicase*. **P**, Padrão Broad Range (BioRad); **NI**, clones não induzidos; **I**, clone induzido; **Sol**, fração solúvel de proteínas e **Ins**, fração insolúvel de proteínas. A seta vermelha indica a presença da helicase com 29,0 KDa

O mesmo resultado foi observado para proteína de movimento expressa em BL21-AI<sup>TM</sup>, que também se mostrou presente na fração insolúvel de proteínas (Figura 19). Adicionalmente, a extração da MP de células induzidas de BL21-DE3-pLysS resultou em grande quantidade da proteína presente na fração insolúvel (Figura 20).

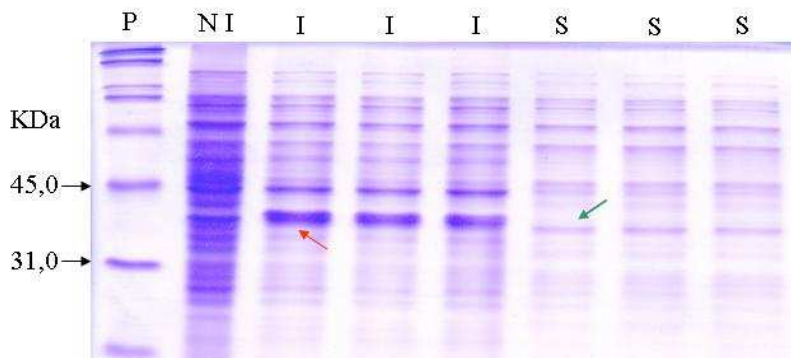


Figura 19 - Eletroforese SDS-PAGE 12% da extração de proteínas solúveis e insolúveis dos clones induzidos de *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup>/*mp*. **P**, Padrão Broad Range (BioRad); **NI**, clones não induzidos; **I**, fração insolúvel de proteínas; **S**, fração solúvel de proteínas. Seta vermelha indica a presença da MP com 35 KDa e seta verde a ausência da MP

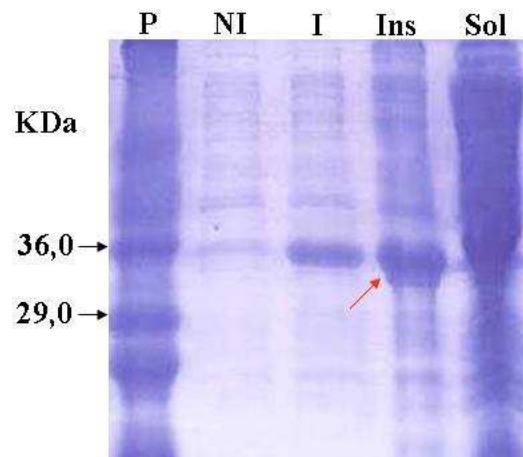


Figura 20 - Eletroforese em SDS-PAGE 19% da extração de proteínas dos clones de *E. coli* BL21-pLysS/*mp*. **P**, Padrão Broad Range (BioRad); **NI**, clones não induzidos; **I**, clones induzidos; **Ins**, fração de proteínas insolúveis; **Sol**, fração de proteínas solúveis. Seta vermelha indica a presença da MP com aproximadamente 35 KDa

A confirmação da insolubilidade da helicase e da MP torna-se de grande relevância na etapa seguinte de produção dos antissoros, uma vez que, a desnaturação das proteínas durante o processo de extração causa alterações conformacionais em suas estruturas. Isto pode resultar em problemas no reconhecimento das proteínas intactas presentes na planta infectada pelo CiLV-C utilizando os anticorpos produzidos partir da proteína expressa *in vitro*. Resultados semelhantes envolvendo insolubilidade de proteínas relacionadas com a replicação viral (Hills et al., 1987; Çevik et al., 2008) e com a MP (Chen et al, 2000) foram anteriormente relatados durante experimentos de expressão *in vitro*. Estes resultados podem ser explicados pela tendência de formação de corpos de inclusão durante a expressão de proteínas recombinantes em células de *E. coli* (Martínez-Alonso et al, 2009).

Para comprovação de que as proteínas presentes nas frações insolúveis eram a helicase e a MP, as bandas apresentando massas semelhantes às das proteínas foram recortadas do gel de poliacrilamida e submetidas ao sequenciamento, conforme descrito no item 3.6.2.

A análise da possível helicase revelou similaridade de quatro peptídeos com a poliproteína (Replicase) do RNA 1 do CiLV-C, correspondentes à região da proteína helicase (Figura 21 e 22), confirmando o sucesso da expressão *in vitro* na primeira etapa do trabalho. Além disso, os resultados confirmaram que a massa da helicase é de

aproximadamente 29 KDa. O fato do SDS-PAGE mostrar sua localização na posição de aproximadamente 31,0 KDa é devido à presença da cauda de histidinas na região N-terminal, aumentando a massa da proteína em aproximadamente 2,5 KDa

Q1AF88_9VIRU Mass: 286255 Score: 178 Queries matched: 5										
Polyprotein.- Cytoplasmic citrus leprosis virus.										
	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">7</a>	423.7455	845.4764	845.4759	0.60	0	27	12	1	K.QIPFVSR.I
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">10</a>	441.2285	880.4424	880.4555	-14.87	0	55	0.01	1	R.FGQNFIR.E
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">14</a>	467.7133	933.4120	933.4556	-46.65	0	31	2.6	1	R.SPPDVTYR.M
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">15</a>	473.7563	945.4980	945.4879	10.7	0	55	0.017	1	K.VTLNENTR.L
	<a href="#">26</a>	390.5506	1168.6300	1168.6128	14.7	1	12	2.6e+02	2	R.IDFKLNYEK.L

Match to: Q1AF88\_9VIRU Score: 178  
 Polyprotein.- Cytoplasmic citrus leprosis virus.  
 Found in search of C:\TEMP\r30k\_heli.pkl

Nominal mass (M<sub>r</sub>): 286255 Calculated pI value: 6.94

NCBI BLAST search of Q1AF88\_9VIRU against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Cytoplasmic citrus leprosis virus](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI [Entrez](#):  
[ABA42875](#) from [Cytoplasmic citrus leprosis virus](#)

Figura 21 - Sequenciamento da proteína helicase. Os quatro peptídeos em vermelho correspondem àqueles similares à região da proteína helicase dentro da poliproteína replicase

1 MSHSTVUETL	DVNFVRELLR	SHPEASSHCD	EPRITATHTK	GRGVASSEKP	1851 RWINRPVDES	MLUPHLSLGG	GGTTTPSRVY	TYRS IPSVDL	HKGGDKCVRG
51 PUSFTIANGQ	IYSDSESVITS	TEAKAAAILS	WISSYPAEIR	EQLEGRIERG	1901 YMPRSDIILD	KRDTLTAMLN	KIADAPPKGM	LUVSSAWLDR	FWQRLKPLL
101 FIDHPDUREA	ARCINSARLN	NITTTALESK	PLLAGEMVSH	DMERFLSEKI	1951 KSIVGKSNIF	CAGUNSNINS	TUTEVWQLNA	VDKUPNHFID	PIFDDDAVRS
151 LQKIRLTCG	KFVAMHDAAA	LRRLRFRMR	DKVGYKDDD	IFEGYRSGNE	2001 ADIGVQPVYQ	MDNMDPVLSD	YGFDKFAFI	QNFLLCTTFN	SCYVDFWDA
201 DVGASQMDVI	ADLTDGMC	TPDLDFRDI	FLERLGGYIV	SMVCPSTKDH	2051 WITVNLDDL	AIDDIVINVI	KFATIDRTVI	CMIPRLSFC	PVARKACLV
251 GIIICGPIREG	STKYCEINIG	QQCYIKAPFL	TPVMSAYDIT	AAGIVDCHIA	2101 SLIAUQKRRR	MVPQLSSEVS	PYVMADQLFD	SLRSLDERV	VQEVVYGFPE
301 ANAGHAIHCL	HIPSAILSGS	TSGGKDLLQY	KGBIVVDEGI	KYVYKQKFLND	2151 LAANLNDQNG	SVVDEVIGEY	CIYSTAVERY	QLITNSPKP	TLSDAAYNEF
351 TQASVWBLD	VYLDKFLTKV	VLGSDKRFYM	YEITMFGGV	AIIIEVTRER	2201 AAPQVVLHQT	KDINAVFCVI	WRGKTVVQS	MLRHHNIFM	FADMDPSFA
401 DFIAGSKLTF	NIPRTREPMI	VTIMYWEVUT	GYESLTKGRM	GLKSGMRRPQ	2251 DLLTERVSTK	VQETFDLSLEI	DIRKYDRSQD	LVLLLECKL	LRVGVSEEL
451 SIEVPEEFTL	SVFKVGHVVD	SNKPVYDGLL	KSGGUGIAAR	NIGGTTMDDP	2301 VIIFRSHVVE	SIVKDRBSGL	RFKVQVQRS	GDGGTFIGNT	LFLIVLCARN
501 SSPIPURKLG	TFIUTYRMLL	VQEKMEATQG	LUTHEMLADQ	YETRSSEKGI	2351 FDLRKLKLAU	FSGDDSLLVG	ERRRLQDQSQ	NFSDLFNLDV	KFFPNFKYYH
551 VRLFMVFPSP	DKUGETQHP	STVDLGLGFP	SHSEDNKFVC	DFNLMTEERS	2401 FCSKFLIAVE	DRWYFIDPVP	KLCIRLARLD	LVNNGHIEEY	RISLKDITKY
601 RLSQFERLVQ	WRETFSEKUR	KCPIVANDST	MMLEYVLDIP	DMVQVNIKSL	2451 YCDDSIIVREL	SKAVCDRYPV	AVDPAAEVFRV	VCSIIVSSKDE	FRLLFEPLA
651 RDDDLTSLML	DHDFDAYLPS	KIEVNDAKCT	KDLTVIQVPG	DGNCLYVYCV	2501 CLPEGNLLPV	IN			
701 KACLVRGIVS	CDLKSRLRDS	PYFLEVAKLA	RDSGEDEFLD	SLEEDGVYGN					
751 KPTLILISKT	FWUNICVHLK	GGRELITHTFI	SNKGRFVHL	QLENSHYVLL					
801 VPCIKACLID	EVULCHGALS	MVAPTANDVR	RLVDLYKIYT	RDDGTIASVFN					
851 IFMNSYKGF	LVUYELGME	IASSLEIPSS	SGNKFLITDV	MLRHCIKALR					
901 VLDPNSKIV	LRSSNTSRIP	DRYGVCDPTM	DSEFNEESPC	LSTTLSDVLR					
951 LGIVSQCHVV	FSDLSPVPLK	PFAPGFRTRT	SVAERSNKKIL	LAWALSQGG					
1001 TAVIVVIRPE	EVPESLRMLT	TLFEDIRPFK	PKAISTSIVD	GVLKCSGKRS					
1051 HPGSEYFITS	EVNMMFYTVN	VENFYKOTLE	ESEUSNVVQK	LCGLYAGGGI					
1101 VSKTRHNSYV	RSFVLDRLSI	LSKLMHFSSS	VSFGLFGKFI	STYKLRGUCD					
1151 TKLKFCHRSI	EEILDSQCLM	CKVSKVDVNS	LRSDSLASF	ATREBRAVVE					
1201 TFDCCGDVUS	IISFIRKLVY	MEFKDLRAVS	DCFLNDAVAK	SFLAYARCYS					
1251 DVEISLQGLK	GRLLUDITCR	SSWVNGCEFG	DFELUSCHRM	DVDTAIEVUL					
1301 IQHAMDQRY	MMETIVINSR	ADAIRAGLSV	RKIKPCGDL	DDLKNSUKYE					
1351 PKFVYVTEES	LVMSIKAIUG	UGDETTREPT	DNVAVKPAV	VTRKVDSENL					
1401 DDIRIKAVTEY	RSVNGRELNS	SNBULEKTVS	NLLRPTETRD	PKRLMDMTP					
1451 NSSILSDHEK	LKDSVGIITC	MCKILKMSFP	IUQFDDISAV	YDIVNGSVAD					
1501 KSDYFMHRRG	KTKKQVGGFA	IYTSLVAKHQ	VESILKAUVC	VYASEKINDL					
1551 SAISIDWQA	VAGAGKTLTL	VETLITDVLV	VCPTVENRDS	IKLRIGRRYP					
1601 DLDPKREVCR	VRTINGVLDV	FSTKLAKVYL	KEKTELLVDE	AIRHYAGCLF					
1651 VLCHIVNIRR	MFCVGDGKGI	PFVSRIDEKL	HYKRLCDIVN	TEARPLARTI					
1701 RSPFDVYVM	QQIYGRSLKG	LTIQCLSKNQ	DTSPSUSKLV	ITKRYRFGQH					
1751 FSRVDFERDK	IDFDGKRLRI	LFELREDEHS	FYNGGHHIFT	DCCSTIRHQF					
1801 GSDAEVWAM	RLTYAKRSIF	MDERQCLVAL	TRNTGSRVYV	SUNEGTDVLT					

Figura 22 - Localização das sequências similares dos peptídeos que originam a proteína helicase dentro da poliproteína replicase



O sequenciamento da MP revelou similaridade de cinco peptídeos com a proteína p32 do CiLV-C, correspondentes à possível proteína de movimento (Figuras 23 e 24). Também foi possível confirmar que a massa da proteína é de aproximadamente 32,5 KDa (Figuras 23 e 24), e sua localização na posição de 35 KDa também ocorre devido ao aumento de massa gerado pela cauda de histidinas.

```

P32.- Cytoplasmic citrus leprosis virus.
Found in search of C:\TEMP\Renata sup rep2.pkl

Nominal mass (Mr): 32511; Calculated pI value: 7.74
NCBI BLAST search of Q1AF90_9VIRU against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications
|
Taxonomy: Cytoplasmic citrus leprosis virus
Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
ABA42871 from Cytoplasmic citrus leprosis virus

Variable modifications: Acetyl (N-term)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 18%

Matched peptides shown in Bold Red

      1 MALSTNNNSS HVGADDFLEL ENILSSEYNE EGIKTSKTV CIRTDKRIGV
     51 GFLTPNDMIS RLVGFINRKA EDAGVRSVES FRQISDVVLI IVPQIALPAE
    101 LSLKLVDSAN ILEAVNDQEV TVNSTGGPCV VVMNCAHSIP NEDRTHVNGS
    151 EVHRRLGIOY QVDCDNISGR VTTFSTITLW REAFSFRPSF YKVSDDLVPV
    201 ISVGFRRKAVI AKSHADLQRS IGRGLIVTHH SSQSSVTSES PIDLTVKKS
    251 GLKIRDKSED DNQRKHPVPL TSSNNKLKTL RVSTPIVNG RSTSTSE
  
```

Figura 23 - Sequenciamento da MP. Os cinco peptídeos em vermelho correspondem àqueles similares à proteína p32 (possível proteína de movimento)

### Probability Based Mowse Score

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 50 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
15	647.8611	1293.7076	1293.7081	-0.0005	0	86	1.6e-05	1	R.VTTFSTITLWR.E
21	689.8345	1377.6544	1377.6717	-0.0172	0	25	21	1	R.EAFSFRPSFYK.V
22	742.8896	1483.7646	1483.8398	-0.0751	0	32	4.2	1	K.VSDPLVVPISVGFR.K
25	760.3889	1518.7632	1518.7864	-0.0231	0	(16)	1.7e+02	2	R.IGVGFLTPNDMISR.L
26	760.4040	1518.7934	1518.7864	0.0071	0	69	0.00091	1	R.IGVGFLTPNDMISR.L
42	806.9749	1611.9352	1611.9348	0.0005	1	6	1.4e+03	2	K.VSDPLVVPISVGFRK.A
61	841.7609	2522.2609	2522.2864	-0.0255	0	35	1	1	R.GLIVTHHSSESSVTSESPIDLTVK.K
63	841.7674	2522.2804	2522.2864	-0.0060	0	(6)	8.4e+02	1	R.GLIVTHHSSESSVTSESPIDLTVK.K
67	884.4630	2650.3672	2650.3813	-0.0141	1	29	3.4	1	R.GLIVTHHSSESSVTSESPIDLTVKK.S

Figura 24 - Características individuais dos cinco peptídeos em vermelho, similares à proteína p32

## 4.4 Purificação das proteínas

### 4.4.1 Helicase

A purificação da helicase foi realizada utilizando-se o sistema ProBond (Invitrogen). No entanto, ao final das eluições, grande parte da proteína induzida e presente na fração insolúvel não foi capaz de se ligar à resina carregada com níquel, sendo facilmente visualizada na fração correspondente ao sobrenadante, coletado após incubação necessária para ligação da proteína (Figura 25 A). Além disso, não foi possível obter a proteína completamente isolada de outras contaminantes de *E.coli* após sua eluição em baixo pH (Figura 25 B).

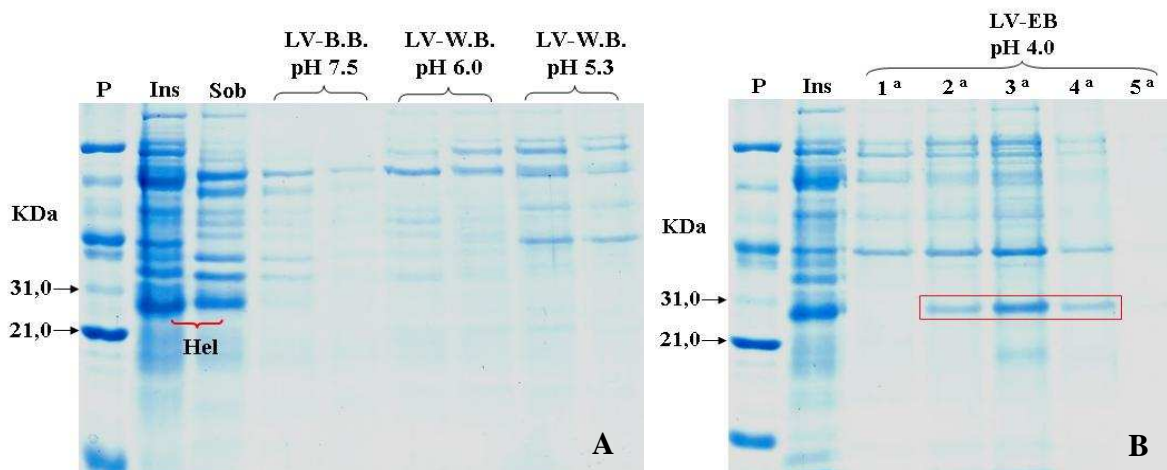


Figura 25 - Eletroforese em SDS-PAGE 12% da purificação da helicase. **P**, Padrão Broad Range (BioRad); **Ins**, fração insolúvel de proteínas; **Sob**, sobrenadante coletado após incubação para ligação da proteína; **LV-B.B.**, lavagem com tampão de ligação pH 7,5; **LV-W.B.**, lavagem com tampão de lavagem pH 6,0 e 5,3; **LV-E.B.**, lavagem com tampão de eluição pH 4,0. O retângulo vermelho mostra a presença da helicase (29 KDa)

Mesmo após várias tentativas de purificação, inclusive utilizando diferentes colunas como *His Gravi Trap Columns*<sup>TM</sup> (GE Healthcare) e *His Trap FF Crude* (GE Healthcare) conforme normas do fabricante, não foi possível a obtenção de uma fração contendo a helicase pura e em maior concentração. Desta forma, para dar continuidade ao trabalho, as frações (2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup>) eluídas em pH 4,0 da coluna ProBond foram selecionadas e, posteriormente, misturadas para serem utilizadas como antígeno na produção do antissoro contra essa proteína. Esta técnica foi realizada por Hills et

al.(1987) para produção de antissoro contra a proteína replicase do TMV. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram a eficácia do antissoro na detecção da proteína em tecido foliar de fumo infectado pelo TMV através de ELISA, Western Blot e imunolocalização *in situ*. Baseado nestes experimentos, a fração eluída foi aplicada em SDS-PAGE e a banda correspondente à proteína helicase recortada com um bisturi e utilizada como antígeno nas imunizações do coelho. Os fragmentos selecionados do gel foram macerados em tampão fosfato 100 mM pH 8,0 e misturados na mesma proporção com adjuvante de Freund.

#### **4.4.2 Proteína de movimento (MP)**

Para a obtenção da MP livre de qualquer contaminante foram necessárias três purificações sucessivas, já descritas no item 3.7.2. A primeira purificação foi feita por troca catiônica através da coluna SQ Sepharose, utilizando como amostra inicial a porção insolúvel das proteínas, sendo que todo o volume passado pela coluna durante a purificação foi coletado em várias frações. Através da análise do cromatograma, os maiores picos de absorvância foram selecionados (Figura 26 A) e analisados via SDS-PAGE para localização da MP. Os resultados mostraram a presença de alta concentração da proteína na fração correspondente ao flow through (FT), com significativa diminuição de proteínas contaminantes (Figura 27). Além disso, a MP também mostrou-se presente nas frações eluídas E1 e E2, porém, em concentração inferior ao FT, sendo portanto descartadas. Desta forma, a purificação subsequente realizada por troca aniônica através da coluna SP Sepharose utilizou como amostra inicial o FT coletado na primeira coluna, com o objetivo de eliminar ainda mais as proteínas contaminantes. Após a coleta do volume total passado pela coluna durante a purificação, todos os picos mais elevados de absorvância foram selecionados (Figura 26 B) e analisados como na primeira purificação. Os resultados mostraram a presença da MP tanto nas frações correspondentes aos FT1 e FT2 quanto nas eluições E1, E2 e E3 (Figura 27). Além disso, todas as amostras avaliadas apresentaram-se com alta concentração da MP e praticamente livres de proteínas contaminantes.

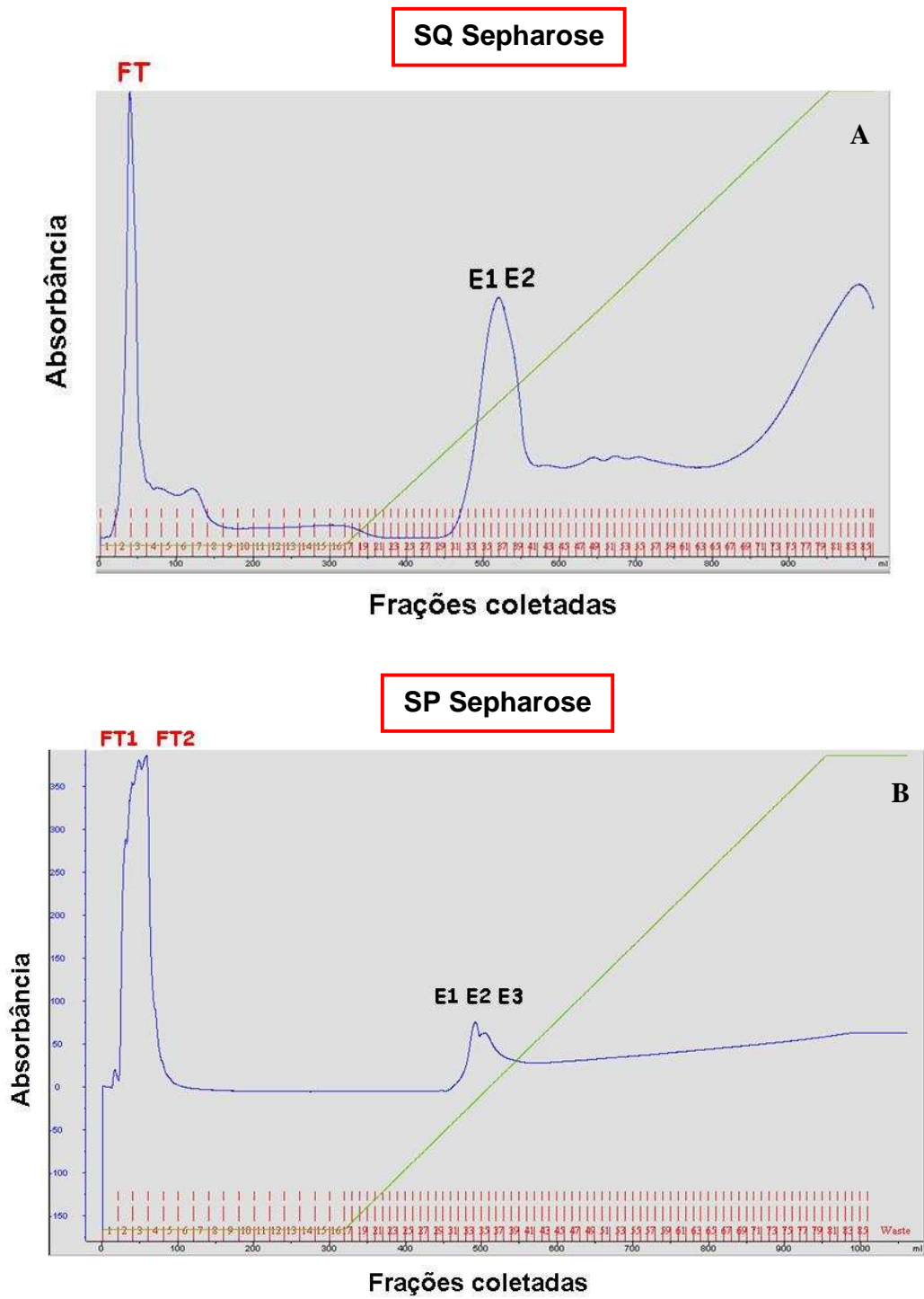


Figura 26 - Cromatogramas das purificações por troca iônica. **A**, SQ sepharose: 1° purificação; **B**, SP sepharose: 2° purificação

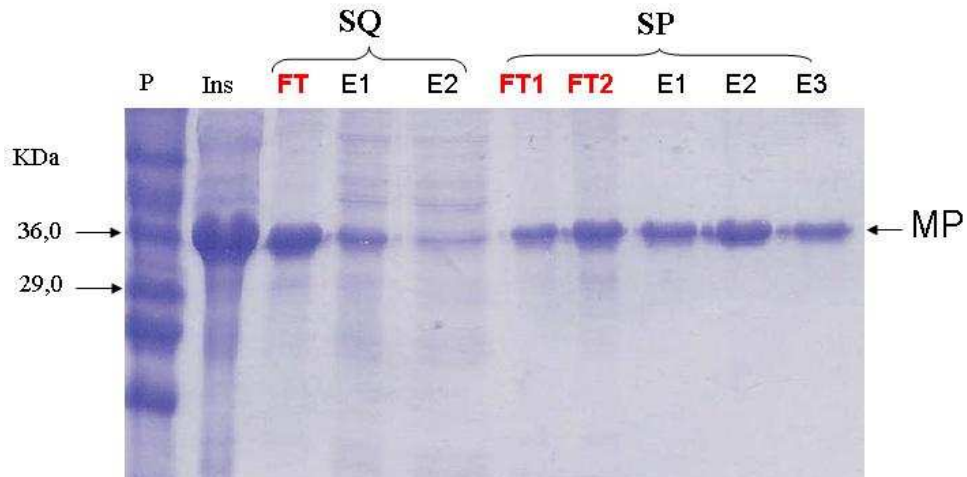


Figura 27 - Eletroforese em SDS-PAGE 19% das frações recuperadas nas purificações da MP com colunas SQ Sepharose e SP Sepharose, correspondentes aos maiores picos de absorvância. **P**, padrão; **Ins**, extrato bruto insolúvel contendo a MP; **FT**, **FT1** e **FT2**, flow through; **E1**, eluição 1; **E2**, eluição 2; **E3**, eluição 3

A última purificação utilizou como amostra inicial as frações FT1 e FT2 coletadas na coluna SP Sepharose e foi realizada para selecionar a MP (contendo cauda de histidinas) através de cromatografia de afinidade pela coluna HisTrap<sup>TM</sup>HP. As frações coletadas nesta etapa que apresentaram altos picos de absorvância foram selecionadas através do cromatograma (Figura 28) e analisadas via SDS-PAGE para identificação da MP. Os resultados mostraram a presença da proteína pura e em alta concentração na fração eluída E1 (Figura 29), confirmando ser a proteína alvo, uma vez que a mesma foi capaz de se ligar à coluna

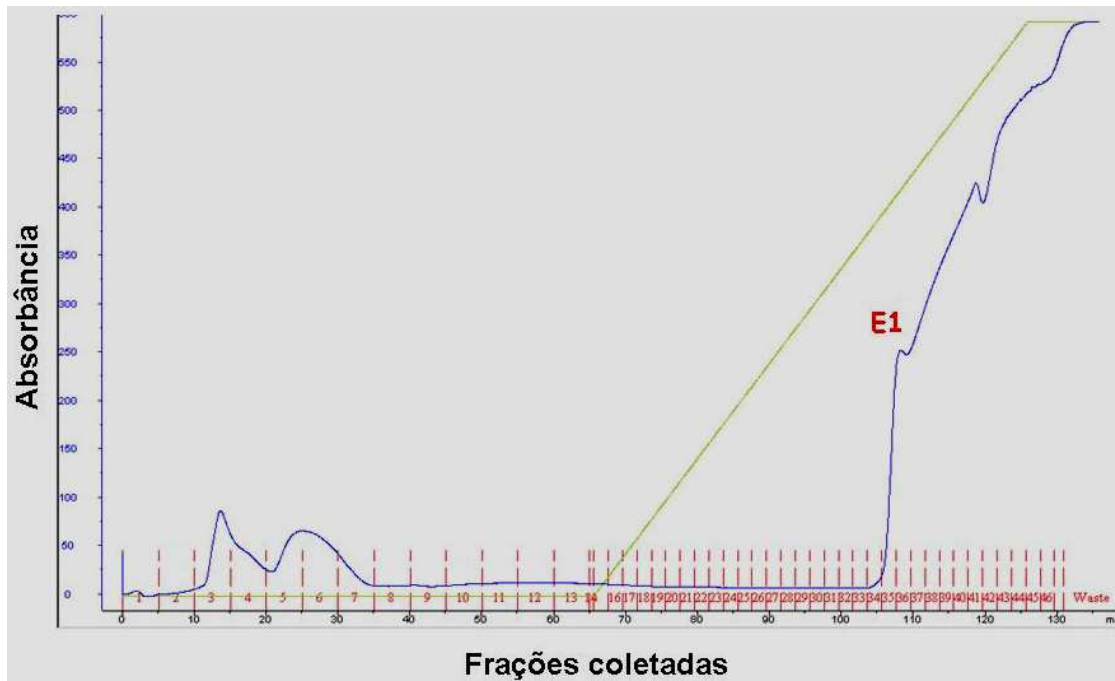


Figura 28 - Cromatograma da purificação por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HisTrap™ HP

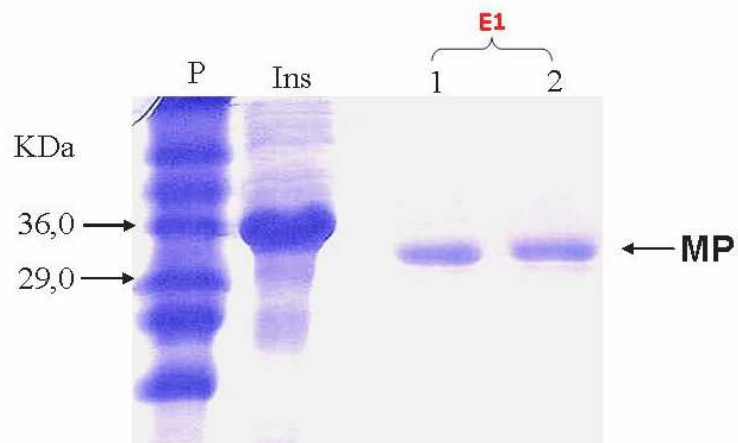


Figura 29 - Eletroforese em SDS-PAGE 19% das frações recuperadas com altos picos de absorbância na purificação da MP com coluna HisTrap™ HP. P, padrão; Ins, extrato bruto insolúvel contendo a MP; E1, eluição 1

Após a obtenção da proteína de movimento pura e em alta concentração, a mesma foi utilizada como antígeno para produção de antissoro. Um segundo antissoro foi produzido concomitantemente a esta etapa, utilizando a MP retirada de SDS-PAGE como antígeno, devido às dificuldades encontradas na obtenção da proteína pura.

#### 4.5 Testes sorológicos dos antissoros

Os antissoros contra a MP (produzido conforme comentado anteriormente) e a p29 (gentilmente cedido pela Dra. Eliane Locali-Fabris do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”-IAC) foram testados quanto à especificidade por ELISA e Western Blot, utilizando como amostras lesões de folhas infectadas pelo CiLV-C em diferentes estágios de desenvolvimento da doença. Observações feitas ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) mostraram que lesões lepróticas novas apresentam um número maior de células infectadas pelo vírus quando comparadas a lesões lepróticas mais velhas. Levando-se em consideração este fato, folhas de laranja Pêra com lesões novas (LN), lesões intermediárias (LI) e lesões velhas (LV) foram utilizadas como amostras nos testes sorológicos (Figura 30), além da planta sadia (controle negativo) e da proteína pura (controle positivo).

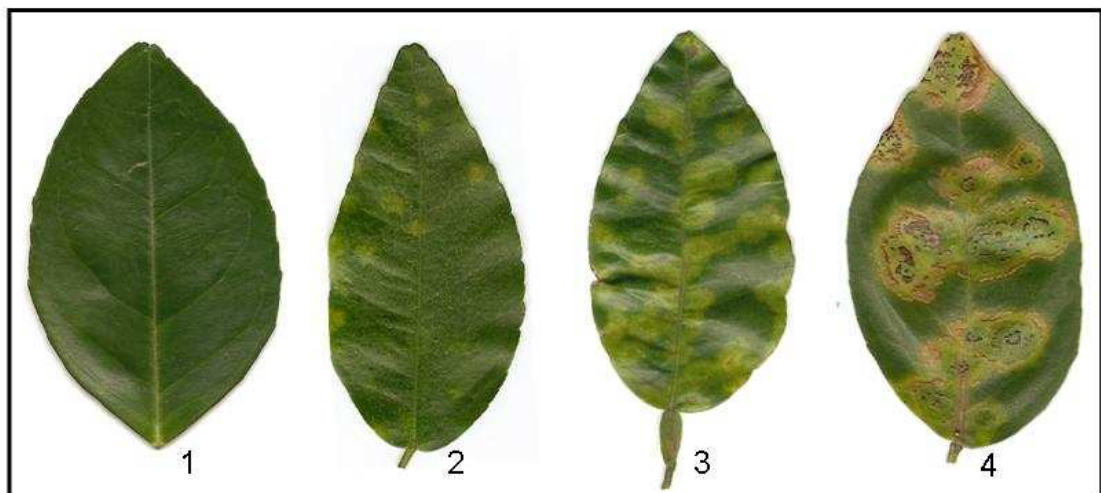


Figura 30 - Folhas de laranja Pêra. 1, sadia; 2, (LN) lesões novas causadas pelo CiLV-C; 3, (LI) lesões intermediárias causadas pelo CiLV-C; 4, (LV) lesões velhas causadas pelo CiLV-C

O resultado do ELISA mostrou que a proteína pura reagiu fortemente com o antissoro nas diluições de 1:500 e 1:1.000. A intensidade da reação foi diminuindo

conforme se aumentava a diluição do antissoro, como pode ser observado no gráfico em 1:5.000, 1:10.000 e 1:20.000 (Figura 31). A falta de reação positiva do extrato foliar de laranja infectada pelo CiLV-C com o antissoro na diluição 1:500 e 1:1.000 foi atribuída à baixa concentração das amostras, sendo provavelmente a diluição 1:50 insuficiente para detecção da MP. A amostra de folha doente submetida à fervura apresentou reação quase imperceptível, sendo desconsiderada em testes subsequentes de ELISA.

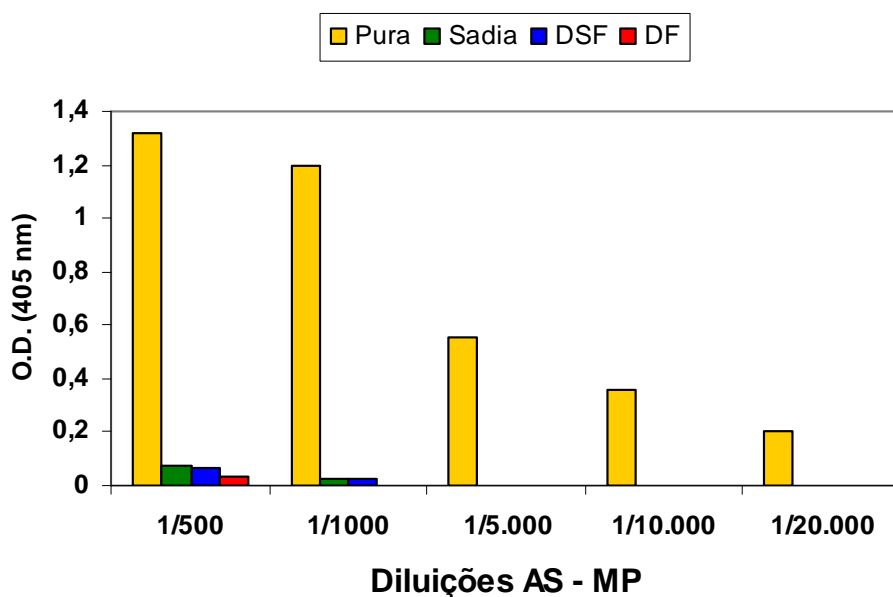


Figura 31 - PTA-ELISA. **Pura**, proteína MP pura; **Sadia**, planta de laranja Pêra sadia; **DSF**, lesões lepróticas de folhas de laranja Pêra sem serem submetidas à fervura; **DF**, lesões lepróticas de folhas de laranja Pêra submetidas à fervura. Tempo da reação: 30 minutos

Adicionalmente, levando-se em consideração a possibilidade de expressão diferencial da MP nos diferentes estágios de desenvolvimento da doença, procurou-se avaliar extratos foliares de lesões lepróticas novas, intermediárias e maduras. Considerando positivas as amostras que apresentaram valores de leitura acima de duas vezes a média dos controles (VELAME & FILHO, 2001; SILVA et al., 2006), os resultados mostram que todas as fases de desenvolvimento da doença reagem com o antissoro na diluição 1:1000, porém, as lesões maduras (LV) apresentam reação um pouco mais intensa do que as lesões intermediárias (LI) e lesões novas (LN) (Figura 32).



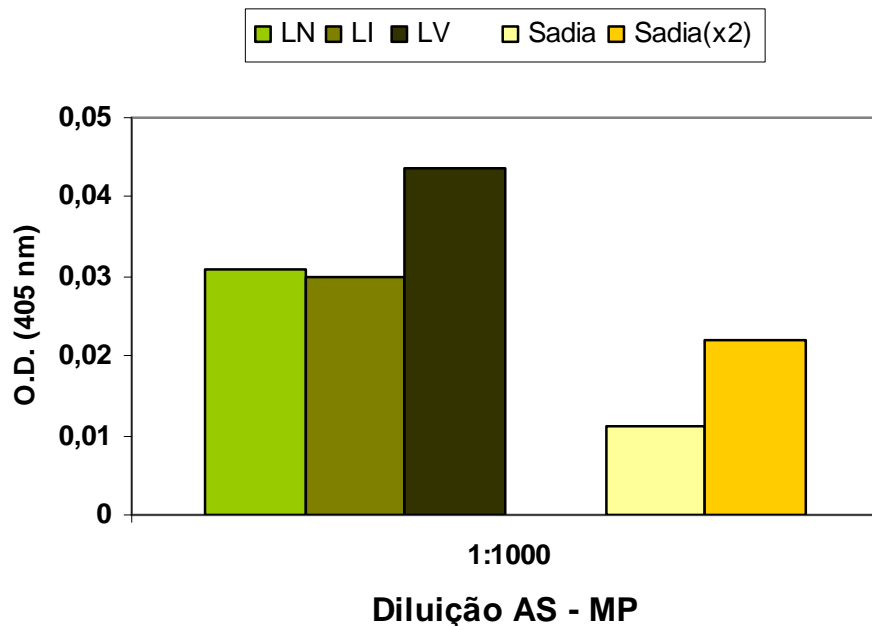


Figura 32 - PTA-ELISA. **LN**, lesão leprótica nova (estágio inicial de desenvolvimento); **LI**, lesão leprótica intermediária (estágio intermediário de desenvolvimento); **LV**, lesão leprótica velha (estágio avançado de desenvolvimento); **Sadia (x2)**, folha de laranja Pêra sadia (representando duas vezes a média de leitura do controle); **Sadia (x3)**, folha de laranja Pêra sadia (representando três vezes o valor da média de leitura do controle). Tempo da reação: 30 minutos

Buscando-se uma maior aplicabilidade da técnica de ELISA, foram feitos testes para a otimização da concentração do antissoro contra a MP utilizando somente lesões em estágio mais avançado da doença (LV), por terem sido estas as amostras que apresentaram melhores resultados preliminares. Os resultados revelaram que, para todas as diluições testadas de extrato de laranjeira doente (LV), as reações apresentadas foram positivas em relação ao controle negativo (Figura 33). No entanto, extratos foliares de lesões lepróticas diluídos 1:10 reagiram mais intensamente com o antissoro do que os extratos menos concentrados de 1:20 e 1:30 em todas diluições avaliadas. Além disso, as combinações antissoro 1:100 e 1:200 com extrato foliar a 1:10 apresentaram reações mais intensas do que todas as diluições testadas.

Os resultados em conjunto demonstram que o CiLV-C pode ser detectado em lesões lepróticas maduras (LV) de laranja Pêra preparadas na concentração de 1:10 (p/v), utilizando concentrações elevadas do antissoro contra a MP por ELISA.

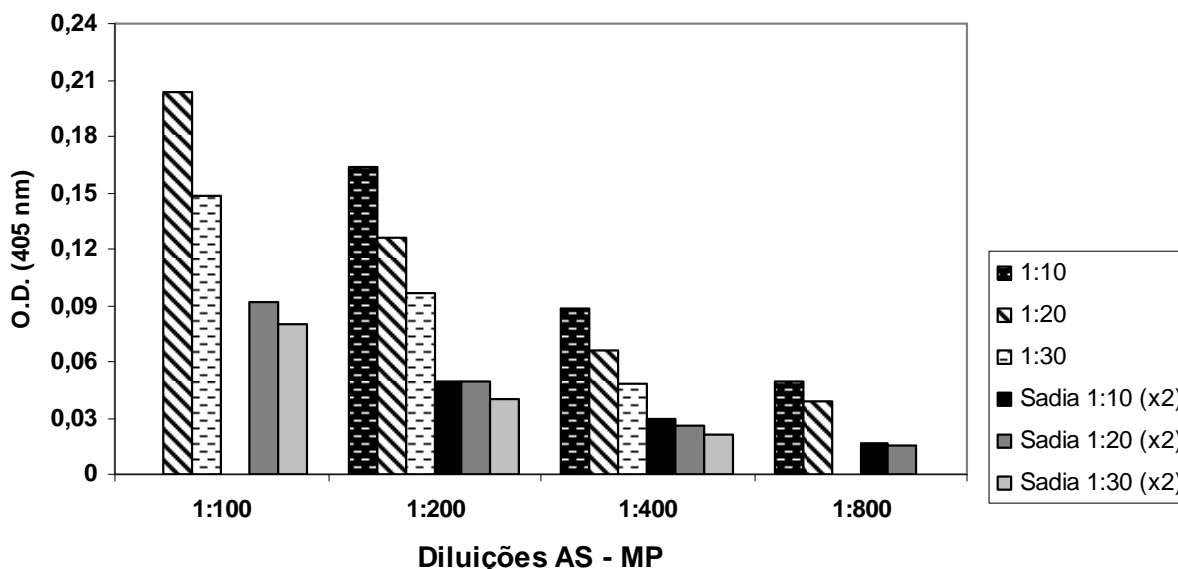


Figura 33 - PTA-ELISA. **1:10, 1:20 e 1:30**, proporções de lesões lepróticas em estágio de desenvolvimento avançado (LV) para tampão carbonato (p/v); **sadia 1:10 (x2), sadia 1:20 (x2) e sadia 1:30 (x2)**, proporções de planta sadia de laranja Pêra para tampão carbonato (p/v), já considerando duas vezes a média de leitura do controle. Tempo da reação: 30 minutos

Neste ponto vale ressaltar que, por algum motivo não identificado, algumas tentativas de detecção da MP por ELISA em amostras de laranja Pêra não funcionaram. Uma hipótese é que, mesmo após selecionarmos visualmente apenas as lesões maduras (LV) para o teste, ainda houve variação na idade das lesões e, consequentemente, na quantidade de MP presente no material avaliado.

Na tentativa de confirmar os resultados apresentados pelo ELISA, realizou-se Western Blot utilizando amostras de lesões lepróticas em todos os estágios de desenvolvimento da doença, além de folhas saudáveis, todas diluídas na proporção 1:3 (planta : tampão carbonato). Através deste método de detecção, utilizando o anticorpo contra MP diluído 1:500 e 1:100, foi possível detectar com facilidade a proteína de movimento pura obtida pela expressão *in vitro*. No entanto, o mesmo resultado não pode ser observado em plantas infectadas pelo CiLV-C (Figura 34).

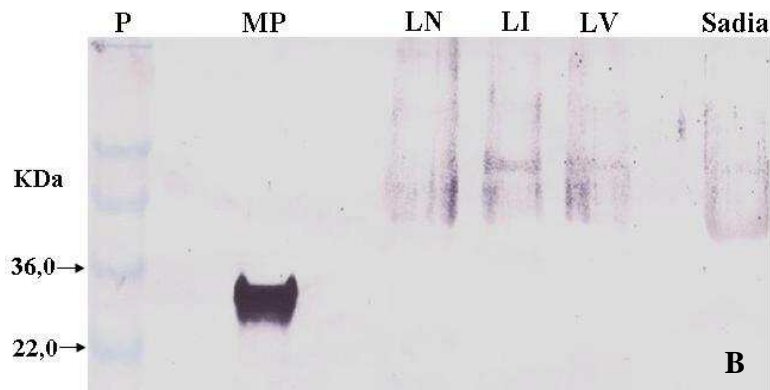


Figura 34 - Western Blot utilizando antissoro contra MP diluído 1:500. **P**, padrão; **MP**, proteína de movimento pura; **LN**, extrato foliar de lesões novas de laranja Pêra; **LI**, lesões extrato foliar de lesões intermediárias de laranja Pêra; **LV**, extrato foliar de lesões velhas de laranja Pêra; **Sadia**, extrato folias de laranja Pêra sadia

Desta forma, o antissoro produzido neste estudo contra MP pode ser utilizado para o diagnóstico da leprose através de ELISA, mas não de Western Blot, embora uma futura revisão dos procedimentos técnicos realizados no teste possa, eventualmente, fornecer resultados mais expressivos. Levando-se em consideração que a leprose ocorre em diversos países da América Latina, com chances reais de disseminação para outras regiões da América Central e do Caribe, muitas das quais apresentando limitadas capacidades laboratoriais e de recursos financeiros e humanos, a disponibilidade de antissoro para ELISA pode ser de grande auxílio, uma vez que a estrutura necessária para a realização deste teste, bem como a capacitação de pessoal, é simples e de baixo custo.

Uma possível explicação para ausência de reação do antissoro com a planta doente por Western Blot é que características intrínsecas das MPs como alta hidrofobicidade e associação com membranas das células hospedeiras (CHEN et al., 2000) tornariam sua solubilização difícil de ser realizada, impedindo sua detecção eficiente. Uma constatação desta dificuldade é a falta de trabalhos publicados relacionados com expressão *in vitro* e estudos sorológicos de MPs para serem utilizados comparativamente neste estudo. A maioria dos trabalhos encontrados, além de serem relativamente antigos, concentram-se em estudos de mutações das MPs para produção de plantas transgênicas (avaliando sua necessidade no movimento célula-a-

célula) (DEOM et al., 1990) e localização celular da proteína comprovando seu envolvimento no aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas para passagem das partículas virais (WOLF et al., 1989; DEOM et al., 1990). Deom et al. (1990) produziram plantas transgênicas de fumo expressando a MP do vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus* – TMV) e demonstraram que a proteína estava associada às membranas celulares de todos os tecidos da planta. Além disso, a quantidade da MP-TMV detectada em folhas maduras foi maior do que em folhas jovens. Este dado coincide com a detecção da MP do CiLV-C por ELISA, onde lesões maduras de laranjeira apresentaram reações mais intensas do que lesões mais novas, reforçando a necessidade de avaliação dos diferentes estágios da doença.

Outra explicação é que a concentração da proteína de movimento presente na célula infectada seja muito baixa. O fato de o CiLV-C não invadir seus hospedeiros sistemicamente leva a crer no envolvimento de mecanismos de inibição da passagem do vírus para o floema, não sendo possível, no entanto, descartar alguma dificuldade no movimento célula-a-célula das partículas. Em estudos paralelos deste mesmo patossistema, Nicolini-Teixeira (2008) procurou quantificar a expressão das ORFs *helicase*, *MP* e *p29* do CiLV-C através da técnica de RT-qPCR, a fim de comparar os níveis de resistência de plantas cítricas com diferentes respostas à doença. As plantas, inoculadas por *B. phoenicis* virulíferos, foram avaliadas em diferentes tempos após a inoculação. Os resultados para a *mp* mostraram que não houve aumento na expressão dessa ORF nos diversos tempos de coleta. A autora ainda sugere um possível envolvimento do mecanismo de silenciamento gênico, o que impediria a detecção dos transcritos desta ORF. Além disso, o que se observou foram picos de aumento e diminuição do CiLV-C, com muita variação tanto no número de partículas virais como na expressão dos genes, não sendo possível observar aumento crescente no número de partículas virais nos diferentes tempos de coleta após a inoculação. Estes resultados demonstram a complexidade dos mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos no patossistema leprose dos citros. Desta forma, mantendo-se esta mesma linha de pensamento, é possível que a quantidade da proteína de movimento expressa pelo CiLV-C conseqüentemente seja muito baixa para ser detectada com facilidade.

Outra hipótese é que o antissoro gerado a partir da proteína de movimento expressa *in vitro* apresente diferenças conformacionais quando comparado à proteína nativa presente na planta infectada pelo CiLV-C sendo, portanto, menos antigênico. Esta idéia é sustentada pelo fato da proteína obtida *in vitro* ter sido extraída de células de *E. coli* através da utilização de uréia, fazendo com que a mesma perdesse sua conformação tridimensional. Desta forma, se os epitopos mais antigênicos forem conformacionais, é possível que a detecção da MP seja sub-ótima já que o antissoro utilizado foi produzido contra a proteína desnaturada. Assim, apesar de termos realizado ensaios de imunolocalização *in situ*, não foi possível a localização da proteína de movimento na planta doente utilizando esta metodologia.

O antissoro produzido contra a proteína helicase avaliado em ELISA não apresentou reação com extrato foliar de lesões lepróticas nem com a proteína helicase pura expressa *in vitro*. Neste caso, os resultados são atribuídos à pouca quantidade de proteína utilizada para produção do antissoro, já que não foi possível a obtenção da proteína pura e quantificada para imunização dos coelhos.

Por outro lado, a validação do antissoro contra a p29 nos rendeu ótimos resultados, revelando ser uma ferramenta útil para a detecção do CiLV-C. Em ELISA, o melhor desempenho do antissoro foi na diluição 1:5.000, onde houve reação positiva para lesões foliares de laranja Pêra em todos os estágios de desenvolvimento da doença (LN, LI e LV) (Figura 35). As outras diluições do antissoro testadas, de 1:1.000 e 1:2.000, também apresentaram reações positivas para todas as amostras, porém, a diluição considerada ideal para a realização do teste neste trabalho foi determinada em função do maior valor obtido na seguinte correlação (eq. 1):

$$\text{Valor} = \frac{\text{Média das leituras da planta doente}}{3 \times (\text{Média das leituras da planta sadia})} \quad (1)$$

Também foi possível observar que tanto as lesões novas quanto as intermediárias apresentaram leituras um pouco maiores do que as lesões maduras, porém, como não houve avaliação estatística destes dados, não é possível afirmar que existe diferença estatística entre elas. Este resultado, no entanto, não exclui a utilização

de lesões mais velhas como amostra na detecção do CiLV-C, uma vez que a reação apresentada foi sempre nitidamente positiva em relação ao controle negativo. Uma especulação para a maior quantidade da proteína em lesões iniciais é que o vírus, após ser depositado no interior da célula, começa imediatamente a sua replicação e, ao mesmo tempo, a expressão de grande quantidade da proteína capsidial para montagem das partículas e infecção de células vizinhas. No entanto, como o patógeno não é capaz de causar infecção sistêmica, à medida que as lesões vão coalescendo, o suprimento energético necessário para a multiplicação viral também vai se exaurindo, fazendo com que haja diminuição do número de partículas e, conseqüentemente, na quantidade de proteína capsidial a ser detectada. Aliada a este processo, o colapso celular causado pela infecção provavelmente faz com que as partículas virais sejam desintegradas prejudicando assim a detecção da proteína capsidial.

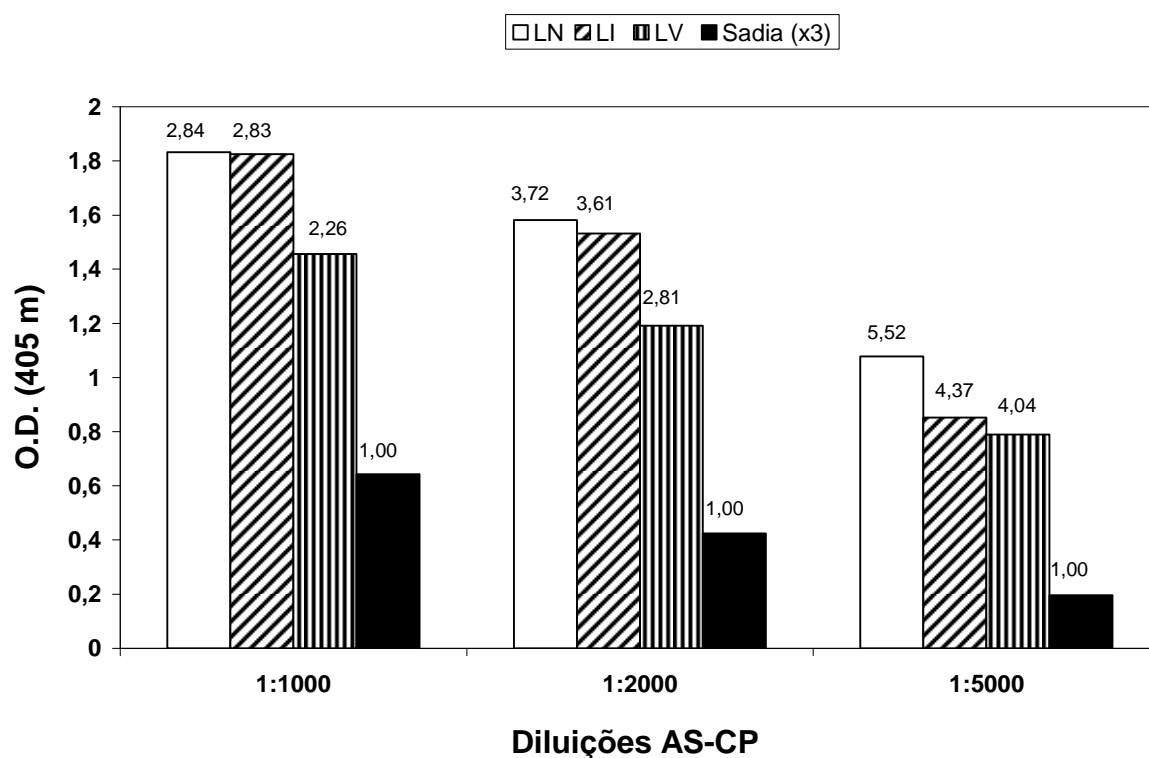


Figura 35 - PTA-ELISA. Avaliação da melhor diluição do antissoro para detecção do CiLV-C após 3 horas de reação. **(LN)**, lesões novas de laranja; **(LI)**, lesões intermediárias de laranja Pêra; **(LV)**, lesões velhas de laranja Pêra; **Sadia (x3)**, planta sadia de laranja Pêra já considerando três vezes a média de leitura. Os valores indicados acima das barras correspondem à razão entre a média das leituras da planta doente e três vezes a média das leituras da planta sadia

Análises posteriores de ELISA utilizando como amostras extratos foliares de plantas infectadas por diferentes tipos de VTBs do tipo citoplasmático como SRSV, HibGSV, LigRSV, BrRSV, PFGSV e SefRSV, provenientes de diferentes localidades, revelaram que o antissoro contra a CP não apresenta relacionamento sorológico com nenhum destes vírus (Figura 36). Além disso, foi possível notar que tangerinas apresentam reação sorológica mais fraca do que laranjas 'Pêra', indicando a maior suscetibilidade das laranjas-doce em relação às tangerinas.

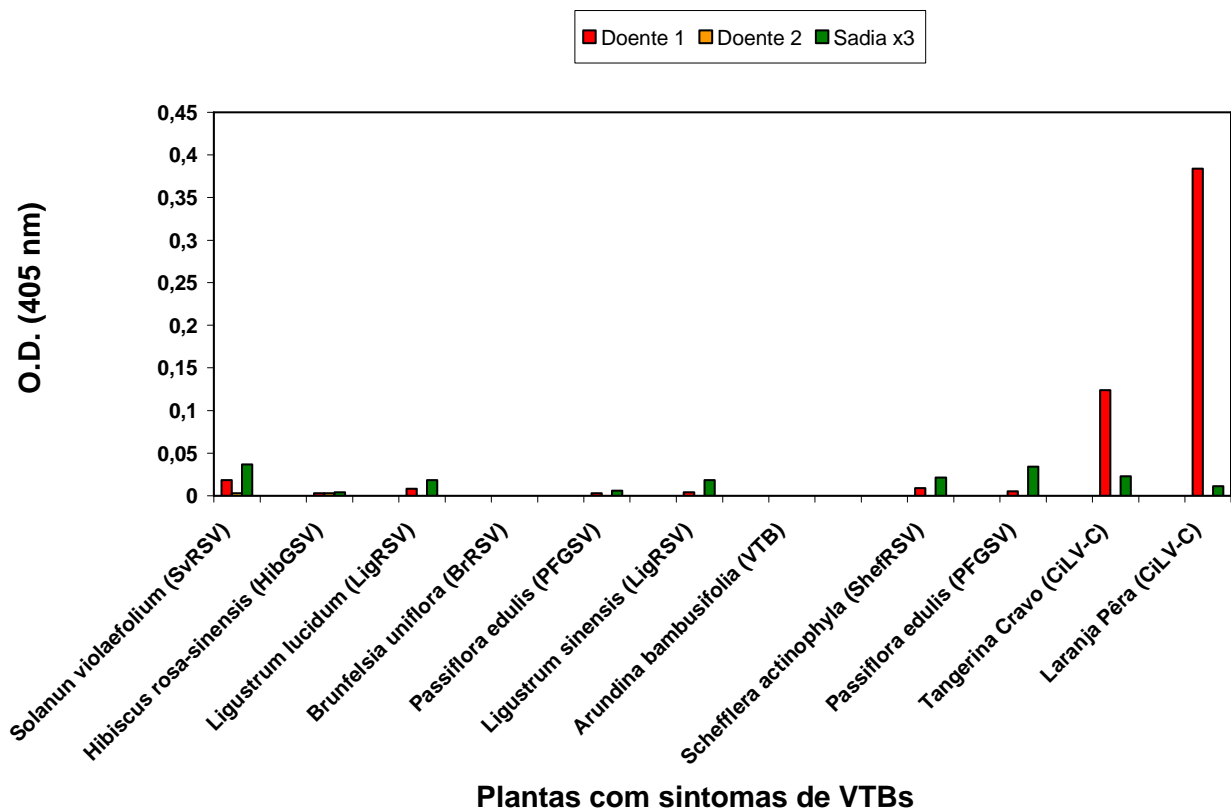


Figura 36 - PTA-ELISA. Avaliação de plantas de outras espécies apresentando sintomas típicos de vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBs) após 40 minutos de reação. **Sadia (x3)**, controle negativo de cada espécie de planta avaliada, considerando três vezes a média de leitura

Em outra investigação por ELISA, foi possível detectar o CiLV-C em amostra de laranja-doce não identificada apresentando lesões típicas de leprose proveniente de Tabasco, México, revelando o alto grau de conservação da possível proteína capsial deste vírus (Figura 37).

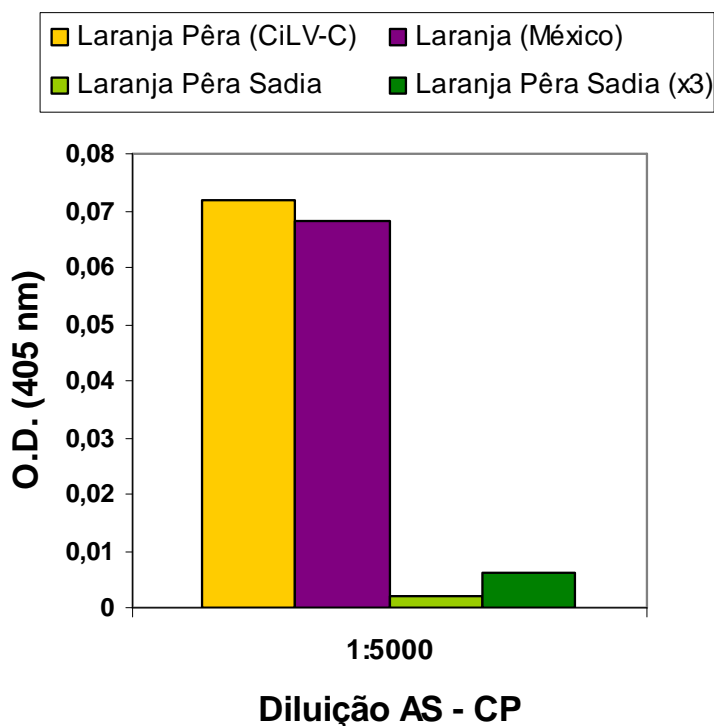


Figura 37 - PTA-ELISA. Avaliação de planta de laranja não identificada proveniente do México, após 40 minutos de reação

Desta forma, a detecção do CiLV-C por ELISA em plantas de laranja Pêra de diferentes origens (Cordeirópolis, Mogi-Mirim, Frutal, Piracicaba e México), aliada à ausência de reação positiva em plantas de outras espécies apresentando sintomas típicos de vírus transmitidos por *Brevipalpus* demonstram que o antissoro contra p29, além de ser bastante específico e eficaz para detecção do CiLV-C, não apresenta reação cruzada com outros VTBs. Adicionalmente, os resultados também apontam para o alto grau de conservação da proteína p29 do CiLV-C, uma vez que sua detecção é possível em laranjeiras infectadas provenientes de regiões diferentes do estado de São Paulo, Minas Gerais (Frutal) e de ao menos um outro país, como a amostra positiva vinda do México

Os resultados obtidos no ELISA foram confirmados por Western Blot, onde foi possível detectar a proteína p29 em todos os estágios de desenvolvimento da doença (Figura 38) utilizando-se o antissoro diluído 1:1.000. No entanto, observou-se que a quantidade da proteína presente em lesões mais novas foi menor do que em lesões



intermediárias e mais velhas. A maior quantidade de proteína foi detectada em lesões intermediárias e depois nas lesões mais maduras. Estes resultados diferem daqueles obtidos no ELISA e, talvez, possam ser explicados porque as amostras utilizadas em cada um, apesar de terem sido padronizadas, não eram provenientes das mesmas plantas.

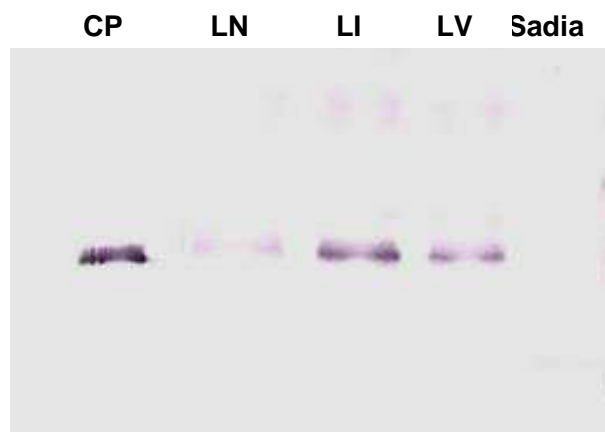


Figura 38 - Western Blot utilizando antissoro contra a p29 diluído 1:1.000. **CP**, proteína p29 pura; **LN**, extrato foliar de lesões novas de laranja Pêra; **LI**, extrato foliar de lesões intermediárias de laranja Pêra; **LV**, extrato foliar de lesões intermediárias de laranja Pêra; **Sadia**, extrato foliar de laranja Pêra sadia. Concentração das amostras 1:7 (folha:tampão)

O Tissue Blotting foi realizado somente com o antissoro contra a proteína p29, pois foi o único que apresentou resultado positivo para todos os testes sorológicos propostos anteriormente. Os resultados mostraram reações nitidamente positivas para amostras de tecidos foliares com lesões lepróticas coletadas de tangerina Cravo (ESALQ), laranja Pêra (IAC) e outra laranja doce de variedade desconhecida (ESALQ). No entanto, a reação apresentada na amostra de folha de laranja Pêra coletada no IAC mostrou-se mais intensa do que as de laranja doce e de tangerina Cravo da ESALQ (Figura 39). As respectivas amostras sadias não apresentaram qualquer reação, demonstrando a eficiência e precisão do teste. Além disso, uma amostra de folha de laranja apresentando sintomas de leprose proveniente de Tabasco (México), também analisada por este método, reagiu positivamente com o antissoro contra a p29 (Figura 40). Os resultados obtidos no teste são os mesmos do PTA-ELISA, onde a intensidade da reação apresentada por amostras de tangerina Cravo coletada na ESALQ foi menor do que as de laranja Pêra. Estes resultados são esperados, uma vez que as tangerinas

apresentam maior nível de resistência à doença (BASTIANEL et al., 2008; FREITAS-ASTÚA et al., 2008b). Além disso, a detecção do CiLV-C na amostra proveniente do México revela a conservação da proteína p29 e a grande especificidade do antissoro.

A somatória de resultados sorológicos positivos obtidos para o antissoro contra a p29 demonstra sua alta qualidade e valida a utilização desta ferramenta para detecção do CiLV-C por ELISA, Western Blot e Tissue Blotting. Além disso, o ELISA e o Tissue Blotting apresentam vantagens sobre os testes moleculares por serem técnicas simples e de baixo custo, podendo ser realizadas em laboratórios com infraestrutura relativamente simples.

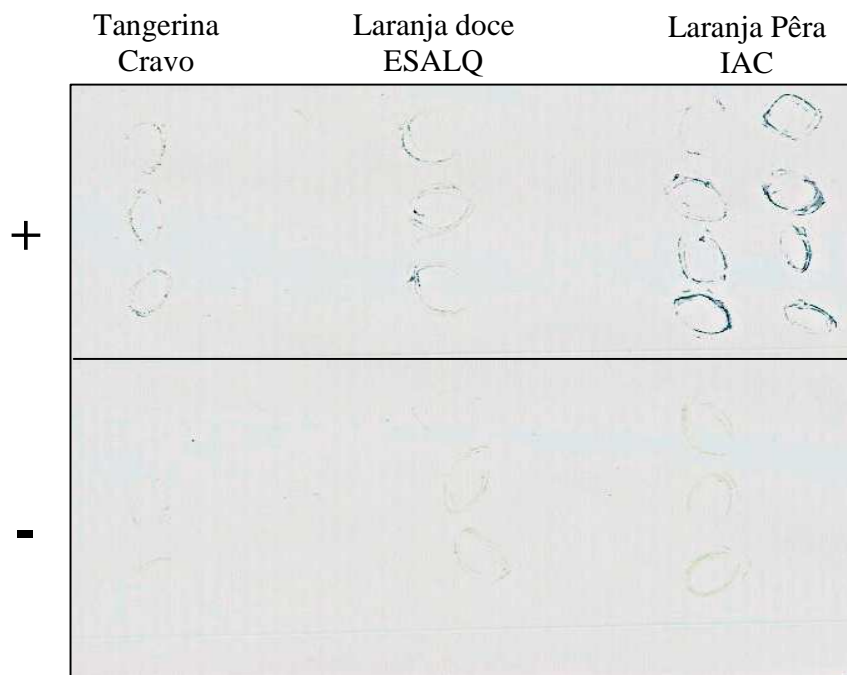


Figura 39 - Tissue Blotting utilizando antissoro contra a p29 diluído 1:1.000. +, Impressão de folhas enroladas e cortadas na região das lesões lepróticas de tangerina Cravo (coletada na ESALQ), laranja doce não identificada (coletada na ESALQ) e laranja Pêra (coletada no IAC); -, Impressão de folhas sadias enroladas de tangerina Cravo e laranja doce (coletadas na ESALQ) e laranja Pêra (coletada no Centro APTA Citros "Sylvio Moreira-IAC")

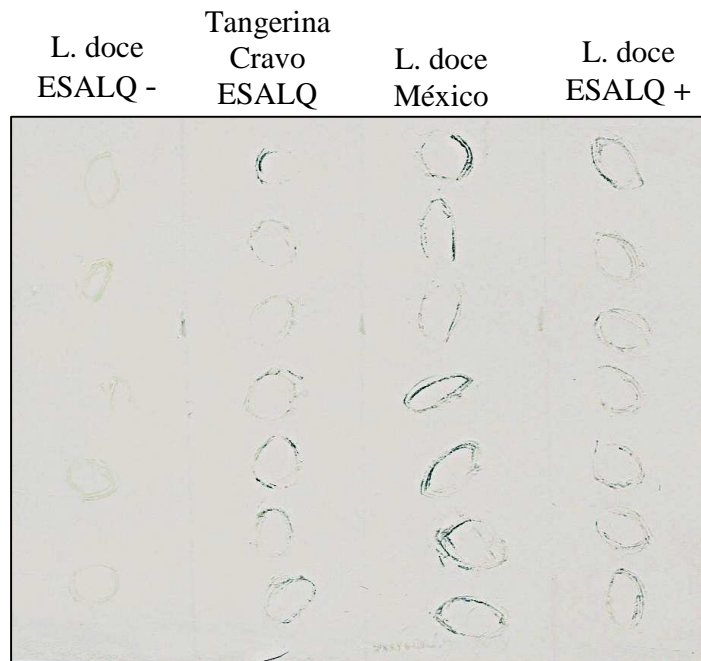


Figura 40 - Tissue Blotting utilizando antissoro contra a p29 diluído 1:1.000. Impressão de folhas enroladas e cortadas na região das lesões lepróticas de: **L.doce ESALQ -**, laranja doce não identificada (ESALQ); **Tangerina Cravo ESALQ**, tangerina Cravo (ESALQ); **L.doce México**, laranja doce não identificada (Tabasco-México) e **L.doce ESALQ +**, laranja doce não identificada (ESALQ)

#### 4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Imunolocalização *in situ*

##### 4.6.1 Em planta

Cortes ultrafinos de lesões lepróticas em diferentes estágios de desenvolvimento da doença foram avaliados em MET e, após a junção das imagens geradas em toda extensão da folha, os resultados mostraram uma maior quantidade de partículas virais e inclusões citoplasmáticas em lesões mais jovens. As lesões velhas apresentaram menor quantidade de partículas virais (Figura 41). Estes resultados são contraditórios quando comparados ao ELISA para detecção da proteína MP, pois neste último a intensidade da reação mostra-se superior em folhas apresentando lesões maduras (Figura 32). Por outro lado, os resultados concordam com o ELISA para detecção da proteína p29, onde a reação também foi maior em lesões novas e intermediárias.

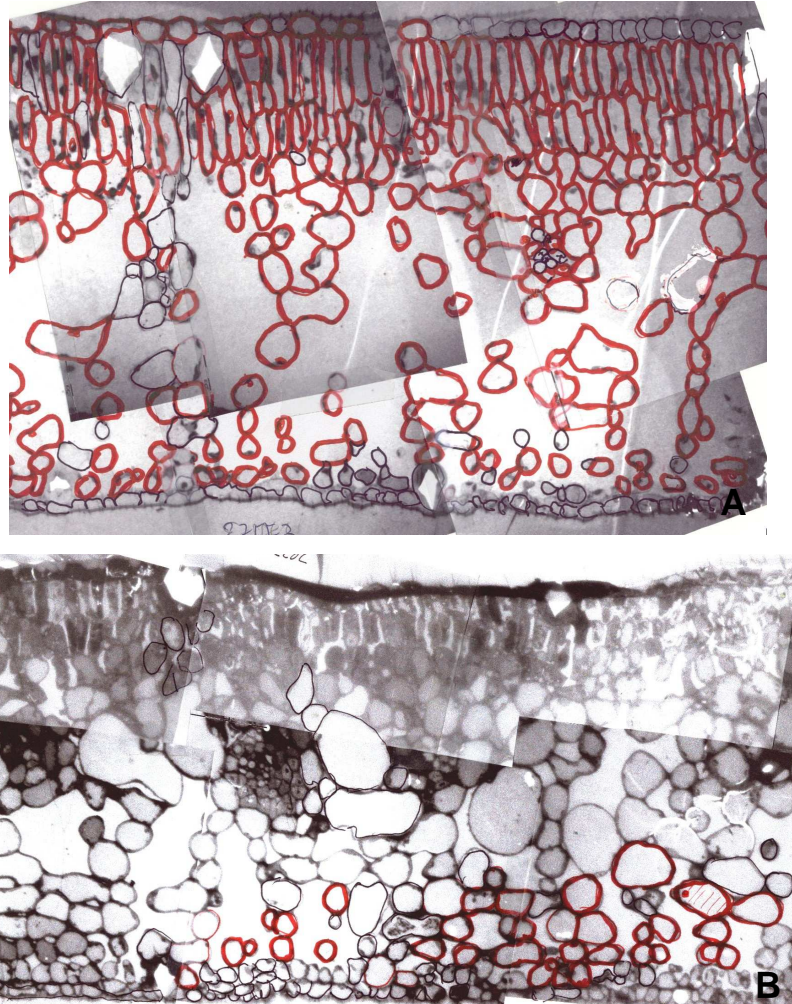


Figura 41 - Seções ultrafinas de lesões lepróticas analisadas em MET. Montagem de várias micrografias demonstrando a detecção de vírions e/ou inclusões no tecido foliar. **A**, lesão jovem; **B**, lesão mais velha. \*As células circuladas em vermelho são aquelas onde estão presentes partículas virais e/ou viroplasma

Utilizando-se o antissoro contra a p29, foi possível observar consistente marcação de partículas baciliformes e viroplasma em todas as secções de lesões foliares causadas pelo CiLV-C, fixadas com formaldeído e emblocadas em resina LR White (Figura 42). A marcação no viroplasma foi bastante intensa enquanto nas partículas baciliformes houve menor marcação. O background apresentado pelas amostras avaliadas foi baixo, revelando a alta especificidade do anticorpo. A especificidade da marcação observada em partículas baciliformes contidas nas

cisternas do retículo endoplasmático e consideradas como possíveis partículas do CiLV-C confirmam claramente a natureza viral destas partículas. Além disso, a intensa marcação no viroplasma eletrôn-denso e vacuolado apontam para um alto conteúdo de proteína p29, reforçando a idéia de que estas estruturas representam o sítio de replicação viral e/ou montagem da partícula. Imagens raras do processo de formação das partículas por “brotação” - material viral [nucleocapsídeo] no citoplasma “empurra” a membrana do retículo endoplasmático [RE] para o seu interior, envolvendo o nucleocapsídeo resultando no acúmulo de vírions no lúmen do RE - observadas próximas ao viroplasma em outro tipo citoplasmático de VTB (KITAJIMA et al., 2003) apoiam esta hipótese (Figura 42 B). Além disso, em algumas lesões novas, no viroplasma adjacente ao vacúolo, aparecem algumas pequenas vesículas contendo material fibrilar acopladas ao tonoplasma dentro do vacúolo, próximas à inclusão (COLARICCIO et al., 1995). Estas vesículas são similares àquelas reportadas por outros vírus como possíveis sítios de replicação viral (FRANCKI et al., 1985). A marcação menos intensa das partículas virais pode ser explicada pelo menor conteúdo da p29 exposta pelas secções, o que reforça a hipótese de que a p29 seja a proteína capsidial do vírus (LOCALI-FABRIS et al., 2006).

Nenhuma marcação foi encontrada em secções de plantas saudas e de plantas infectadas pelo CiLV-N utilizadas como controle negativo. Além disso, secções de lesões foliares causadas por outros tipos citoplasmáticos de VTBs não apresentaram nenhuma marcação específica, mostrando que o antissoro não apresenta reação cruzada com estes vírus e que, aparentemente, a p29 do CiLV-C é bem específica.

Nos experimentos de imunolocalização realizados com secções de lesões foliares de laranja fixadas com formaldeído/ósio e emblocadas em resina epóxi (Spurr), a maioria das amostras avaliadas apresentou viroplasma levemente marcado (Figura 43). A tentativa de exposição dos sítios antigênicos pelo tratamento com periodato de sódio não foi efetiva como esperado; porém, permitiu algum nível de reação (Figuras 43 C a 43 F). Estas amostras infectadas pelo CiLV-C eram provenientes de diferentes origens e, apesar das dificuldades, o antissoro foi capaz de reconhecer a maioria delas no ensaio de imunolocalização. Este resultado pode indicar um pequeno grau de variabilidade da putativa proteína da capa apesar da grande

dispersão geográfica. Além disso, em concordância com resultados obtidos por ELISA, nenhuma amostra de outros tipos citoplasmáticos de VTB reagiu nos experimentos de imunomarcacão. Estes resultados indicam fortemente que estes VTBs são espécies distintas do CiLV-C, e seriam possíveis membros do gênero *Cilevirus*. Estes dados são reforçados pelo fato de que o SvRSV, outro VTB do tipo citoplasmático com parte do genoma conhecida (FERREIRA et al., 2007) e do PFGSV (ANTONIOLI-LUIZON et al., 2008), não são amplificados via RT-PCR utilizando os primers para o CiLV-C e vice-versa (FREITAS-ASTÚA, *dados não publicados*).

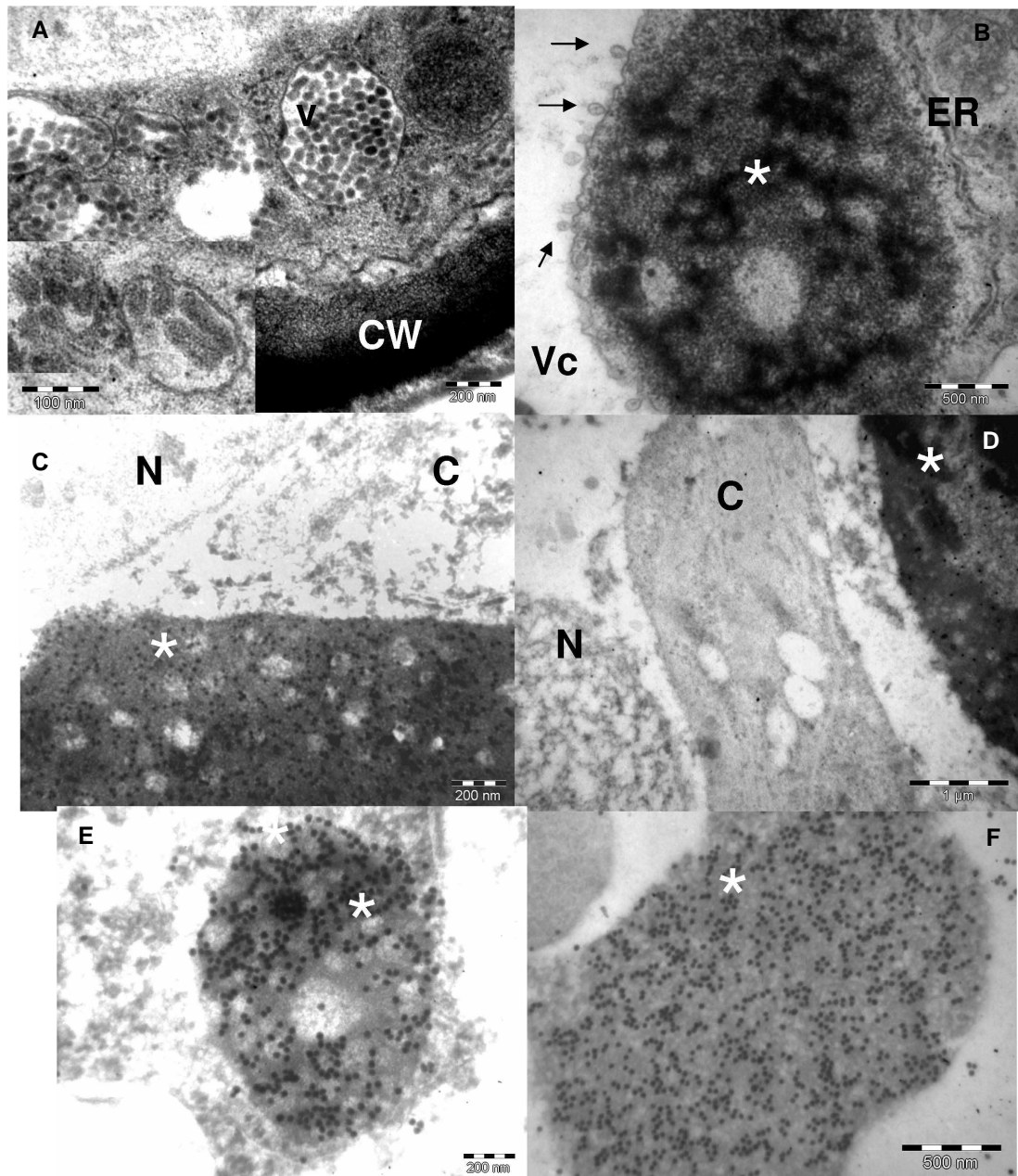


Figura 42 - Micrografias de lesões foliares de laranja causada por infecção do CiLV-C: amostra fixadas com aldeído/ósio e emblocadas em Spurr; **A**, Grupo de presumíveis partículas baciciformes (v) contidas na cisterna do retículo endoplasmático; dentro o detalhe das partículas. **B**. Viroplasma elétron denso vacuolado (\*) no citoplasma adjacente ao vacúolo (Vc). Note grupos de pequenas vesículas ligadas ao tonoplasto dentro do vacúolo, próximas ao viroplasma (setas). CW-parede celular; ER-retículo endoplasmático. **C-F**. Imunolocalização utilizando antissoro policlonal contra a proteína p29: amostras similares às anteriores, porém, fixadas somente com aldeído e emblocadas em LR White. Notar a significativa e consistente marcação por partículas de ouro no viroplasma (\*). Citoplasma adjacente, núcleo (N) e cloroplasto (C) não apresentam marcação. Em algumas amostras as partículas de ouro foram amplificadas com prata

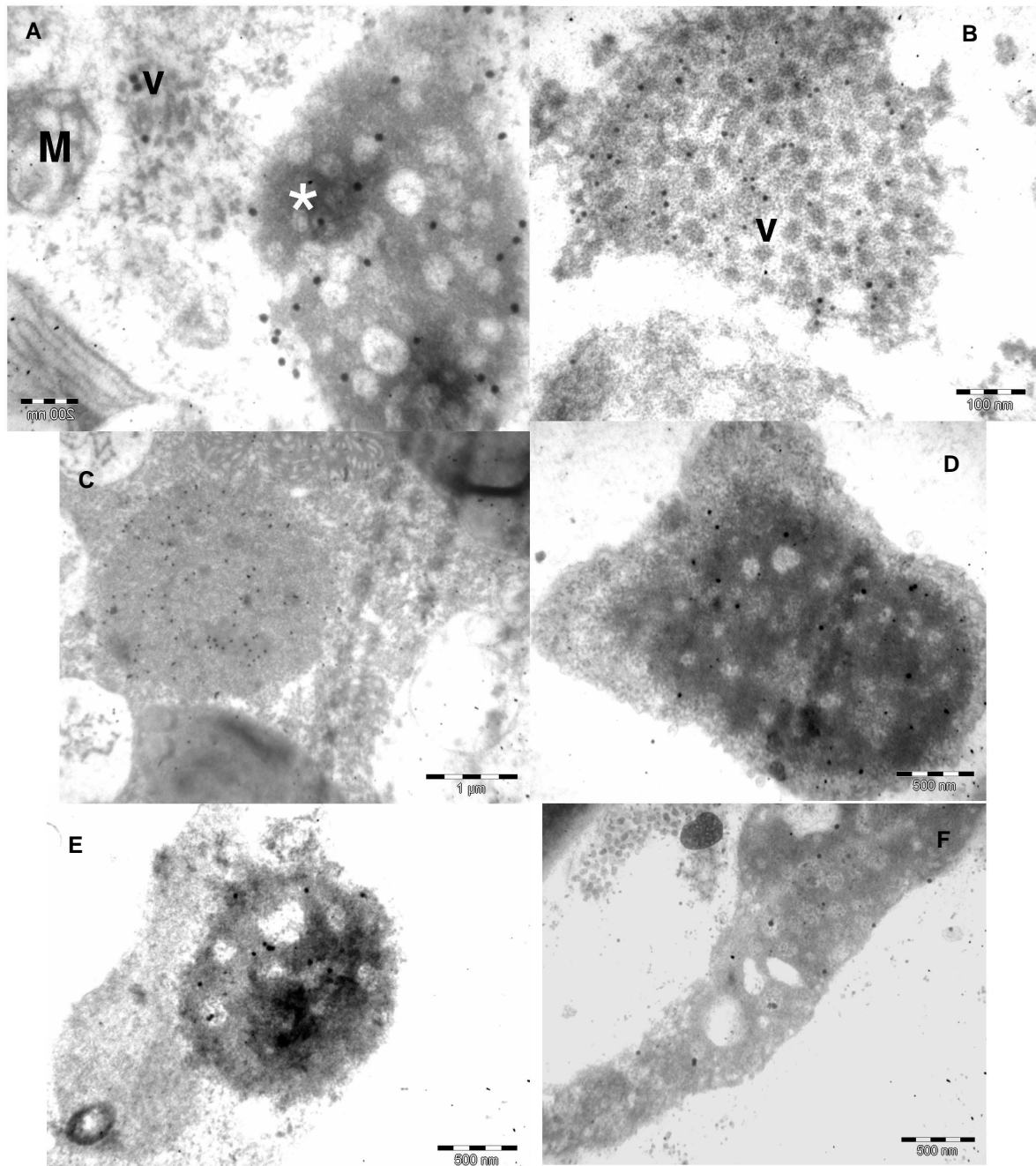


Figura 43 - **A e B.** Imunolocalização *in situ* de partículas baciliformes (v) contidas em cisternas do retículo endoplasmático demonstrando sua natureza viral, (M) mitocôndria. **C-F.** Experimentos de imonolocalização em secções de lesões foliares de laranja infectadas pelo CiLV-C provenientes de diferentes regiões que foram fixadas com aldeído/ósrmio e emblocadas em reina epoxi Spurr. **C-** Cordeirópolis, SP; **D-** Rio Branco, AC; **E-** Maracay, Venezuela; **F-** Santa Cruz, Bolívia. Tentativas de liberação dos sítios antigênicos bloqueados pela fixação do ósmio foram feitas com periodato de sódio. A marcação foi leve, porém, consistente no viroplasma



#### 4.6.2 Ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis*

Além das plantas, amostras de *Brevipalpus* virulíferos também foram possíveis de serem avaliadas devido à implantação da técnica de secção da extremidade terminal do abdômem do ácaro (Figura 44) previamente ao processo de fixação, necessária para que houvesse boa preservação dos tecidos.

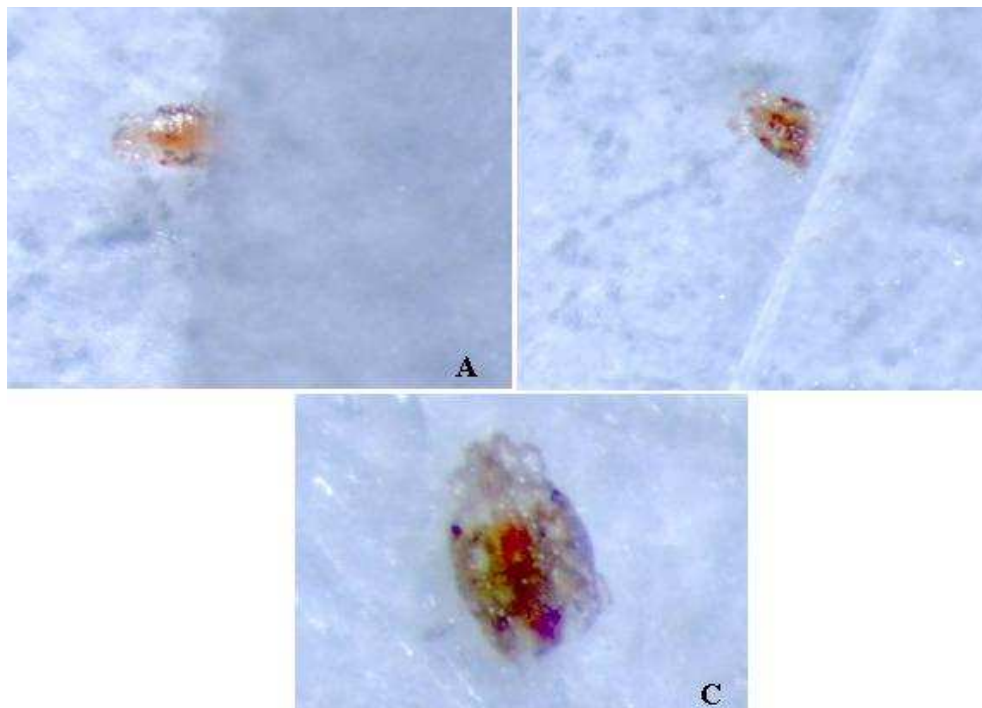


Figura 44 - Técnica de secção dos ácaros antes da etapa de fixação. **A**, Lâmina posicionada na extremidade final do abdômem do ácaro; **B e C**, Ácaro seccionado

Foram examinados por MET cerca de 30 ácaros provenientes de colônias mantidas em plantas infectadas por CiLV-C e 15 ácaros avirulíferos mantidos em frutos de laranja. Em aproximadamente metade dos indivíduos virulíferos foram encontradas partículas envoltas por membranas, baciliformes e com aproximadamente 60-100 nm de comprimento presentes no espaço intercelular de células adjacentes, próximas a expansões do intestino médio (ceco), células da glândula prosomal, músculos e epiderme (Figura 45). Em nenhum momento observou-se a presença destas partículas livres ou contidas em vesículas dentro das células. Além disso, também estavam ausentes em ácaros avirulíferos utilizados como controle negativo. Em visão

bidimensional, as partículas aparecem arranjadas linearmente, percorrendo às vezes, longas distâncias entre células adjacentes. As partículas estavam presentes somente na parte anterior do corpo do ácaro, lateral ou anteriormente aos singânglio nervoso e, em poucas ocasiões, foram vistas dentro do ceco, próximas a parte apical do epitélio. Além disso, eram morfológicamente similares às partículas vistas em tecidos de plantas dentro de cisternas do retículo endoplasmático (COLARICCIO et al., 1995; RODRIGUES et al., 2003) e demonstradas ser de CiLV-C por imunomarcacão (CALEGARIO et al., 2008). As partículas encontradas nos ácaros foram consistentemente marcadas com antissoro contra a putativa proteína capsidial do CiLV-C (LOCALI-FABRIS et al., 2008b), confirmando sua natureza viral (Figura 46 e 47). Nenhuma outra estrutura apareceu marcada nos tecidos do ácaro. Além disso, não foi observado viroplasma eletron denso e vacuolado em nenhum dos ácaros examinados.

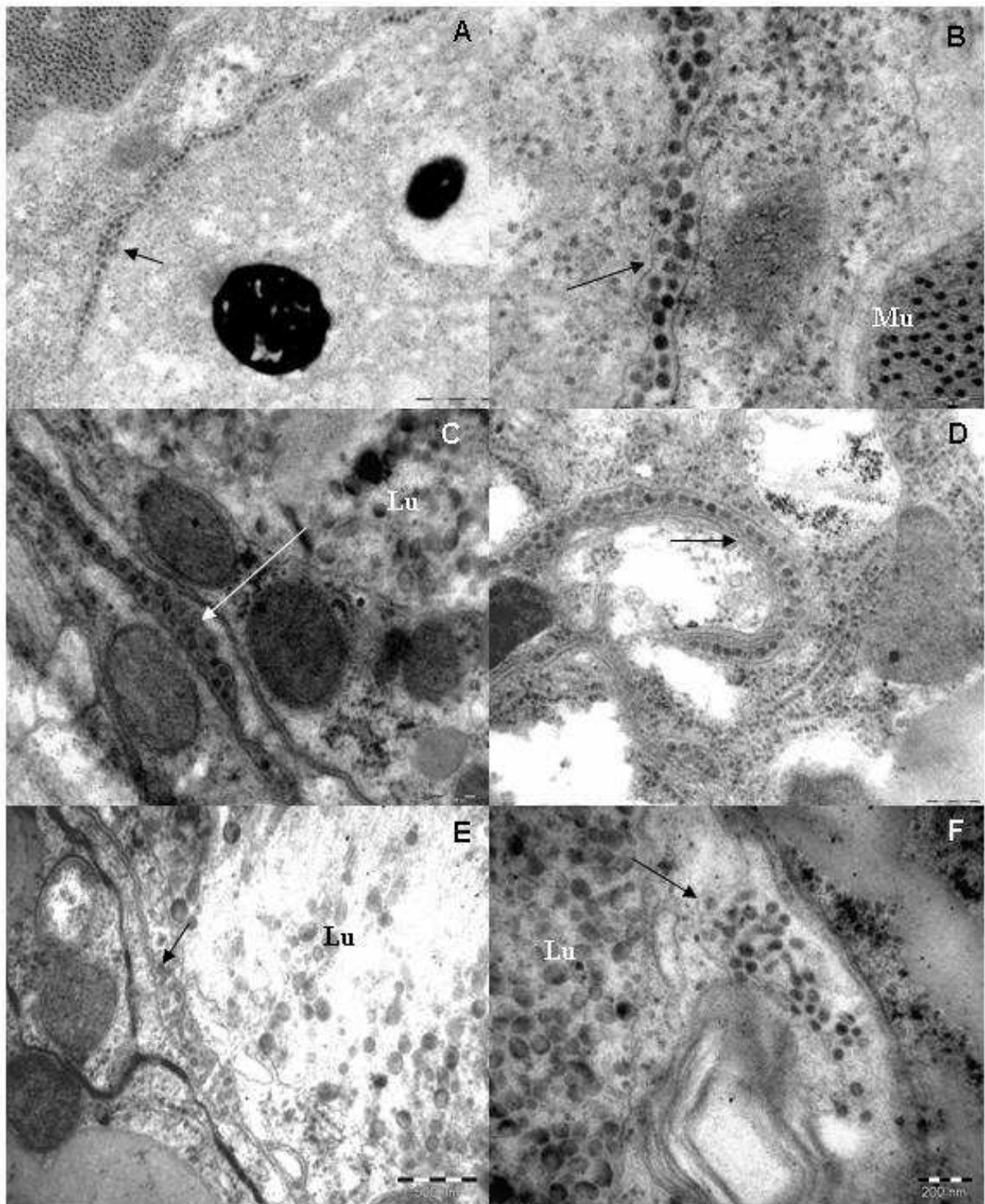


Figura 45 - Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando a ocorrência de presumíveis partículas do vírus da leprose dos citros (setas), tipo citoplasmático (CiLV-C) entre membranas de células (epitélio do intestino médio, músculos, glândulas). **Lu**- lúmen do intestino médio; **Mu**- músculo

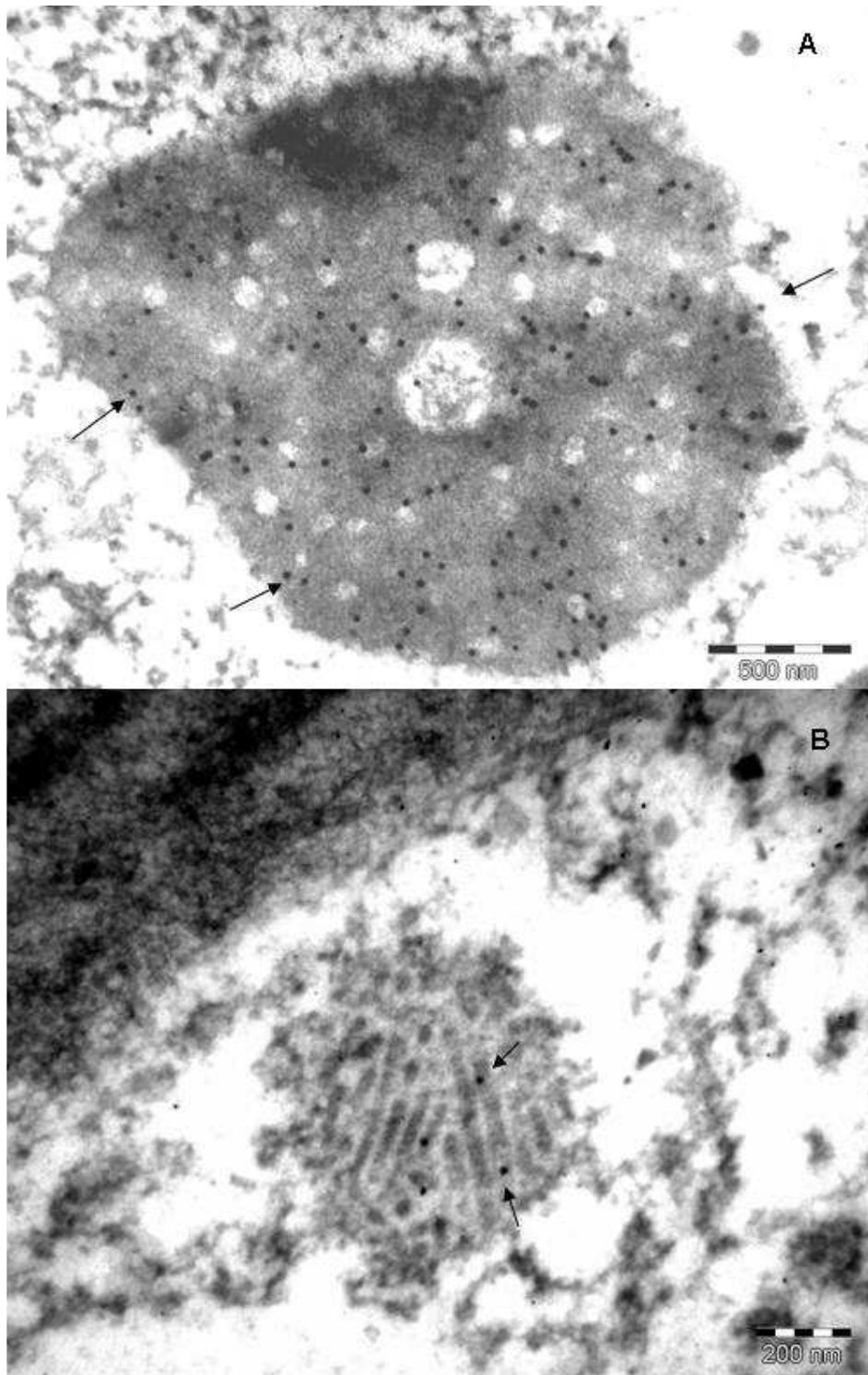


Figura 46 - Ensaio de imunolocalização *in situ* da proteína p29 do CiLV-C, usando anticorpo específico em células da lesão foliar em laranja 'Pêra', causada pelo CiLV-C. Os grãos de ouro coloidal (setas) aparecem consistentemente sobre o viroplasma citoplasmático (A) e presumíveis partículas virais (B), comprovando representarem estas o CiLV-C

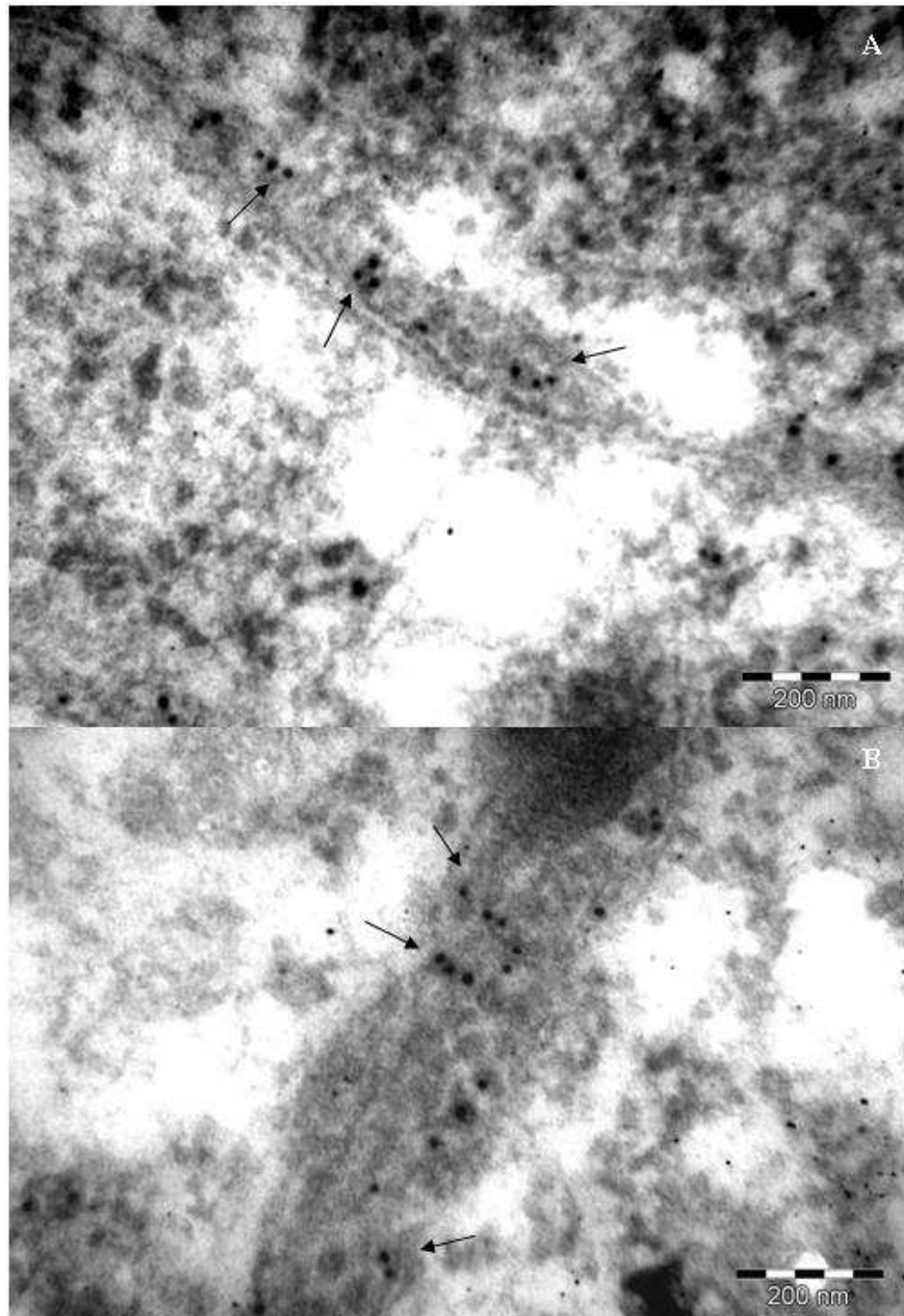


Figura 47 - Presumíveis partículas do CiLV-C encontradas entre membranas de células variadas em tecidos do ácaro *Brevipalpus phoenicis* virulífero, imunomarcadas com ouro coloidal, em experimento de imunolocalização *in situ*, usando anticorpo específico contra a proteína p29 do CiLV-C. O fato demonstra que estas partículas representam as do CiLV-C

#### 4.6.2.1 Discussão sobre o modelo de circulação do CiLV-C no ácaro vetor

Os presumíveis vírions encontrados na metade da população dos ácaros *B. phoenicis* provenientes de colônia mantida em laranja infectada pelo CiLV-C foram morfológicamente similar àquelas encontradas em células de planta infectadas com CiLV-C através de ensaios de imunolocalização *in situ* (CALEGARIO et al., 2008), utilizando o antissoro altamente específico produzido em sistema bacteriano de expressão (LOCALI-FABRIS et al., 2008b). A natureza viral das partículas encontradas nos tecidos dos ácaros também foi demonstrada por ensaios de imunolocalização utilizando o mesmo antissoro. Nos tecidos do ácaro, porém, não foi encontrado viroplasma, frequentemente presente em células de planta. No caso da planta, o viroplasma apresentou intensa marcação com o antissoro contra a putativa proteína capsidial (Figura 42) (CALEGARIO et al., 2008), enfatizando a hipótese de que representa um sítio de acumulação de transcritos virais e produtos da tradução, bem como de sua replicação. Desta forma, a ausência de viroplasma em ácaros sugere que o CiLV-C não se multiplica no vetor, apontando que o relacionamento vírus/vetor seria do tipo circulativo ao invés de circulativo-propagativo. Assim, as possíveis partículas descritas por Rodrigues e colaboradores (1997) parece ser uma interpretação errônea do modelo de organização apresentado por alguns grânulos da gema do ovo em formação. As imagens deste estudo indicavam claramente que presumíveis partículas do CiLV-C estariam presentes dentro de estruturas globulares e, em uma das figuras, aparecendo dentro do ovo. Levando-se em conta estas observações, as mesmas estruturas identificadas anteriormente por Rodrigues e colaboradores foram observadas em algumas secções do presente trabalho, não apresentando marcação pelo antissoro contra a putativa proteína capsidial. Além disso, dados experimentais indicam que o CiLV-C não é transmitido verticalmente (Novelli et al., 2005a), o que demonstra que estas estruturas não representam partículas do CiLV-C.

Para um ácaro virulífero causar infecção do CiLV-C em um hospedeiro suscetível, temos que aceitar que os vírions ingeridos nos tecidos infectados durante alimentação iriam se mover para glândula salivar após serem succionados e passarem pelo esôfago. Da glândula salivar, de alguma forma, os vírions alcançariam o duto salivar onde, junto com a saliva, seriam injetados em células de tecidos saudáveis durante

a fase inicial da alimentação, iniciando assim o processo de infecção (Figura 48 A). Desta forma, formulamos duas hipóteses de mecanismo de transporte dos vírions presentes no lúmen do ceco para os espaços intercelulares. A primeira por endocitose das partículas na parte apical do epitélio do ceco seguida de exocitose na porção basal, liberando os vírions no espaço intercelular de células adjacentes (Figuras 48 B). Como a anatomia interna do ácaro *Brevipalpus* é bastante compacta, fica claro que existe pouco espaço no celoma. Desta forma, a movimentação do ácaro poderia gerar uma leve pressão da hemolinfa entre as células, fazendo com que as partículas presentes no espaço intercelular fossem gradualmente dirigidas para o sistema glandular prosomal (glândulas podocefálicas anterior e posterior). Neste local, os vírions seriam levados para dentro das células glandulares novamente por endocitose e liberadas para o duto salivar junto com a saliva por exocitose.

Na segunda hipótese, em um processo similar à diapedese paracelular para passagem do leucócito através do vaso capilar (CARMAN; SPRINGER, 2004; WEGMAN et al., 2006) (Figuras 49 e 50), as glicoproteínas externas das partículas do CiLV-C se ligariam aos receptores específicos da superfície apical do epitélio do ceco desencadeando uma cascata de reações que desorganizaria o complexo juncional, responsável pela coesão das células (Figura 49 B). Em seguida, as partículas ainda ligadas à membrana seriam conduzidas para o espaço intercelular da parte basal do epitélio passando pela abertura deixada pelo complexo juncional desorganizado. Após a passagem das partículas, o complexo juncional seria recomposto. Como mencionado anteriormente, a movimentação do ácaro poderia carregar as partículas pelo espaço intercelular de células glandulares e, através de um processo similar ao que ocorre no ceco, o complexo juncional entre células glandulares adjacentes poderia se abrir liberando os vírions no duto salivar. O fato da não visualização de presumíveis virions no interior de qualquer tipo de célula do ácaro parece favorecer a segunda possibilidade. Entretanto, as evidências ainda são circunstanciais e requerem trabalhos posteriores para confirmação desta hipótese.

Por outro lado, algumas evidências adicionais favorecem a visão de que o CiLV-C não se replica no vetor *B. phoenicis*. Dados publicados por Chiavegato (1995) mencionam que todos os estágios de desenvolvimento do ácaro são capazes de

transmitir o vírus. Além disso, Kitajima et al. (*dados não publicados*) também confirmaram em experimentos de transmissão que o estágio larval é capaz de transmitir o vírus utilizando feijão comum como planta indicadora. Naquela ocasião, os feijoeiros testados apresentaram sintomas de lesão local necrótica cinco dias após a infestação com ácaros virulíferos. Em informações conhecidas de vírus de plantas transmitidos de maneira circulativa-propagativa, o período de incubação geralmente é de 10 - 14 dias. Seria assim pouco provável que as larvas de poucos dias de vida adquiram o vírus e o transmitam em cinco dias, necessitando que o vírus replique em seus tecidos.

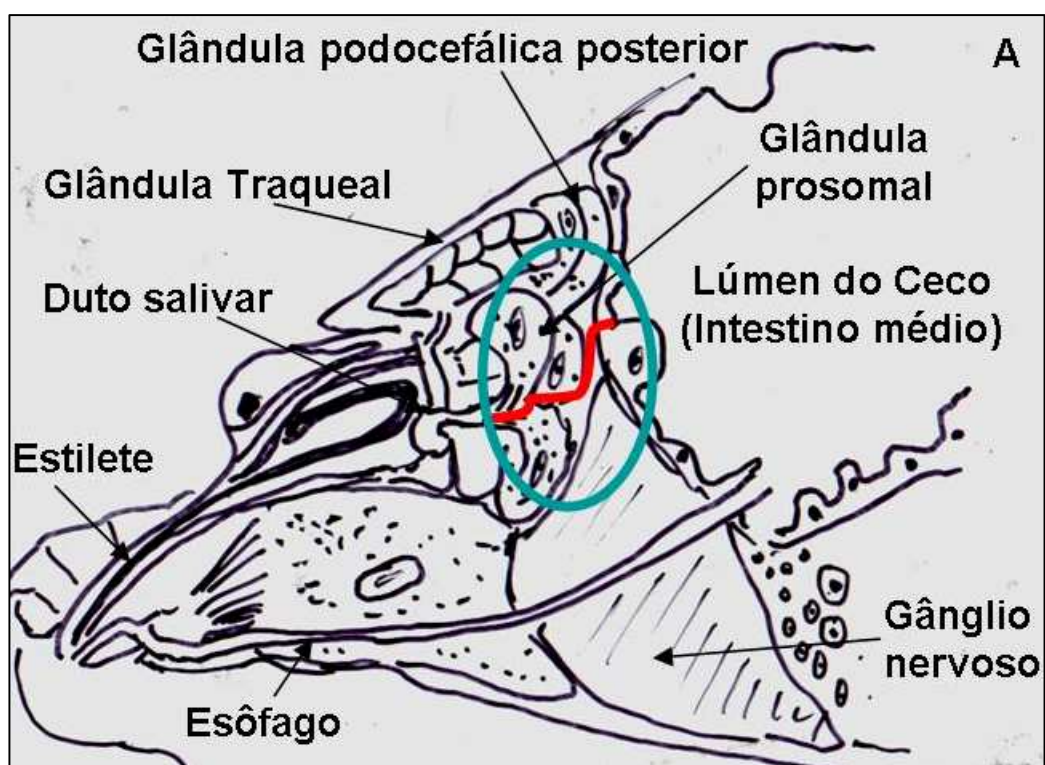
Por outro lado, devemos mencionar também que estudos preliminares realizados por Kitajima (2007) indicam que o tipo nuclear de VTB se multiplica no ácaro vetor. Análises de secções de *B. phoenicis* coletados em plantas de *Clerodendrum x speciosum* e *Malvaviscus arboreus* infectadas pelo CICSV, café (*Coffea arabica*) infectado por CoRSV, laranja infectada por CiLV-N apresentaram os núcleos das células do ceco (intestino médio) e glândula prosomal contendo viroplasma elétron-transparente, além de várias partículas pequenas e em roda de carroça presentes no núcleo e citoplasma. Tal citopatologia é essencialmente similar àquelas observadas em células de plantas infectadas com vírus tipo nuclear. Além disso, não foi possível detectar tais efeitos citopáticos em *B. californicus* coletados de plantas de orquídeas infectadas com OFV e em nenhum outro ácaro encontrado em plantas infectadas por tipos citoplasmáticos de VTB examinado.

Experimento de qRT-PCR realizado com *B. phoenicis* que tiveram acesso a folhas de laranja infectadas pelo CiLV-C mostrou que não houve aumento do título viral após alimentação inicial dos ácaros. Este dado favorece a hipótese de ausência de replicação do vírus no ácaro (FREITAS-ASTÚA et al., 2008a).

Ainda não é conhecido por quanto tempo um ácaro pode manter-se virulífero após a ingestão inicial do CiLV-C. No entanto, deve-se assumir que, baseado em outros casos de relação vírus/vetor do tipo circulativa, caso o ácaro não tenha acesso à fonte de vírus, em um determinado momento, ocorreria a diminuição da eficiência de transmissão já que não ocorre replicação viral no interior do ácaro. Esta situação se diferencia da relação do tipo replicativa, onde um indivíduo após adquirir o vírus torna-



se virulífero por toda a vida. Portanto, esta diferença pode ter um impacto importante na epidemiologia do CiLV-C e nas estratégias de controle.



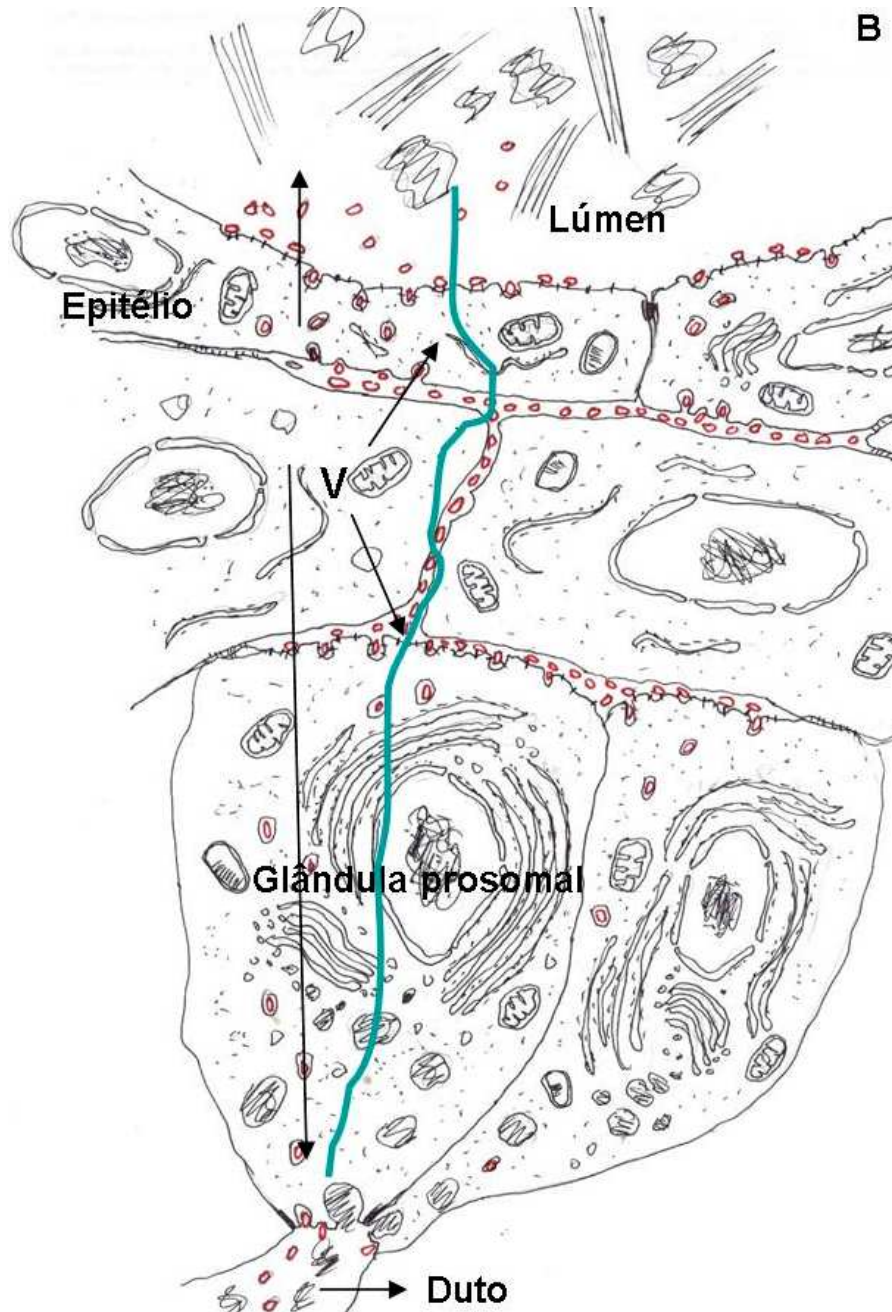


Figura 48 - **A**, “Cartoon” da parte anterior do ácaro *Brevipalpus*, indicando a rota (em vermelho) do CiLV-C do lúmen do ceco ao duto salivar (esquema baseado em Alberti & Coons, 1999). **B**, Esquema indicando a rota intracelular (em azul). Partículas virais seriam endocitadas pela parte apical do epitélio intestinal e exocitadas na parte basal, percorrendo o espaço intercelular até atingir a glândula prosomal. Nesta, seria endocitada na parte basal e exocitada na parte apical, no duto

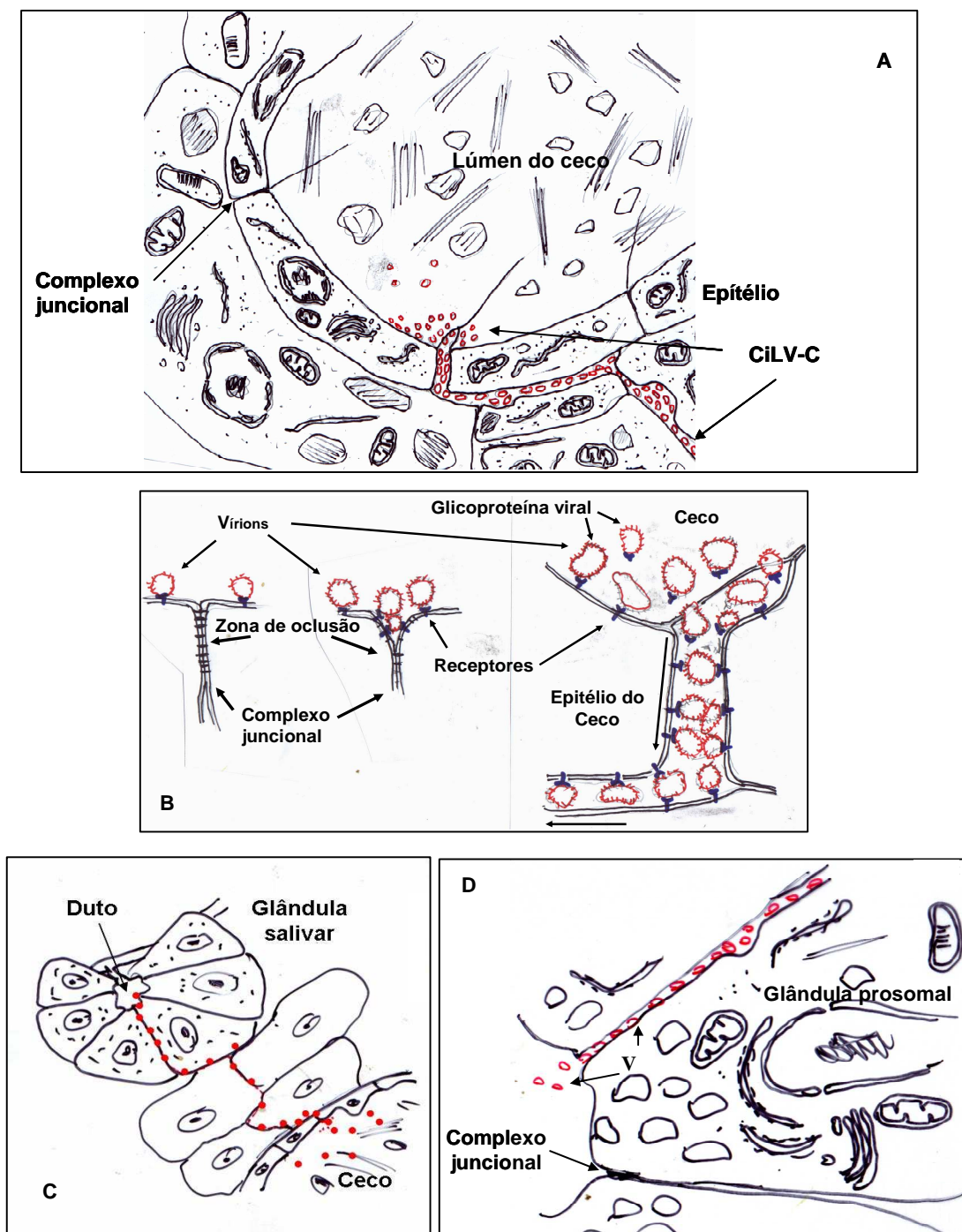


Figura 49 - **A**, Esquema do deslocamento do CiLV-C no ácaro virulífero, com passagem através de epitélios via paracelular, desfazendo o complexo juncional; **B**, As glicoproteínas do vírus seriam reconhecidas por receptores da superfície do epitélio, que induz, em uma reação em cascata, a desorganização do complexo juncional. **C e D**, As partículas se deslocariam entre as membranas, possivelmente pela pressão gerada pelo movimento do ácaro. Na parte apical da glândula prosomal e similares, desorganizaria o complexo juncional, atingindo o ducto salivar

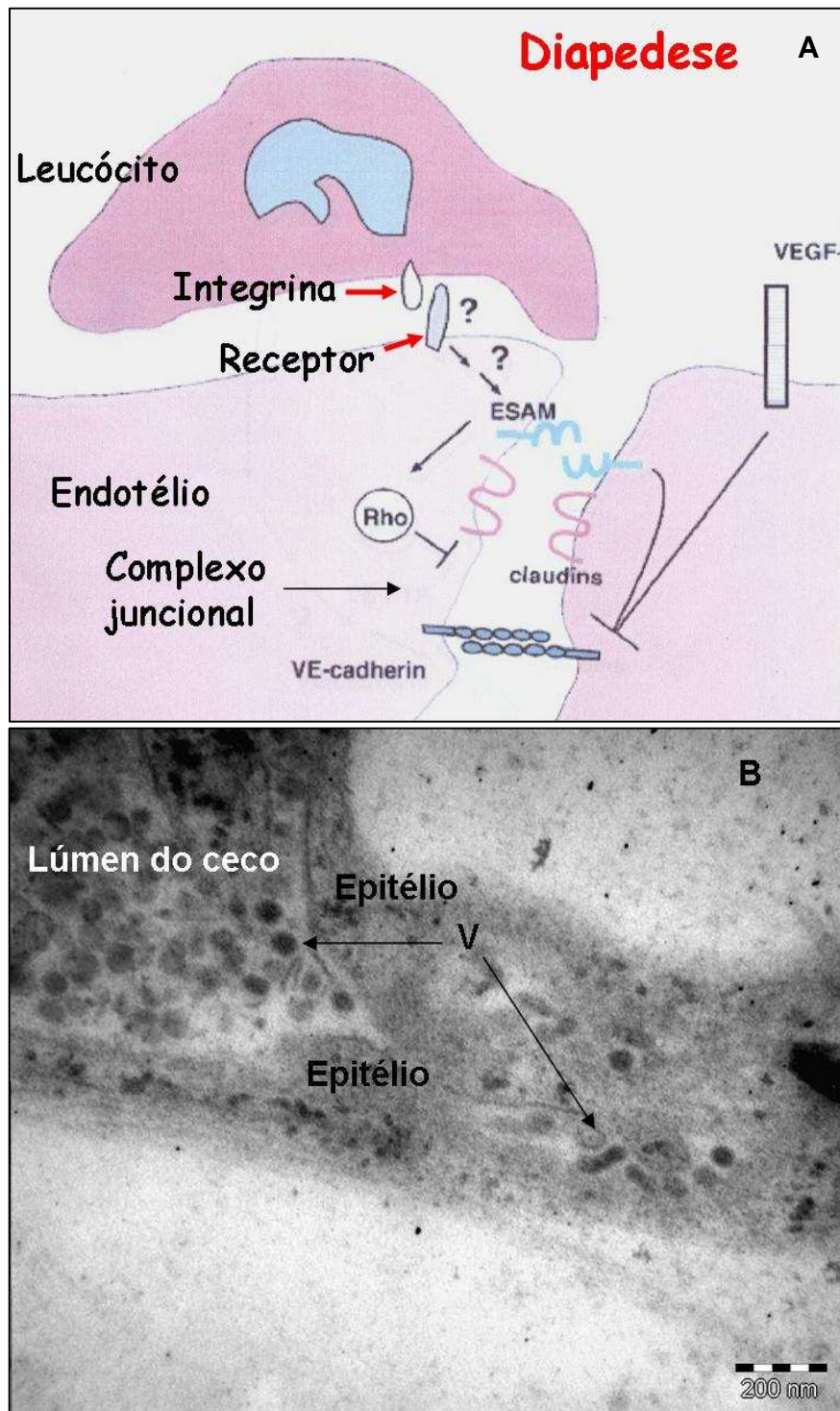


Figura 50 - **A**, Modelo da passagem paracelular de leucócitos através do endotélio de capilares. O contacto do leucócito com a superfície do endotélio através de receptores ativa uma cascata de reações que termina por desorganizar o complexo juncional permitindo a passagem do leucócito. Após a passagem, o complexo é reorganizado. **B**, Micrografia mostrando possível passagem paracelular do CiLV-C

## 5 CONCLUSÕES

- Foi possível promover a expressão *in vitro* em células de *E. coli* das possíveis proteínas helicase e MP do CiLV-C.
- Utilizando-se o antissoro policlonal produzido contra a MP em alta concentração, foi possível detectar a MP do CiLV-C por PTA-ELISA em extratos foliares de lesões lepróticas maduras.
- Não foi possível detectar a MP do CiLV-C por Western Blot e por Imunolocalização *in situ* utilizando-se este mesmo antissoro.
- Foi realizada a validação do antissoro contra p29 do CiLV-C por métodos de PTA-ELISA, Western Blot, Tissue Blot e Imunolocalização *in situ*.
- O antissoro contra p29 mostrou-se altamente específico para detecção do CiLV-C, além de não apresentar reação cruzada com outros VTBs. Sua utilização como ferramenta em testes sorológicos é recomendada.
- A detecção do CiLV-C em laranjeiras provenientes de diferentes origens sugere alto grau de conservação da proteína p29.
- Através de ensaios de imunolocalização *in situ* foi possível demonstrar que as partículas baciliformes e os viroplasmas elétrons densos presentes no interior dos tecidos de laranjeira infectada por CiLV-C são de natureza viral.
- A intensa marcação sobre o viroplasma em tecidos de folhas infectadas pelo CiLV-C sugere ser este o local de replicação do vírus ou de acúmulo de proteína p29.
- Ensaios de imunolocalização *in situ* em tecidos de *B. phoenicis* virulífero revelaram a presença de partículas virais do CiLV-C somente entre células adjacentes.
- Não foi observado a presença de viroplasma nos tecidos do ácaro virulífero, nem mesmo marcação desta estrutura.
- Foi proposto um modelo de circulação do vírus dentro do ácaro sugerindo que o relacionamento do vírus/vetor seja do tipo circulativo.



## Referências

ALBERTI, G.; COONS, L. B. The acari-mites. In: HARRISON, F. W.; FOELIX, R. (Ed). **Microscopic anatomy of invertebrates**. New York: Wiley-Liss, 1999. p. 515-1265.

ANDERSEN, K.; JOHANSEN, I.E. A single conserved amino acid in the coat protein gene of Pea seed-born mosaic *potyvirus* modulates the ability of the virus to move systematically in *Chenopodium quinoa*. **Virology**, New York, v. 241, p. 304-311, 1998.

ANTONIOLI-LUIZON, R.; FREITAS-ASTÚA, J.; LOCALI-FABRIS, E.C.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Detecção do vírus da pinta verde do maracujazeiro Passin fruit green spot virus - (PFGSV) através de RT-PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. **Anais eletrônicos...** Salvador: [s.n.], 2008. Disponível em: < <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs/23964.pdf> >. Acesso em: 22 mar. 2009.

ARRIVABEN, F.; FREITAS-ASTÚA, J.; NOVELLI, V.M.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Avaliação da transmissão do vírus da leprose dos citros por populações de *Brevipalpus phoenicis* provenientes de diferentes plantas hospedeiras. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 80, 2007. Suplemento.

ATREYA, P.L.; ATREYA, C.D.; PIRONE, T.P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of plant virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 7887-7891, 1991.

ATREYA, P.L.; LOPEZ-MOYA, J.J; CHU, M.H.; ATREYA, C.D.; PIRONE, T.P. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. **Journal of General Virology**, London, v. 76, p. 265-270, 1995.

BARBIERI, M.R.; CARVALHO, M.G.; ZAMBOLIM, E.M.; ZERBINI, F.M. Expressão em *Escherichia coli* da proteína capsidial do *Watermelon mosaic virus* e produção de anti-soro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 215-219, 2004.

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 211-220, 2006.

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; NICOLINI, F.; SEGATTI, N.; NOVELLI, V.M.; RODRIGUES, V.; MEDINA, C.L.; MACHADO, M.A. Response of mandarin cultivars and hybrids to Citrus leprosis virus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 90, p. 305-310, 2008.

BITANCOURT, A.A. A leprose dos citros. **O Biológico**, São Paulo, v. 6, p. 39-45, 1940.

\_\_\_\_\_. Estudos sobre a leprose dos citros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 22, p. 161-231, 1955.

CALEGARIO, R.F.; KITAJIMA, E.W.; LOCALI-FABRIS, E.C.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-ASTÚA, J.; STACH-MACHADO, D.R.; CASERTA, R.; MACHADO, M.A. *In situ* immunocytochemistry of citrus leaves infected with Citrus leprosis virus cytoplasmatic type (CiLV-C). **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, p. S:288, 2008. Suplemento.

CARMAN, C.V.; SPRINGER, T.A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelia cells and between them. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 167, p. 377-388, 2004.

ÇEVİK, B.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. In Vivo and in vitro expression analysis of RNA-dependent RNA polymerase of *Citrus tristeza virus*. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 315-321, 2008.

CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V.; CHIAVEGATO, L.G. Effectiveness of the different life cycle stages of *Brevipalpus phoenicis* Geijskes in leprosis transmission. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., 1983, Riverside. **Proceedings...**, Riverside: [s.n.], 1983. p. 211-214.

CHEN, M.H.; SHENG, G.H.; HANDA, A.K.; CITOVSKY, V. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. **The European Molecular Biology Organization Journal**, Heidelberg, v. 19, n. 5, p. 913-920, 2000.

CHIAVEGATO, L.G. Transmissão da leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. In: OLIVEIRA, C.A.L.; DONADIO, L.C. (Ed.). **Leprose dos citros**. Jaboticabal: Funep, 1995. p. 49-56.



CHIAVEGATO, L.G.; MISCHAN, M.M. Comportamento do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em frutos de diferentes variedades cítricas. **Científica**, Jaboticabal, v. 15, n. 1/2, p. 17-22, 1987.

CHIGIRA, A.; MIURA, K. Detection of "Candidatus Cardinium" bacteria from the haploid host *Brevipalpus californicus* (Acari: Tenuipalpidae) and effects on the host. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 37, p. 107-116, 2005.

CHILDERS, C.C.; FRENCH, J.V.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis*, *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1/3, p. 5-28, 2003a.

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V.; WELBOURN, W.C. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 29-105, 2003b.

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V.; DERRICK, K.S.; ACHOR, D.S.; FRENCH, J.V.; WELBOURN, W.C.; OCHOA, R.; KITAJIMA, E.W. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 181-202, 2003c.

CHOUDHARI, K.G.; MALI, V.R. Leprosis disease and its role in citrus dieback. **Science and Culture**, Calcutá, v. 44, p. 166, 1978.

CITOVSKY, V.; ZAMBRYSKI, P. Transport of nucleic acids through membrane channels: Snaking through small holes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 47, p. 167-197, 1993.

COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; BOCCARDO, G.; CHAGAS, C.M.; D'AQUILIO, M.; ROSSETTI, V. Preliminary purification and double stranded RNA analysis of citrus leprosis virus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., 2000, Orlando. **Proceedings...** Riverside: [s.n.], 2000. p. 159-163.

COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; CHAGAS, C.M.; GALLETI, S.R.; ROSSETTI, V.; KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 208-213, 1995.

COLINET, D.; KUMMERT, J.; LEPOIVRE, P. The complete nucleotide sequences of the coat protein cistron and the 3' non-coding region of a newly-identified potyvirus infecting sweetpotato, as compared to those of *Sweetpotato feathery mottle virus*. **Archives of Virology**, New York, v. 139, p. 327-336, 1994.

CORDIN, O.; BANROQUES, J.; TANNER, N.K.; LINDER, P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. **Gene**, Amsterdam, v. 367, p. 17-37, 2006.

DEOM, C.M.; OLIVER, M.J.; BEACHY, R.N. The 30-Kilodalton gene product of *Tobacco mosaic virus* potentiates virus movement. **Science**, New York, v. 237, p. 389-394, 1987.

DEOM, C.M.; SCHUBERT, K.R.; WOLF, S.; HOLT, C.A.; LUCAS, W.J.; BEACHY, R.N. Molecular characterization and biological function of the movement protein of *Tobacco mosaic virus* in transgenic plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 3284-3288, 1990.

DOI, Y.; ARAI, K.; YORA, K. Ultrastructure of bacilliform virus found in *Euonymus japonicum* with mosaic and *Cymbidium* with ringspot. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 35, p. 388, 1969.

DOI, Y.; CHANG, M.U.; YORA, K. Orchid fleck virus. **Descriptions of Plant Viruses**, CMI/AAB, Kew, n. 183, p.1-3, 1977.

DOLJA, V.V.; HALDEMAN, R.; ROBERTSON, N.L.; DOUGHERTY, W.G.; CARRINGTON, J.C. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of *Tobacco etch potyvirus* in plant. **The European Molecular Biology Organization Journal**, Heidelberg, v. 13, p. 1482-1491, 1994.

DOLJA, V.V.; HALDEMAN-CAHILL, R.; MOTGOMERY, A.E.; VANDEBOSCH, K.A.; CARRINGTON, J.C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long movement of *Tobacco etch potyvirus*. **Virology**, New York, v. 206, p. 1007-1016, 1995.

DOMINGUES, F.S.; BERNAL, A.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. First report of Citrus leprosis virus in Panama. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 228. 2001.

FAWCETT, H.S. Report of assistant plant pathologist. **Florida Agricultural Experimental Station Annual**, Gainesville, FA, 1xiv, 1907.

FAWCETT, H.S. **Citrus diseases and their control**, 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1936. Não paginado.

FERNÁNDEZ, A.; LAIN, S.; GARCIA, J.A. RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, p. 1327-1332, 1995.

FERREIRA, P.T.O.; LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; GOMES, R.T.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Caracterização de um vírus baciliforme isolado de *Solanum violaefolium* transmitido pelo ácaro *Brevipalpus obovatus* (Acari: Tenuipalpidae). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 264-269, 2007.

FRANCKI, R.I.B.; MILNE, R.G.; HATTA, T. **Atlas of Plant Viruses**. Boca Raton: CRC Press, p.73, 2 v. ,1985.

FREITAS-ASTÚA, J.; NICOLINI, F.; BASTIANEL, M.; KITAJIMA, E.W.. Interações entre o vírus da leprose dos citros e seu vetor *Brevipalpus phoenicis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. S128-130, 2008a. Supplement.

FREITAS-ASTÚA, J.; FADEL, A.L.; BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.M.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; MACHADO, M.A. Resposta diferencial de espécies de híbridos de citros à leprose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 809-814, 2008b.

FREITAS-ASTUA, J.; LOCALI, E.C.; ANTONIOLI, R.; RODRIGUES, V.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M. A. Detection of citrus leprosis virus in citrus stems, fruits and the mite vector. **Virus Review & Research**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 196, 2003. Supplement.

FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; LOCALI, E.C.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Further evidence to support that Citrus leprosis virus-cytoplasmic and nuclear types are different viruses. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 45., 2005, Caribbean Division. **Proceedings...** San Jose: APS, 2005. p. 93.

JIN, L.; PETERSON, D.L. Expression, Isolation, and Characterization of the Hepatitis C Virus ATPase/RNA Helicase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 323, p. 47-53, 1995.

KASTEEL, D. **Structure, morphogenesis and function of tubular structures induced by Cowpea mosaic virus**. 1999. 71 p. Thesis (Doctor in Virology) – Wageningen University, Wageningen, 1999.

FUNDECITRUS. Disponível em: <[www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)>. Acesso em 15 jan. 2009.

GROOT, T.V.M.; BREEUWER, J.A.J. *Cardinium* symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 39, n. 3-4, p. 257-271, 2006.

GROOT, T.V.M.; FREITAS-ASTÚA, J; KITAJIMA, E.W. *Brevipalpus phoenicis* transmits citrus leprosis virus cytoplasmatic type (CiLV-C) to common bean *Phaseolus vulgaris* under experimental conditions. **Virus Review & Research**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 67-68, 2006.

HALDEMAN-CAHILL, R.; DAROS, J.A.; CARRINGTON, J.C. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the *Tobacco etch virus* genome. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, p. 4072-4079, 1998.

HARAMOTO, F.H. Biology and control of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acarina: Tenuipalpidae). **Hawaii Agricultural Experimental Station Technical Bulletin**, Honolulu, v. 68, p. 1-63, 1969.

HELLE, W.; BOLLAND, H.R. Artificial introduction of males in a thelytokous mite species by means of X-rays. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 15, p. 395-396, 1972.

HILLS, G.J.; PLASKITT, K.A.; YOUNG, N.D.; DUNIGAN, D.D.; WATTS, J.W.; WILSON, T.M.A.; ZAITLIN, M. Immunogold localization of the intracellular sites of structural and nonstructural *Tobacco mosaic virus* proteins. **Virology**, New York, v. 161, p. 488-496, 1987.

HULL, R. **Matthew's plant virology**. 4<sup>th</sup> ed. London: Academic Press, 2002, 1001 p.

KADARÉ, G.; HAENNI, A.L. Virus-encoded RNA helicases (minireview). **Journal of Virology**, Washington, v. 71, n. 4, p. 2583-2590, 1997.

KITAJIMA, E.W. Electron microscopic evidence that nuclear type of *Brevipalpus* transmitted viruses multiplies in the mite vector. In. CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROSCOPIA E MICROANÁLISE 21., 2007, Búzios. **Resumos...** p. 1-2.

KITAJIMA, E.W.; BLUMENSCHNEIN, A.; COSTA, A.S. Rodlike particles associated with ringspot symptoms in several orchid species in Brazil. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 81, p. 280-284, 1974a.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: Cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 135-160, 2003.

KITAJIMA, E.W.; FERREIRA, P.T.O.; FREITAS-ASTUA, J.; MACHADO, M. Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 68, 2004. Suplemento.

KITAJIMA, E.W.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S.; YUKI, V.A. Short rod-like particles associated with citrus leprosis. **Virology**, New York, v. 50, p. 254-258, 1972.

KITAJIMA, E.W.; NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M.; MORAES, G.J. Short rhabdovirus-like particles and caulimovirus in *Hibiscus rosa-sinensis* with green spot. Scandem, Bergen, v.99, p. 63-64, 1999a.

KITAJIMA, E.W.; ROSILO, M.A.; PORTILLO, M.M.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Microscopia eletrônica de tecidos foliares de laranjeiras infectadas pela lepra explosiva da Argentina. **Fitopatologia**, Lima, v. 9, p. 55, 1974b.

KITAJIMA, E.W.; GROOT, T.V.M.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ALBERTI, G.; MORAES, G.J. *In situ* observation of the *Cardinium* symbionts of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) by electron microscopy. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 42, p. 263-271, 2007.

KITAJIMA, E.W.; CALEGARIO, R.F.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; FRANCISCHINI, F.J.B. *In situ* detection of CiLV-C in the mite vector *Brevipalpus phoenicis*, evidence for a circulative type of virus/vector relationship and model for a virus circulation in the mite. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, p. S289, 2008. Suplemento.

KITAJIMA, E.W.; PEDRAZZOLI, D.S.; NOVAES, Q.S.; GIORIA, R.; REZENDE, J.A.M.; MORAES, G.J.; RODRIGUES, J.C.V. Ivy green spot and *Schefflera* ringspot: two additional cases of plant diseases caused by citrus leprosis type virus. **Virus Review and Research**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 148-149, 1999b.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.C.V.; CHIAVEGATO, L.G.; PIZA JR. C.T.; MOROZINI, W. Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 555-559, 1997.

KNORR, L.C. Etiological association of a *Brevipalpus* mite with Florida scaly bark of citrus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, p. 15, 1950.

\_\_\_\_\_. Studies on the etiology of leprosis in citrus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4., Gainesville, 1968. **Proceedings...**: Gainesville: University of Florida Press, 1968. v. 4, p. 332-341.

KONDO, H.; MAEDA, T.; TAMADA, T. Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1/3, p. 215-223, 2003.

KONDO, H.; MAEDA, T.; SHIRAKO, Y.; TAMADA, T. Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 2413-2421, 2006.

KONDO, H.; MAEDA, T.; TAMADA, T.; SHIRAKO, Y. The genome structure of orchid fleck virus shows to be a unique bipartite genome virus that resembles rhabdoviruses. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY 7., 1998, Edinburgh. **Proceedings...**Edinburgh: BSP, 1998. 1 CD-ROM.

LAL, L. Biology of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Tenuipalpidae: Acarina). **Acarologia**, Paris, v. 20, p. 97-101, 1978.

LENT, J. van; WELLINK, J.; GOLDBACH, R. Evidence for the involvement of the 58K and 48K proteins in the intracellular movement of *Cowpea mosaic virus*. **Journal of General Virology**, London, v. 71, p. 219-223, 1990.

LEÓN, M.G.; FREITAS-ASTÚA, J.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W. Natural Infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus Cytoplasmic Type (CiLV-C) in Colômbia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 9, p. 1364, 2008.

LOCALI, E.C. **Sequenciamento de regiões genômicas do vírus da leprose dos citros**. 2002. 87 p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) - Universidade Instituto de Biociências de Botucatu, Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2002.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Confirmação da presença de dsRNAs associados a Citrus leprosis virus (CiLV) e Orchid fleck virus (OFV). In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27, 2003, Araras. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 20, n. 1, p. S98-100, 2003a. Suplemento.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; MÜLLER, G.W.; NUNES, W.M.C.; NUNES, M.J.C.; THEODORO, G.; ANTONIOLI, R.; SOUZA, A.A.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Halótipos do vírus da leprose dos citros identificados nos estados do sul do Brasil através de SSCP do gene da proteína de movimento e replicase. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 37, 2004, Gramado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília: [s.n.], 2004, v. 29, p. S98. Suplemento.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; MACHADO, M.A. Citrus leprosis virus C (CiLV-C): Membro-tipo de um novo gênero de vírus de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 16, p. 185-206, 2008a.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A.A. de; TAKITA, M.A.; ASTUA-MONGE, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Development of molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 1317-1321, 2003b.

LOCALI-FABRIS, E.C.; STACH-MACHADO, D.R.; CASERTA, R.; FREITAS-ASTÚA, J.; CALEGARIO, R.F.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. *In vitro* expression and production of antiserum to the capsid protein (P29) of Citrus leprosis virus-C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41, 2008, Belo Horizonte. Belo Horizonte: 2008b. 1 CD-ROM.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A.A. de; TAKITA, M.A.; ASTUA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M.L.P.; MACHADO, M.A.; KISHI, L. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 2721-2729, 2006.

LUCAS, W.J. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. **Virology**, New York, v. 344, p. 169-184, 2006.

MAHAJA, S.; DOLJA, V.V.; CARRINGTON, J.C. Roles of the sequence encoding *Tobacco etch virus* capsid protein in genome amplification: Requirements for the translation process and a cis-active element. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, p. 4370-4379, 1996.

MARTÍNEZ-ALONSO, M.; GONZÁLES-MONTABÁN, N.; GARCÍA-FRUITOS, E.; VILLAVARDE, A. Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies. **Microbial Cell Factories**, London, v. 8, p. 4, 2009.

MAUNSBACH, A.B.; AFZELIUS, B.A. **Biomedical electron microscopy**: illustrated methods and interpretations. San Diego: Academic Press, 1999. 548 p.

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.; RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: JUNIOR, D.M.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; JUNIOR, J.P. (Ed). **Citros**. Cordeirópolis: Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005. p. 569-596.

MURAYAMA, D.; AGRAWAL, H.O.; INOUE, T.; KIMURA, I.; SHIKATA, E.; TOMURA, K.; TUTSUCHIZAKI, T.; TRIHARSO. **Plant virus in Asia**. Bulasksumur: Gadjah Mada University Press, 2000. p. 1263.

MUSUMECI, M.R.; ROSSETTI, V. Transmissão dos sintomas da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 15, p. 228, 1963.

NASCIMENTO, A.A.C.; ESPREAFICO, E.M.; LARSON, M.L.P.; MONESI, N.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; RODRIGUES, V. PATUSSI, E.V.; GRAMINHA, M.A.S.; SQUINA, F.M.; SOUSA, J.F.; RULER, R.; VALENTE, V. **Tecnologia do DNA Recombinante**. 2003. Disponível em: <<http://morpheus.fmrp.usp.br/td/apostila.php>>. Acesso em: 05 abr. 2009.

NICOLINI-TEIXEIRA, F. **Leprose dos citros**: interações planta x vírus x vetor. 2008. 148 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2008.



NOGUEIRA, N.L.; RODRIGUES, J.C.V.; ROSSI, M.L. Partículas semelhantes à rhabdovírus associadas a sintomas de mancha verde em folhas de manaca (*Burnfelsia* sp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 34, 2001, São Pedro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 2001, v. 26, p. 513.

NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; GUIDOTTI, D.F.S.; MACHADO, M.A. Transmissão do vírus da leprose dos citros (CiLV-C) por populações apossimbióticas de *B. phoenicis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38, 2008, Brasília. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, 2008, v. 33, p. S300. Suplemento.

NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; LOCALI, E.C.; ARRIVABEM, F.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; MACHADO, M.A.. Detecção do vírus da leprose do citros (CiLV-C) através de RT-PCR em diferentes fases de desenvolvimento do ácaro vetor (*Brevipalpus phoenicis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38, 2005, Brasília. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 2005a, v. 30, p. 183. Suplemento.

NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ASTÚA-MONGE, G.; CARVALHO, S.A.; LOCALI, E.C.; RODRIGUES, V.; ARRIVABEM, F.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; MACHADO, M.A. Detection of CLO (Cytophaga-like organism endosymbionts in adults and eggs of citrus leproses vector *Brevipalpus phoenicis* and *B. obovatus*). In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 28, 2005, São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, 2005b, v. 31, p. 65. Suplemento.

NUNES, M.A. **Constatação da transmissibilidade do vírus da leprose dos citros por *Brevipalpus phoenicis* em cercas-vivas, quebra-ventos e plantas daninhas através da microscopia eletrônica de transmissão**. 2004. 46 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

\_\_\_\_\_. **Transmissão do vírus da leprose dos citros por *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) para plantas próximas de pomares cítricos**. 2007. 68 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

NUNES, M.A.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; OLIVEIRA, C.A.L. Infecção de hibisco e malvaisco pelo vírus da leprose dos citros através de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 1., 2006, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: [S.n.], 2006, p. 218.

OMOTO, C. Resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) aos produtos químicos na citricultura. In: OLIVEIRA, C.A.; DONADIO, L.C. **Leprose dos citros**. Jaboticabal: Funep, 1995. p. 179-188.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASSUMPÇÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.S.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, C.C.; VALLIM, M.A.; FRANCO, S.F.; SILVA, V.H.; JORDÃO JUNIOR, H.; OLIVEIRA, F.; GIACHETTO, P.F.; FERRARI, F.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; FRANCHISCINI, F.J.B.; SILVA, J.M.F.; ARRUDA, P.; FERRO, J.A.; REINACH, F.; SILVA, A.C.R. da. The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus leprosis associated virus, cytoplasmic type (CiLV-C). **Virus Genes**, New York, v. 32, p. 289-298, 2006.

RODRIGUES, J.C.V. Leprose dos citros: relação vetor x patógeno. In.: OLIVEIRA, C.A.; DONADIO, L.C. **Leprose dos citros**. Jaboticabal: Funep, 1995.p. 57-68.

\_\_\_\_\_. **Relações patógeno-vetor-planta no sistema leprose dos citros**. 2000, p. 168. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

RODRIGUES, J.C.V.; FIORAVANTE, A.M.; NOGUEIRA, N.L. Leprose dos citros: variabilidade de *Citrus* spp. ao patossistema ácaro-patógeno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28, 1995, Ilhéus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 1995, v. 20, p. 309-310, 1995a. Suplemento.

RODRIGUES, J.C.V.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 161-179, 2003.

RODRIGUES, J.C.V.; LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. Transmissibility of citrus leprosis virus by *Brevipalpus phoenicis* to *Solanum violaefolium*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 911, 2005.

RODRIGUES, J.C.V.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W.; MÜLLER, G.W. Transmission of citrus leprosis virus to mandarins by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., 2000, Campinas. **Proceedings....** Campinas: [s.n.], 2000, v. 14, p. 174-178.

RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L.; FREITAS, D.S. Ringspot of *Ligustrum lucidum* Aiton, a new disease transmitted by *Brevipalpus phoenicis* G. (Acari:Tenuipalpidae) in Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28, 1995, Ilhéus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 1995, v. 20, p. 292, 1995b. Suplemento.

RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N. L.; PRATES, H.S. Virus-like particles associated with *Brevipalpus phoenicis* G. (Acari: Tenuipalpidae) vector of citrus leprosis virus. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 26, p. 391-395, 1997.

ROSSETTI, V. Diferenciação entre o cancro cítrico e outras moléstias. **Citrus**, São Paulo, v. 1, p. 23-26, 1980.

ROSSETTI, V.; SALIBE, A.A. Experiências sobre o controle da leprose em citros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 26, p. 119, 1959.

ROSSETTI, V.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. **Doenças de citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus**. Campinas: Fundação Cargill, 1993. 84 p.

SALVA, R.A.; MASSARI, C.A. Situação do ácaro da leprose no Estado de São Paulo, levantamento - Fundecitrus. In: OLIVEIRA, C.A.L.; DONADIO, L.C. (Ed.). **Leprose dos citros**. Jaboticabal: Funep, 1995. p. 13-18.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. V.3, 253 p.

SILVA, M.C.L.; SANTOS, C.D.G.; SANTOS, A.A.; LIMA, J.A.A. Vírus da mancha amarela da gravioleira: transmissão, hospedeiros, purificação e produção de anti-soro1. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 37, n. 2, p. 160-165, 2006.

THOMAS, C.L.; PERBAL, C.; MAULE, A.J. A mutation of *Cauliflower mosaic virus* gene interferes with virus movement but not virus replication. **Virology**, New York, v. 192, p. 415-421, 1993.

TOMENIUS, K., CLAPHAM, D.; MESHI, T. Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with *Tobacco mosaic virus*. **Virology**, New York, v. 160, p. 363-371, 1987.

VANDENBOSCH, K.A. Immunogold labeling. In: HALL, J.L.; HAWES, C. (Ed.). **Electron microscopy of plant cells**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 181-218.

VELAME, K.V.C.; MEISSNER FILHO, P.E. Purificação e produção de anti-soro para o vírus do mosaico comum da mandioca. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 13, n. 2, p. 63-66, 2001.

VERGANI, A.R. La transmission de la lepra explosiva de la ligustrina por ácaros. **Revista Argentina de Agronomía**, Buenos Aires, v. 9, p. 292-294, 1942.

VERGANI, A.R. **Transmission y naturaleza de la "lepra explosiva" del naranjo**. Buenos Aires: Ministerio de Agricultura de la Nación, Instituto de Sanidad Vegetal, , Série A5, p.3, 1945.

WAIGMANN, E.; UEKI, S.; TRUTNYEVA, K.; CITOVSKY, V. The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 23, p. 195-250, 2004.

WALKER, P.J.; BENMANSOUR, A.; DIETZGEN, R.; FANG, R.X.; JACKSON, A.O.; KURATH, C.; LEONG, J.C.; NANDIN-DAVES, S.; STESH, R.B.; TORDO, N. Family Rhabdoviridae. In: REGENMORTEL, M.H.V. van et al. (Ed.). **Virus taxonomy: 7th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2000. 1162 p.

WEEKS, A.R.; MAREC, F.; BREEUWER, J.A.J. A mite species that consists entirely of haploid females. **Science**, New York, v. 292, p. 2479-2483, 2001.

WEGMAN, F.; PETRI, B.; KHANDOGA, G.; MOSER, C.; KHANDOGA, A.; VOLVERY, S.; Li, H.; NASDALA, I.; BRANDAU, O.; FÄSSLER, R.; BUTZ, S.; KROMBACH, F.; VESTWEBER, D. ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 203, p. 1671-1677, 2006.

WOLF, S.; DEOM, C.M.; BEACHY, R.N.; LUCAS, W.J. Movement protein of *Tobacco mosaic virus* modifies plasmodesmatal size exclusion limit. **Science**, New York, v. 246, p. 377-379, 1989.

ZERBINI JR., F.M; CARVALHO, M.G; ZAMBOLIM, E.M. **Introdução à virologia vegetal**. Viçosa:Universidade Federal de Viçosa, 2002. 145 p. (Cadernos Didáticos, 87).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)