

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

**Identificação e caracterização de viróides e estudo de alguns aspectos da  
interação de viróides com proteínas do hospedeiro**

**Marcelo Eiras**

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

**Piracicaba**

**2006**

**Marcelo Eiras**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Identificação e caracterização de viróides e estudo de alguns aspectos da  
interação de viróides com proteínas do hospedeiro**

**Orientador:**

**Prof. Dr. ELLIOT WATANABE KITAJIMA**

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

**Piracicaba**  
**2006**

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

Eiras, Marcelo

Identificação a caracterização de viróides e estudo de alguns aspectos da interação de viróides com proteínas do hospedeiro / Marcelo Eiras. - - Piracicaba, 2006.

109 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.  
Bibliografia.

1. Brassicaceae 2. Fruta cítrica 3. Proteínas de plantas 4. Proteínas nucleares  
5. Viróides 6. Uva I. Título

CDD 634.8

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

*Aos meus pais dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Elliot W. Kitajima pela amizade, orientação, disponibilidade e principalmente por ter oferecido as totais condições para a realização deste trabalho.

Ao professor Ricardo Flores pela amizade, orientação, ensinamentos e principalmente pelo cuidado e carinho com que me recebeu em seu laboratório, no Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) – Universidad Politécnica de Valencia (UPV), Valencia, Espanha. Foi uma honra fazer parte do seu grupo de pesquisa, ainda que por pouco tempo.

Ao grande mestre da biologia molecular José Antonio Daròs, pesquisador do IBMCP, pela orientação e pelos ensinamentos que certamente levarei por toda minha vida profissional.

À Pesquisadora Científica Maria Luisa P.N. Targon, do Centro APTA-Citros Sylvio Moreira pela amizade, ajuda, orientação e principalmente pela acolhida em seu laboratório durante a fase inicial dos trabalhos.

Ao colega Thor V.M. Fajardo Pesquisador Científico da Embrapa Uva e Vinho, pela amizade, auxílio e colaboração em parte dos trabalhos.

Aos colegas do IBMCP: Sonia Delgado, Maria Eugenia Gás (mis vecinas y profesoras de español), Alberto Carbonel, Alicia Nieto, Amine Elleuch, Diego Molina e Elisa Biondi pelos ótimos momentos compartilhados; à Selma Gago e Pedro Serra pela grande ajuda nas fases finais de clonagem do viróide de citros, e em especial ao Angel Emilio Martínez de Alba pela amizade, ajuda, ensinamentos e pelos momentos agradáveis que me faziam esquecer do trabalho, principalmente nas saídas de “tapas” e nas degustações dos maravilhosos Riojas; à Amparo Ahuir, dona de lindíssimos olhos azuis, pela inestimável ajuda nas purificações dos viróides e pelas agradáveis conversas.

À queridíssima Maria Elena Rodio (“Monellina”) pelos momentos maravilhosos e inesquecíveis que passamos juntos em Valencia.

À minha querida amiga Clara Torres por todo carinho, companhia, pelas aulas de valenciano e os concertos de “violino-heavy”.

Às queridas amigas Francy Carrillo, Luz Matilde Hernandez e Patrícia Agudelo (“Capullita”) pela amizade, companhia e pelas festinhas regadas às deliciosas “arepas colombianas”!!

Aos colegas do NAP-MEPA: Francisco Tanaka, Karen Kubo, Paulinho de Tarso, Renata Takassugui Gomes e Renato B. Salaroli pela amizade e momentos de descontração.

Aos colegas do Centro APTA-Citros Sylvio Moreira: Alessandra Alves de Souza, Alexandre M. Amaral, Ana Carolina B. Palmieri, Dario A. Palmieri, Debir Naves Gomes, Eliane C. Locali, Eridan Pereira, Francisca Alves dos Santos, Gustavo Astúa-Monge, Helvécio Della Coletta Filho, Juliana Freitas-Astúa, Juliana Teixeira, Juliana Roncolleta, Kleber M. Borges, Luciana Harumi, Marco Aurélio Takita, Marcos Antônio Machado, Mariângela Cristofani, Marines Bastianel, Sergio A. Carvalho, Silvia de Oliveira Dorta, Renata Antonioli e Valdenice Moreira Novelli, pelos momentos agradáveis compartilhados e também pelas inesquecíveis noitadas.

Aos colegas da Pós-graduação em Fitopatologia da ESALQ pelo companheirismo e amizade, em especial a Ana Beatriz C. Czermainski, Gleiber Q. Furtado e Scheila da Conceição Maciel.

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia da ESALQ pelo conhecimento transmitido.

Aos pesquisadores Científicos Addolorata Colariccio, Alexandre L.R. Chaves, Eliana B. Rivas, Fernando J.S. Salas, Ligia M.L. Duarte, Marcos César Gonçalves e Maria Amélia V. Alexandre, do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico, pela amizade e incentivo.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, nas pessoas de seus Diretores Técnicos Administrativos e Assessores e também ao Diretor do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal (CPDSV), pela atenção dispensada durante meu afastamento para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa (SWE) concedida para a realização de parte dos trabalhos no IBMCP, CSIC-UPV, Valencia, Espanha.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
Referências.....	14
2 VIRÓIDES E VIRUSÓIDES: RELÍQUIAS DO MUNDO DE RNA.....	16
Resumo.....	16
Abstract.....	16
2.1 Introdução.....	17
2.2 Classificação atual dos viróides.....	17
2.3 Propriedades dos viróides.....	19
2.3.1 Características gerais.....	19
2.3.2 Replicação.....	23
2.3.3 Ribozimas: RNAs auto-catalíticos.....	25
2.3.4 Aspectos biológicos e moleculares da interação viróide/hospedeiro.....	27
2.3.5 Movimento na planta.....	29
2.3.6 Silenciamento gênico.....	31
2.3.7 Patogênese.....	32
2.4 Virusóides: pequenos RNAs satélites circulares.....	36
2.5. Origem e evolução dos viróides e virusóides: uma viagem ao mundo de RNA....	39
2.6 Considerações finais: perspectivas futuras para moléculas do passado.....	42
Referências.....	44
3 VIDEIRAS DUPLAMENTE INFECTADAS PELO <i>Citrus exocortis viroid</i> E <i>Hop stunt viroid</i> NO BRASIL.....	57
Resumo.....	57
Abstract.....	57
3.1 Introdução.....	58
3.2 Material e Métodos.....	59
3.2.1 Amostras.....	59
3.2.2 Extração de RNA e RT-PCR.....	59

3.2.3 Clonagem e seqüenciamento.....	60
3.2.4 Análise das seqüências e filogenia.....	61
3.3 Resultados e Discussão.....	62
Referências.....	69
<b>4 ISOLAMENTO, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM RNA CIRCULAR DE SEQÜÊNCIA DESCONHECIDA: UM POSSÍVEL NOVO VIRÓIDE DE CITROS.....</b>	
Resumo.....	72
Abstract.....	72
4.1 Introdução.....	72
4.2 Material e Métodos.....	75
4.2.1 Material vegetal.....	75
4.2.2 Extração de RNAs.....	75
4.2.3 Eletroforese em géis de poliacrilamida.....	75
4.2.4 Corte das bandas de interesse.....	75
4.2.5 Eluição de ácidos nucléicos de géis de poliacrilamida.....	76
4.2.6 Transcrição reversa (RT).....	76
4.2.7 PCR.....	77
4.2.8 PAGE-Southern-blot.....	77
4.2.9 Cinética para a síntese da sonda.....	78
4.2.10 Clonagem.....	79
4.2.11 Mini-preparações.....	79
4.2.12 Análise dos plasmídeos.....	80
4.2.13 Seqüenciamento dos clones selecionados.....	80
4.2.14 Desenho dos oligonucleotídeos a partir das seqüências obtidas.....	80
4.3 Resultados.....	81
4.3.1 Extração de RNAs totais e RT-PCR.....	81
4.3.3 Preparo e análise da sonda.....	83
4.3.2 Southern-blot.....	84
4.3.4 Clonagem e análise dos clones.....	85
4.3.5 Seqüenciamento e análise das seqüências.....	86



4.4 Discussão.....	88
Referências.....	90
<b>5 <i>Potato spindle tuber viroid</i>: EXISTÊNCIA DO LOOP E <i>IN VIVO</i> E UNIÃO ESPECÍFICA <i>IN VITRO</i> ÀS PROTEÍNAS RIBOSSOMAL L5 E AO FATOR DE TRANSCRIÇÃO IIIA DE <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>94</b>
Resumo.....	94
Abstract.....	94
5.1 Introdução.....	94
5.2 Material e Métodos.....	95
5.2.1 Preparação e análise dos RNAs.....	95
5.2.2 Expressão e purificação das proteínas L5 e TFIIIA de <i>Arabidopsis</i> .....	96
5.2.3 Ensaio de retardo em gel (EMSA).....	97
5.2.4 Ensaio de entrecruzamento com luz ultravioleta.....	97
5.3 Resultados.....	98
5.3.1 Entrecruzamento induzido por luz UV revela a existência do loop E no PSTVd (+) <i>in vivo</i> .....	98
5.3.2 União <i>in vitro</i> do PSTVd (+) com as proteínas recombinantes L5 e TFIIIA...100	100
5.3.3 Análises de competição <i>in vitro</i> revelam que as proteínas L5 e TFIIIA de <i>Arabidopsis</i> apresentam afinidade similar pelo PSTVd e 5S RNAs.....	102
5.4 Discussão.....	103
Referências.....	106

## RESUMO

### **Identificação e caracterização de viróides e estudo de alguns aspectos da interação de viróides com proteínas do hospedeiro**

O presente trabalho foi subdividido em quatro capítulos com os seguintes objetivos: (i) elaborar uma minuciosa revisão de literatura abordando os principais aspectos da interação viróide-hospedeiro e as relações evolutivas dos viróides e virusóides; (ii) identificar e caracterizar viróides associados a videiras, no Brasil; (iii) purificar, clonar e caracterizar, um RNA circular de seqüência totalmente desconhecida; (iv) estudar alguns aspectos relacionados à interação viróide-hospedeiro. Inicialmente, foram identificadas e caracterizadas duas espécies de viróides (o *Citrus excortis viroid*, CEVd e o *Hop stunt viroid*, HSVd) isolados de videiras no Brasil. Para tal, promoveu-se extração de RNAs totais de folhas de *Vitis vinifera* 'Cabernet Sauvignon' e *V. labrusca* 'Niagara Rosada', seguida de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos. Os fragmentos de DNA amplificados foram clonados e seqüenciados. Os resultados revelaram que as videiras estavam duplamente infectadas com o CEVd e HSVd. As análises filogenéticas mostraram que os clones de HSVd de videira agruparam-se com outros variantes de videira, formando um grupo separado de um segundo formado por variantes de citros. Já os clones de CEVd de videira agruparam-se com isolados de citros e videira. No capítulo 3, empregou-se um método para a clonagem e caracterização de um pequeno RNA circular (com aproximadamente 300 nucleotídeos) de seqüência totalmente desconhecida. Este RNA, quando submetido à eletroforese dupla em géis de poliacrilamida desnaturantes, apresentou um retardamento na migração, similar aos viróides. Após a clonagem de fragmentos do RNA, amplificados via RT-PCR com oligonucleotídeos aleatórios (apresentando seis nucleotídeos degenerados no terminal 3'), os clones obtidos foram seqüenciados. A partir desses dados, dois oligonucleotídeos adjacentes de polaridades opostas foram desenhados e empregados para amplificar via RT-PCR a seqüência completa do RNA circular. A análise das seqüências revelou a presença da CCR (central conserved region) do *Apple scar skin viroid* (ASSVd), espécie tipo do gênero *Apscaviroid*, e compartilha similaridade com outros membros deste gênero, o que sugere fortemente que o RNA circular é um viróide recombinante. Finalmente, no capítulo 4, foram realizados experimentos que comprovaram a existência do motivo loop E (presente na CCR de algumas espécies dos *Pospiviroidae*) *in vivo* no PSTVd. Demonstrou-se também, utilizando ensaios de união *in vitro* (análise de retardo em gel, EMSA e entrecruzamento com luz ultravioleta), que as proteínas L5 e TFIIA de *Arabidopsis thaliana* se unem especificamente ao PSTVd com a mesma afinidade que elas se unem ao seu substrato natural, o rRNA 5S, enquanto que a afinidade por um viróide cloroplástico (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) foi significativamente menor. Estas duas proteínas devem participar na síntese e movimento intracelular do PSTVd *in vivo*.

Palavras-chave: Viróide; CEVd, HSVd, PSTVd, Grapevine; *Citrus*; *Arabidopsis*; TFIIA; Proteína ribossomal L5

## ABSTRACT

### Identification and characterization of viroids and study of some viroid-host protein interactions

The present work has been divided into four chapters to: (i) review the main points in viroid-host interactions and present different aspects in the evolutionary relationship of the viroids and virusoids; (ii) identify and characterize viroids infecting grapevine in Brazil; (iii) purify, clone and sequence what appears to be a novel citrus viroid; (iv) study some aspects related to the viroid-host protein interactions. Firstly, two viroid species (*Citrus exocortis viroid*, CEVd and *Hop stunt viroid*, HSVd) were identified and characterized from grapevine in Brazil. Total RNAs, extracted from leaves of *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ and *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’, were RT-PCR amplified with specific primers for the five viroids described infecting grapevines. The resulting products were separated by agarose gel electrophoresis and the DNA fragments of the expected full-size were eluted, cloned and sequenced. The grapevines analyzed were doubly-infected by CEVd and HSVd. A phylogenetic analysis showed that the Brazilian grapevine HSVd variants clustered with other grapevine HSVd variants forming a specific group separated from citrus variants, whereas the Brazilian CEVd variants clustered with other citrus and grapevine variants. On the other hand, a method for cloning small circular RNAs of unknown sequence has been applied to an RNA of this kind from citrus (with ca. 300 nucleotides). This RNA, when analyzed by PAGE in denaturing conditions, showed the slow mobility typical of viroid RNAs. After denaturation, the purified RNA was RT-PCR amplified using a primer with six randomized positions at its 3’ terminus, with the resulting products being then cloned and sequenced. From these data, two adjacent primers of opposite polarities were designed and used to RT-PCR amplify the complete sequence. Analysis of the sequences revealed the presence of the CCR (central conserved region) of the *Apple scar skin viroid* (ASSVd), the type member of the genus *Apscaviroid*, and scattered similarities with other members of this genus, suggesting that the circular RNA is a viroid recombinant. Finally, UV irradiation of infected tissue has revealed the existence *in vivo* of an RNA motif (loop E) in *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), the type member of the family *Pospiviroidae* (nuclear viroids), and RNA-protein binding followed by electrophoretic mobility shift (EMSA) and UV cross-linking label transfer assays have shown that transcription factor IIIA (TFIIIA) and L5 ribosomal protein from *Arabidopsis thaliana* bind this RNA *in vitro* with the same affinity as they bind 5S rRNA, whereas the affinity for a chloroplastic viroid (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) is significantly lower. These two proteins may participate in synthesis and delivery of PSTVd *in vivo*.

Keywords: Viroid; CEVd, HSVd, PSTVd, Grapevine; *Citrus*; *Arabidopsis*; TFIIIA; Ribosomal protein L5

## 1 INTRODUÇÃO

“É precisamente na fronteira do conhecimento que a imaginação tem seu papel mais importante; o que ontem foi apenas um sonho amanhã poderá se tornar realidade”.

Marcelo Gleiser

Há 35 anos, Theodor O. Diener, pesquisador do Departamento de Agricultura (Beltsville, Maryland, EUA) identificou o primeiro patógeno subviral (DIENER, 1971a), o agente causal do afilamento do tubérculo da batatinha, denominado até então de Potato spindle tuber ‘virus’ (DIENER; RAYMER, 1967), cunhando o termo **viróide** (*viroid*) para distinguir estes pequenos fitopatógenos dos vírus de plantas (DIENER, 1971a, b).

Diener (1991) considera os viróides parasitas moleculares no limiar da vida, pois os mesmos são constituídos de um RNA circular de fita simples, com forte estrutura secundária, desprovidos de capa protéica. Seus genomas variam de 246 a 401 nucleotídeos e não codificam proteínas, sendo totalmente dependentes da célula hospedeira para sua replicação (FLORES et al., 2005a). Estes minúsculos RNAs constituem os menores e mais simples fitopatógenos conhecidos, apresentando um genoma dez vezes menor que o genoma do menor vírus conhecido.

Atualmente os viróides são classificados em duas famílias, oito gêneros, 29 espécies e dezenas de variantes de seqüência de acordo com características biológicas e moleculares. Na família *Pospiviroidae*, da qual fazem parte os viróides que apresentam uma região central conservada (CCR) e replicação nuclear sem a participação de ribozimas, há cinco gêneros (*Pospiviroid*, *Hostuviroid*, *Cocadviroid*, *Apscaviroid*, *Coleviroid*) e vinte e cinco espécies. Na família *Avsunviroidae* há três gêneros (*Avsunviroid*, *Pelamoviroid* e *Elaviroid*) com quatro espécies descritas, as quais não possuem CCR e apresentam replicação cloroplástica mediada por ribozimas do tipo cabeça-de-martelo em ambas as polaridades da molécula de RNA (FLORES et al., 2005b).

Há carência de estudos sobre viróides em plantas de importância econômica no Brasil. Bartolini e Salazar (2003) destacam que os viróides ainda não receberam a devida atenção nos países da América do Sul. Segundo Singh et al. (2003), regiões de clima quente podem conter uma maior diversidade de viróides, pois estes se replicam com maior eficiência em altas temperaturas. Portanto, nas condições tropicais, muitas anomalias de etiologia desconhecida podem ser causadas por viróides. Além disso, plantas originalmente de clima temperado, cultivadas em condições tropicais e subtropicais, também podem ser hospedeiras de novos viróides. Embora existam estudos sobre doenças causadas por viróides no Brasil, em especial a exocorte (causada pelo *Citrus exocortis viroid*, CEVd) e a xiloporose (causada por variantes do *Hop stunt viroid*, HSVd) em citros, mesmo antes do conhecimento da natureza viroidal desses patógenos, poucos trabalhos foram realizados (FONSECA; BOITEUX, 1997).

No Brasil, destacam-se as culturas de citros e videira como hospedeiras de viróides. Normalmente, há a expressão de sintomas na primeira e latência na segunda (HADIDI et al., 2003). No caso dos citros, há todo um procedimento legal de indexação que deve ser realizado para a obtenção de matrizes livres de vírus e viróides via métodos biológicos e/ou moleculares (CARVALHO et al., 2003; TARGON et al., 2005). Em videiras, não há, todavia, muita preocupação com estes patógenos, pois os mesmos não induzem sintomas visíveis. Porém, sua presença pode afetar o rendimento e a qualidade da uva (LITTLE; REZAIAN, 2003). O cultivo de videiras tem apresentado um significativo aumento principalmente na região Sul do Brasil (Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Além disso, o vale do rio São Francisco (Nordeste), o Sul do Estado de Minas Gerais (Sudeste), e o Estado do Mato Grosso (Centro-Oeste), são exemplos recentes da expansão do cultivo de videira (PROTAS et al., 2002). Muitas espécies cultivadas, em plena produção, podem estar infectadas por viróides, o que pode implicar decréscimo no rendimento e na qualidade. Dessa forma, a identificação e caracterização molecular dos viróides viabilizam estratégias para o desenvolvimento de métodos rápidos de detecção e controle desses patógenos.

Um ponto pouco abordado na literatura mundial é referente aos aspectos relacionados à interação viróide-hospedeiro. Os viróides, por não codificarem proteínas próprias, são totalmente dependentes de fatores da célula hospedeira para completar seu ciclo infeccioso, que envolve principalmente replicação e movimento a curta (célula-a-célula via plasmodesmos) e longas distâncias (via floema). Experimentos com inibidores das RNA polimerases indicaram que a

síntese das moléculas do *Potato spindle tuber viroid*, PSTVd (família *Pospiviroidae*), é catalisada por uma RNA polimerase II (nuclear) dependente de DNA (FLORES; SEMANCIK, 1982; MÜHLBACH; SÄNGER, 1979; WARRILOW; SYMONS, 1999), enquanto que a síntese das moléculas do *Avocado sunblotch viroid*, ASBVd (família *Avsunviroidae*) é catalisada por uma RNA polimerase cloroplástica codificada no núcleo (NAVARRO et al., 2000). Em outros trabalhos, na busca por proteínas-candidatas a interagir com viróides, identificaram-se duas proteínas de cloroplastos de abacateiro (PARBP33 e PARBP35) associadas com o ASBVd *in vivo* (DARÒS; FLORES, 2002), uma proteína de floema de pepino denominada de PP2 que interage *in vitro* e *in vivo* com o *Hop stunt viroid* (GÓMEZ; PALLÁS, 2004), a proteína Virp1 de tomateiro, que se une ao PSTVd (MARTÍNEZ DE ALABA et al., 2003), além de histonas (WOLFF et al., 1985) e um inibidor de cathepsina D (WERNER et al., 1983) que também se unem ao PSTVd.

Portanto, em função da pouca informação disponível na literatura, estudaram-se no presente trabalho alguns aspectos envolvidos na interação de viróides com proteínas da planta hospedeira (capítulo 4), sendo realizados ensaios de união (retardo em gel e entrecruzamento com luz ultravioleta) entre o PSTVd, um viróide nuclear que apresenta o motivo Loop E (conservado em membros do gênero *Pospiviroid* e envolvido em replicação, especificidade do hospedeiro e patogênese), e duas proteínas clonadas e purificadas de *Arabidopsis thaliana*: o fator de transcrição IIIA (TFIIIA) e a proteína ribossomal L5. Demonstrou-se que as proteínas se unem especificamente ao PSTVd *in vitro* e foi confirmada, nesse viróide, a existência do Loop-E *in vivo*.

O presente trabalho também envolveu a identificação e caracterização de duas espécies de viróides (CEVd e HSVd) isolados de videiras no Brasil (capítulo 2), trabalho recentemente aceito para a publicação, além da clonagem e caracterização de um RNA circular de citros de seqüência totalmente desconhecida que, pelos resultados obtidos, trata-se provavelmente de um novo viróide (capítulo 3). Além disso, a moderna taxonomia dos viróides, os fatores envolvidos na interação viróide-hospedeiro como a replicação, movimento, patogênese e silenciamento gênico e os aspectos evolutivos desses pequenos patógenos, foram relacionados em uma exaustiva revisão de literatura (capítulo 1) recentemente aceita para a publicação (EIRAS et al., 2006).

## Referências

BARTOLINI, I.; SALAZAR, L.F. Viroids in South America. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. chap. 39, p.265-267.

CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W. Avaliação de indicadoras e porta-enxertos na indexação biológica do viróide da xiloporose em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.24, p.145-155, 2003.

DARÓS, J.A.; FLORES, R. A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. **EMBO Journal**, Oxford, v.21, p.749-759, 2002.

DIENER, T.O. Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTVd-RNA and the question of whether virions exit in extracts or in situ. **Virology**, Duluth, v.43, p.75-89, 1971a.

DIENER, T.O. Potato spindle tuber 'virus'. IV. A replicating, low molecular weight RNA. **Virology**, Duluth, v.45, p.411-428, 1971b.

DIENER, T.O. The frontier of life: the viroids and viroid-like satellite RNAs. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Viroids and satellites: molecular parasites at the frontier of life**. London: CRC Press, 1991. p.1-20.

DIENER, T.O.; RAYMER, W.B. Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. **Science**, Washington DC, v.158, p.378-381, 1967.

EIRAS, M.; DARÓS, J.A.; FLORES, R.; KITAJIMA, E.W. Viróides e vírusóides: relíquias do mundo de RNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31. 2006. No prelo.

FLORES, R.; SEMANCIK, J.S. Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington DC, v.79, p.6285-6288, 1982.

FLORES, R.; HERNANDEZ, C.; MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; DARÓS, J.A.; DI SERIO, F. Viroids and viroid-host interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.117-139, 2005a.

FLORES, R.; RANGLES, J.W.; OWENS, R.A.; BAR-JOSEPH, M.; DIENER, T.O. Viroidae. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER U.; BALL, A.L. (Eds.) **Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier/Academic Press, 2005b. p.1145-1159.

FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. Viróides: minúsculos RNAs parasitas de plantas vasculares dotados de características e estruturas únicas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p.387-425, 1997.

GÓMEZ, G.; PALLÁS, V. A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with hop stunt viroid RNA. **Journal of Virology**, Washington DC, v.78, p.10104-10110, 2004.

HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. 370 p.

LITTLE, A.; REZAIAN, M.A. Grapevine viroids. In: HADIDI, A., FLORES, R., RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. chap. 28, p.195-206.

MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; SAGESSER, R.; TABLER, M.; TSAGRIS, M. A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA in vitro and in vivo. **Journal of Virology**, Washington DC, v.77, p.9685-9694, 2003.

MÜHLBACH, H.P.; SÄNGER, H.L. Viroid replication is inhibited by  $\alpha$ -amanitin. **Nature**, London, v.278, p.185-188, 1979.

NAVARRO, J.A.; VERA, A.; FLORES, R. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. **Virology**, Duluth, v.268, p.218-225, 2000.

PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U.A.; MELO, L.M.R. A viticultura brasileira: realidade e perspectivas. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2002, Caldas. **Anais...** Caldas: EPAMIG, 2002. p.17-32.

SINGH, R.P.; READY, K.F.M.; NIE, X. Biology. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. chap. 3, p.30-48.

TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; STUCHI, E.S.; SOUZA, J.M.; MÜLLER, G.W.; BORGES, K.M.; MACHADO, M.A. Hybridization techniques for indexing of citrus viroids in São Paulo State, Brazil. **Laranja**, Cordeirópolis, v.26, p.25-38, 2005.

WARRILOW, D.; SYMONS, R.H. Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato in vivo. **Archives of Virology**, Vienna, v.144, p.2367-2375, 1999.

WERNER, R.; GUITTON, M.C.; MÜHLBACH, H.P. Nucleotide sequence of a cathepsin D inhibitor protein from tomato. **Plant Physiology**, Bethesda, v.103, p.1473, 1993.

WOLFF, P.; GILZ, R.; SCHUMACHER, J.; RIESNER, D. Complexes of viroids with histones and other proteins. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.13, p.355-367, 1985.



## 2 VIRÓIDES E VIRUSÓIDES: RELÍQUIAS DO MUNDO DE RNA<sup>1</sup>

### Resumo

Até meados do século XX, os vírus eram considerados os representantes mais simples da escala biológica. A descoberta dos RNAs satélites e dos viróides por volta de 1970 foi surpreendente, pois foi comprovada a existência de uma nova classe de moléculas auto-replicativas ainda mais simples. Há indícios de que os viróides e virusóides (uma classe de RNAs satélites) teriam feito parte do “Mundo de RNA” (que precedeu o mundo atual baseado no DNA e proteínas) podendo ser considerados fósseis moleculares dessa era antiga. A simplicidade desses agentes subvirais e o fato de que a molécula de RNA deve interagir diretamente com fatores do hospedeiro para o desenvolvimento do seu ciclo infeccioso, colocam esses patógenos como um modelo para o estudo de processos metabólicos celulares. Nos últimos anos tem se observado um volume grande de publicações visando elucidar aspectos da interação viróide/hospedeiro como os mecanismos da patogênese, movimento dos viróides nas plantas hospedeiras, silenciamento gênico e atividades das ribozimas. Mudanças recentes ocorridas na taxonomia desses patógenos com a criação de famílias, gêneros e espécies, além da descoberta de novos viróides também têm sido verificadas. Portanto, a presente revisão visa atualizar o leitor quanto aos recentes avanços nas pesquisas com viróides, principalmente na taxonomia, filogenia e em vários aspectos moleculares da interação viróide/hospedeiro. Estão incluídas também algumas características dos virusóides e sua relação evolutiva com os viróides.

### Abstract

By the middle of the last century, viruses were considered as the simplest biological entities. The discovery of satellite RNAs and viroids by 1970 was surprising because revealed the existence of a novel class of self-replicating molecules even simpler. There are evidences that viroids and virusoids (a class of satellite RNAs) were part of the so-called “RNA world” (that preceded our present world based on DNA and proteins) and for this reason they can be considered as molecular fossils of this ancient period. The simplicity of these subviral agents and the fact that the RNA molecule must interact directly with host factors for completing their infective cycle, make of these pathogens a model for the study of cellular processes. In the last years, a large number of publications have widened our knowledge of the viroid-host interactions, including pathogenesis mechanisms, movement through the host, gene silencing and ribozyme activity. Recent changes have been introduced in the taxonomy of these pathogens, with the creation of families, genera and species, and new viroids have also been found. The purpose of this review is to present the reader with these recent advances in viroid research, mainly on taxonomy, phylogeny and in molecular aspects of the viroid-host interaction. Some characteristics of virusoids and their evolutionary relationship with viroids are also included.

---

<sup>1</sup>Revisão aceita para a publicação na Fitopatologia Brasileira (2006)

## 2.1 Introdução

Mais de 30 anos se passaram desde a descoberta dos viróides como agentes fitopatogênicos (DIENER, 1971). Desde então, uma série de livros, capítulos de livros e revisões têm sido publicados (DARÓS et al., 2006; DIENER, 1979; 2001; FLORES et al., 2000; FLORES, 2001; HULL, 2002; HADIDI et al., 2003; TABLER; TSAGRIS, 2004; FLORES et al., 2005a, b) abordando os mais diversos aspectos desses patógenos. No Brasil, Fonseca e Boiteux (1997) publicaram uma minuciosa revisão sobre viróides em que relacionaram aspectos da biologia, história, métodos de detecção e purificação, origem, sintomas, vias de transmissão, estratégias de controle, e os trabalhos sobre viróides no Brasil. Posteriormente, porém, pouco se avançou nas pesquisas com viróides no Brasil. Bartolini e Salazar (2003) destacam que os viróides ainda não receberam a devida atenção nos países da América do Sul. Ao contrário, na literatura mundial tem se observado nos últimos anos um volume grande de publicações, principalmente visando elucidar aspectos da interação viróide/hospedeiro como os mecanismos da replicação, patogênese, movimento, silenciamento gênico e ação de ribozimas (contidas em alguns deles) *in vivo* e *in vitro*. Mudanças recentes ocorridas na taxonomia desses patógenos, com a criação de famílias, gêneros e espécies (FLORES et al., 2005b), além de novos viróides, também têm sido estabelecidas. Além disso, uma série de viróides já descritos tem sido identificada em novos países e regiões do Mundo (SINGH et al., 2003a).

Esta revisão visa atualizar o leitor nestes aspectos. Estão incluídas também algumas características dos virusóides, RNAs satélites circulares do tipo viroidal (VL-satRNAs) que são encapsidados por um vírus auxiliar. Apresentam algumas características comuns aos viróides, porém diferem na seqüência, função e biologia (SYMONS; RANGLES, 1999; MAYO et al., 2000). Aspectos relacionados à origem, evolução, biologia, classificação e características em comum aos viróides são também apresentados e discutidos.

## 2.2 Classificação atual dos viróides

A moderna taxonomia dos viróides (FLORES et al., 2005b) divide estes patógenos em duas famílias: a *Avsunviroidae*, que contempla os viróides auto-catalíticos, com dois gêneros: o *Avsunviroid* (espécie tipo – *Avocado sunblotch viroid* - ASBVd) e *Pelamoviroid* (espécie tipo – *Peach latent mosaic viroid* - PLMVd); e a *Pospiviroidae*, com os gêneros *Pospiviroid* (espécie tipo – *Potato spindle tuber viroid* - PSTVd), *Hostuviroid* (espécie tipo – *Hop stunt viroid* -

HSVd), *Cocadviroid* (espécie tipo – *Coconut cadang-cadang viroid* - CCCVd), *Apscaviroid* (espécie tipo – *Apple scar skin viroid* - ASSVd) e *Coleviroid* (espécie tipo – *Coleus blumei viroid* - CbVd). Os nomes dos gêneros derivam da espécie tipo (*Pospiviroid* de *Potato spindle tuber viroid*) e o das famílias do gênero tipo. Os gêneros distinguem-se, na família *Pospiviroidae*, de acordo com o tipo de região central conservada (central conserved region, CCR) e a presença de motivos denominados região terminal conservada (terminal conserved region, TCR) e forquilha terminal conservada (terminal conserved hairpin, TCH). Os dois gêneros da família *Avsunviroidae* distinguem-se em função da composição de bases, estrutura secundária (bastonete ou ramificada) e morfologia da estrutura ribozimática de cabeça-de-martelo. Atualmente, são aceitas 28 espécies e 8 possíveis novos viróides ainda não classificados dentro dos 7 gêneros citados acima. Os critérios para a discriminação das espécies de viróides consideram a similaridade de seqüência menor que 90%, que caracterizam viróides distintos. Quando a similaridade de seqüência de nucleotídeos é superior a 90%, consideram-se **variantes** de um mesmo viróide (FLORES et al., 2005b). Além disso, pelo menos uma propriedade biológica diferencial deve ser considerada como círculo de hospedeiras, modo de transmissão e o fenômeno de proteção cruzada. Ressalta-se que das 28 espécies de viróides aceitas pelo “*International Committee on Taxonomy of Viruses*” (ICTV), 25 pertencem à família *Pospiviroidae* que apresentam em comum a CCR, estrutura secundária em forma de bastonete ou quase-bastonete e a ausência de estruturas ribozimáticas de cabeça-de-martelo, além de replicarem-se no núcleo seguindo um mecanismo de círculo rolante assimétrico. Os três membros da família *Avsunviroidae* apresentam como característica principal os elementos estruturais típicos das ribozimas cabeça-de-martelo, não possuem CCR e se replicam no cloroplasto seguindo um mecanismo de círculo rolante simétrico (FLORES et al., 2005b). Vale destacar que, recentemente, a espécie *Eggplant latent viroid* (ELVd) foi proposta como candidata a espécie tipo de um novo gênero, *Elaviroid*, da família *Avsunviroidae* (FADDA et al., 2003a). Uma compilação das seqüências de viróides incluindo as variantes e seus respectivos números de acesso estão disponíveis em um banco de dados (PELCHAT et al., 2003). A Tabela 1 contempla as espécies, gêneros e famílias dos viróides aceitos pelo ICTV (FLORES et al., 2005b), além dos nomes das espécies de viróides que serão referidas ao longo do texto e suas respectivas abreviaturas.

Tabela 1 – Classificação dos viróides em famílias, gêneros e espécies e os respectivos acrônimos de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (FLORES et al., 2005b). As espécies-tipo de cada gênero estão sublinhadas

Família	Gênero	Espécie	Acrônimo	Tamanho (nt)	
<i>Pospiviroidae</i>	<i>Pospiviroid</i>	<u>Potato spindle tuber</u>	PSTVd	356, 359-360	
		<i>Chrysanthemum stunt</i>	CSVd	354, 356	
		<i>Citrus exocortis</i>	CEVd	368-374	
		<i>Columnnea latent</i>	CLVd	370-375	
		<i>Iresine 1</i>	IrVd-1	370	
		<i>Mexican papita</i>	MPVd	359-360	
		<i>Tomato apical stunt</i>	TASVd	360-363	
		<i>Tomato chlorotic dwarf</i>	TCDVd	360	
		<i>Tomato planta macho</i>	TPMVd	360	
		<i>Hostuviroid</i>	<u>Hop stunt</u>	HSVd	295-303
		<i>Cocadviroid</i>	<u>Coconut cadang-cadang</u>	CCCVd	246-301
			<i>Citrus IV</i>	CVd-IV	284
			<i>Coconut tinangaja</i>	CTiVd	254
			<i>Hop latent</i>	HLVd	256
	<i>Apscaviroid</i>	<u>Apple scar skin</u>	ASSVd	329-330	
		<i>Apple dimple fruit</i>	ADFVd	306-307	
		<i>Australian grapevine</i>	AGVd	369	
		<i>Citrus viroid III</i>	CVd-III	294, 297	
		<i>Citrus bent leaf</i>	CBLVd	318	
		<i>Grapevine yellow speckle 1</i>	GYSVd-1	366-368	
		<i>Grapevine yellow speckle 2</i>	GYSVd-2	363	
		<i>Pear blister canker</i>	PBCVd	315-316	
		<i>Coleviroid</i>	<u>Coleus blumei-1</u>	CbVd-1	248, 250-251
			<u>Coleus blumei-2</u>	CbVd-2	301-302
			<u>Coleus blumei-3</u>	CbVd-3	361-362, 364
	<i>Avsunviroidae</i>	<i>Avsunviroid</i>	<u>Avocado sunblotch</u>	ASBVd	246-250
		<i>Pelamoviroid</i>	<u>Peach latent mosaic</u>	PLMVd	335-338
			<i>Chrysanthemum chlorotic mottle</i>	CChMVd	398-401
		<i>Elaviroid</i> <sup>1</sup>	<u>Eggplant latent</u> <sup>1</sup>	ELVd	332-335

Nota: <sup>1</sup>Gênero e espécie-tipo candidatos dentro da família *Avsunviroidae* (FADDA et al., 2003a)

## 2.3 Propriedades dos viróides

### 2.3.1 Características gerais

Os viróides constituem os menores e mais simples fitopatógenos conhecidos. Diener (1991) cita os viróides como parasitas moleculares no limiar da vida, pois os mesmos consistem de uma molécula de RNA fita simples, circular, com forte estrutura secundária e desprovidos de proteínas. Estes patógenos apresentam genomas com tamanho que varia entre 246 e 401 nucleotídeos e não traduzem proteínas, sendo totalmente dependentes da célula hospedeira para sua replicação (DIENER, 1996). A molécula de RNA dos viróides da família *Pospiviroidae* apresenta cinco domínios (Figura 1) denominados: **Domínio C** – que contém a CCR; **Domínio P**

– Relacionado a patogenicidade e expressão dos sintomas em alguns viróides; este domínio também contém uma região rica em purinas; **Domínio V** – Com maior variabilidade entre viróides que apresentam alta similaridade; **Domínios TL** (que contém os motivos TCR ou TCH) e **TR** – Localizados nas extremidades esquerda e direita da molécula, respectivamente, e provavelmente relacionados com recombinação e replicação dos viróides (KEESE; SYMONS, 1985; SANO; ISHIGURO, 1998; STEGER; RIESNER, 2003).

O primeiro viróide (*Potato spindle tuber viroid* – PSTVd) foi identificado e caracterizado por Diener (1971) e seqüenciado por Gross et al. (1978). Desde então, diversos viróides têm sido relatados em diversas espécies de plantas cultivadas como a exocorte dos citros (*Citrus exocortis viroid* – CEVd), o nanismo do crisântemo (*Chrysanthemum stunt viroid* – CSVd), o “cadang-cadang” do coqueiro (CCCVd), o nanismo do lúpulo (HSVd), o mosaico latente do pessegueiro (PLMVd), entre outros.

No Brasil, já foram identificados e caracterizados o CSVd, o CEVd e o CbVd ocorrendo naturalmente em plantas de crisântemo, citros e *Coleus*, respectivamente, além do *Hop latent viroid* (HLVd) e do PSTVd, ambos detectados em material isolado em quarentena (BATISTA et al., 1995; FONSECA et al., 1990; 1993). Barbosa et al. (2000) e Rodrigues et al. (1999) detectaram o CEVd em pomares de lima ‘Tahiti’ na Bahia e viróides associados a exocorte em laranjeiras no Estado de Sergipe, respectivamente. Targon et al. (2005) detectaram por meio de sondas não-radioativas o CEVd, o *Citrus viroid II* (CVd-II) (variantes do HSVd) e o *Citrus viroid III* (CVd-III) em pomares de citros no Estado de São Paulo. CEVd e HSVd também foram detectados em videiras provenientes do Rio Grande do Sul por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida e hibridização “dot-blot” (FONSECA; KUHN, 1994), e recentemente identificados via RT-PCR e seqüenciados (EIRAS et al., 2004). A atual distribuição mundial dos viróides está representada na Tabela 2, incluindo os viróides que já foram detectados no Brasil, tanto ocorrendo naturalmente como interceptados no sistema de quarentena (SINGH et al., 2003a; BARTOLINI; SALAZAR, 2003).

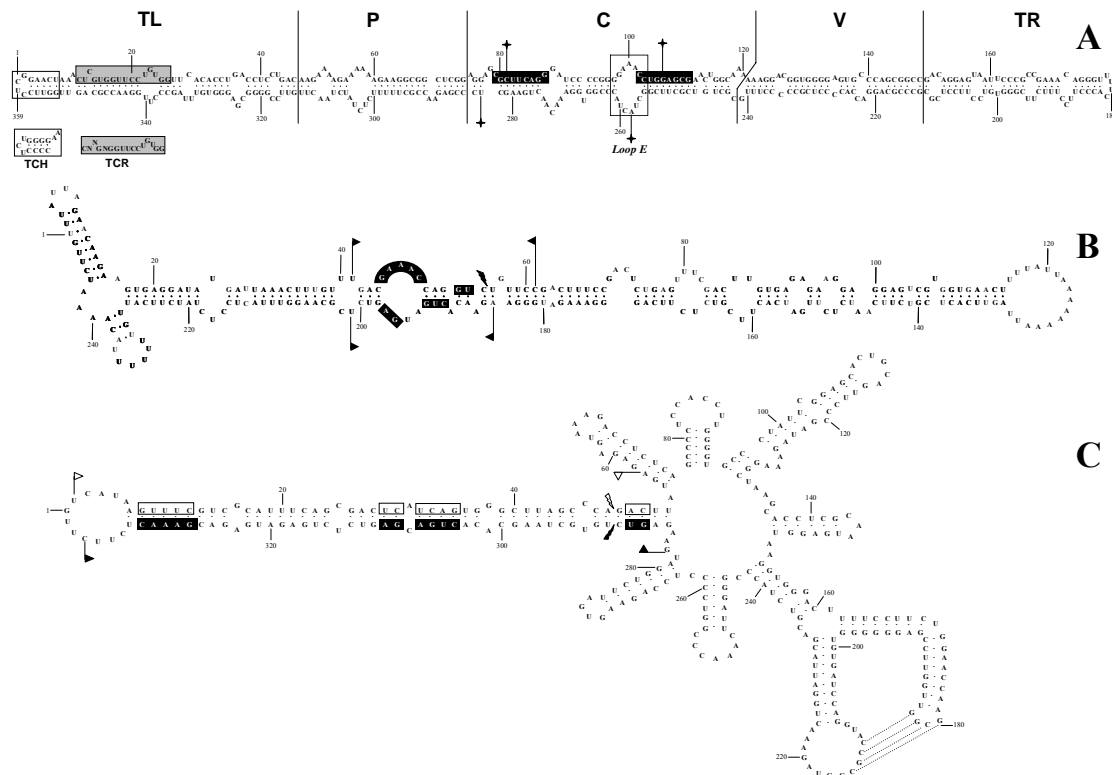


Figura 1 – (A) Estrutura do PSTVd, membro tipo da família *Pospiviroidae*, apresentando os cinco domínios denominados: Domínio C – que contém a Região Central Conservada (CCR, “central conserved region”), delimitada por estrelas; neste domínio também se destaca a presença do “loop E”, elemento de estrutura terciária caracterizado em PSTVd que apresenta homologia com rRNA 5S de eucariontes. Nas caixas negras, estão representados os nucleotídeos das seqüências invertidas responsáveis pela formação do grampo (“hairpin”) I; Domínio P – relacionado à patogenicidade; Domínio V – onde se localiza a maior variabilidade entre viróides que apresentam elevada similaridade; Domínios TL e TR – localizados nas extremidades esquerda e direita da molécula, respectivamente. Estão indicadas também as seqüências TCH (“terminal conserved hairpin”), presente nos gêneros *Hostuviroid* e *Cocadviroid* e TCR (“terminal conserved region”), presente em *Pospiviroid*, *Apscaviroid* e em dois membros do gênero *Coleviroid*. (B) Estrutura secundária do ASBVd, membro tipo da família *Avsunviroidae*, apresentando conformação de (quase) bastonete; (C) Estrutura secundária ramificada do PLMVd, espécie tipo do gênero *Pelamoviroid*, família *Avsunviroidae*. Nas estruturas secundárias do ASBVd e PLMVd destacam-se em caixas os resíduos conservados na maioria das ribozimas cabeça-de-martelo descritas na natureza (caixas cheias e vazias para as polaridades positiva e negativa, respectivamente). As bandeiras delimitam a região da estrutura das ribozimas de cabeça-de-martelo e as flechas apontam para os sítios de auto-corte das moléculas. As linhas descontínuas correspondem à interação do tipo “kissing-loop”

Os sintomas induzidos pelos viróides nas plantas hospedeiras são semelhantes aos induzidos pelos fitovírus, que dificulta o diagnóstico. De fato, para uma série de doenças, inicialmente consideradas de etiologia viral, comprovou-se posteriormente que o agente etiológico era um viróide e não vírus. Os sintomas foliares incluem malformações, epinastia, rugosidade e manchas necróticas e/ou cloróticas. Causam no caule de plantas lenhosas o encurtamento dos

entrenós, descolorações, caneluras e necrose. Finalmente, nos frutos e órgãos de reserva causam deformações, descolorações e necrose (HADIDI et al., 2003). Merece destaque o relato de que plantas de citros infectadas com um complexo de viróides exibiram sintomas similares a exocorte na ausência do CEVd, o que evidencia a importância da caracterização prévia do(s) patógeno(s) implicado(s) no desenvolvimento da doença (ITO et al., 2002).

Como no caso dos vírus, o estudo dos viróides progrediu intensamente quando foram descobertas hospedeiras herbáceas, como o tomate para o PSTVd e a *Gynura aurantiaca* para o CEVd, que são fáceis de cultivar, desenvolvem sintomas específicos em pouco tempo e propiciam uma elevada concentração do patógeno. Contudo, nem sempre têm sido encontradas estas hospedeiras experimentais e é possível que não existam para alguns viróides, com os quais não há alternativa senão trabalhar com a hospedeira natural, ainda que seja lenhosa (em alguns patossistemas naturais, como o abacateiro-ASBVd, o viróide pode se acumular em níveis elevados, o que permite empregá-lo em estudos de replicação) (FLORES et al., 2000).

A via principal de difusão de alguns viróides, sobretudo aqueles que afetam plantas lenhosas de interesse econômico, tem sido o intenso intercâmbio de material propagativo infectado entre distintas áreas do globo. Os viróides são facilmente transmitidos mecanicamente, podendo raramente ser transmitidos por pólen (como exemplo o PSTVd) e por semente (CbVd, ASBVd e CSVd). A transmissão eficiente de viróides por afídeos somente foi relatada para o *Tomato planta macho viroid* (TPMVd). Os viróides também podem ser transmitidos por instrumentos de poda que tenham sido previamente empregados em plantas infectadas (HADIDI et al., 1997).

Tabela 2 – Ano de descoberta e atual distribuição geográfica mundial dos viróides<sup>1</sup>

<b>Espécie</b>	<b>Ano</b>	<b>Distribuição geográfica atual</b>
<i>Potato spindle tuber</i>	1971	Austrália, <b>Brasil</b> <sup>2</sup> , Canadá, Costa Rica, Chile, China, Índia <sup>2</sup> , Nova Zelândia <sup>2</sup> , Rússia, Escócia <sup>2</sup> , USA
<i>Chrysanthemum stunt</i>	1973	<b>Brasil</b> , Itália, Japão, Holanda, Reino Unido, USA
<i>Citrus exocortis</i>	1972	Austrália, <b>Brasil</b> , Chipre, Israel, Japão, Nova Zelândia, Espanha, Peru, USA
<i>Columnnea latent</i>	1989	Canadá, Alemanha, USA
<i>Iresine 1</i>	1996	Alemanha
<i>Tomato apical stunt</i>	1981	Indonésia, Costa do Marfim, Alemanha
<i>Tomato chlorotic dwarf</i>	1999	Canadá, Holanda
<i>Tomato planta macho</i>	1982	México
<i>Hop stunt</i>	1977	Austrália, Áustria, <b>Brasil</b> , França, Alemanha, Hungria, Israel, Japão, Coreia, Taiwan, USA
<i>Coconut cadang-cadang</i>	1975	Filipinas
<i>Citrus IV</i>	1988	Austrália, USA
<i>Coconut tinangaja</i>	1988	Guam
<i>Hop latent</i>	1988	Ásia, <b>Brasil</b> <sup>2</sup> , Europa, África do Sul, Reino Unido
<i>Apple scar skin</i>	1982	Canadá, China, Grécia, Japão
<i>Apple dimple fruit</i>	1996	Itália
<i>Australian grapevine</i>	1988	Austrália
<i>Citrus viroid III</i>	1986	Austrália, Espanha, USA
<i>Citrus bent leaf</i>	1988	Israel
<i>Grapevine yellow speckle 1, 2</i>	1988	Austrália, Alemanha, USA
<i>Pear blister canker</i>	1991	França, Grécia, Itália, Espanha, USA
<i>Coleus blumei-1, 2, 3</i>	1989	<b>Brasil</b> , Canadá, Costa Rica, Alemanha, Índia, Japão, USA
<i>Avocado sunblotch</i>	1979	Austrália, Israel, Peru, África do Sul, Espanha, USA
<i>Peach latent mosaic</i>	1988	Canadá, China, França, Grécia, Itália, Japão, Nepal, Paquistão, Romênia, Espanha, USA, Iugoslávia
<i>Chrysanthemum chlorotic mottle</i>	1975	Dinamarca, França, Índia, USA

Nota: <sup>1</sup>Dados obtidos e modificados de Singh et al. (2003a) e Bartolini e Salazar (2003); <sup>2</sup>Detectado em material quarentenário

### 2.3.2 Replicação

Os viróides se propagam nas plantas hospedeiras como populações de seqüências de RNAs similares mas não idênticas (“*quasispecies*”), derivadas de mutações devido à ausência de mecanismo de correção nas RNA polimerases (DIENER, 1996). Certos domínios presentes nas moléculas de RNA dos viróides são responsáveis pela interação direta com fatores do hospedeiro e influenciam a replicação (BAUMSTARK et al., 1997; SCHRÖDER; RIESNER, 2002). Além disso, a estrutura secundária em determinados domínios pode ser fundamental tanto para o sucesso na replicação como na proteção contra ação de RNAses celulares (DINGLEY et al., 2003). A replicação dos viróides, ao contrário do que os primeiros experimentos sugeriam, se dá exclusivamente através de intermediários de RNA (GRILL; SEMANCIK, 1978). Pela estrutura circular dos viróides, sugeriu-se que poderiam seguir em sua replicação o modelo do círculo rolante proposto anteriormente para a replicação de alguns vírus. O RNA circular infeccioso mais



abundante, ao qual se atribui arbitrariamente a polaridade (+), é reconhecido por uma RNA polimerase celular (ativada, mas não codificada pelo genoma viroidal), que transcreve repetidamente o molde circular dando origem a oligômeros lineares (-), que são processados em tamanhos unitários e fechados por uma RNase e uma RNA ligase, respectivamente. O RNA monomérico circular (-) inicia então a segunda metade do ciclo que é simétrica à primeira, razão da denominação simétrica a esta variante do modelo do círculo rolante.

Na variante alternativa, a assimétrica, os oligômeros lineares (-) servem diretamente de molde de transcrição para a síntese de oligômeros lineares (+), que são cortados e ligados para gerar o produto final, o RNA monomérico circular (+). Assim, este modelo prediz a existência de intermediários oligoméricos, de uma ou ambas polaridades. A identificação de RNAs desta classe em tecidos infectados por vários viróides é uma prova a favor deste modelo (BRANCH; ROBERTSON, 1984). Os dados disponíveis indicam que membros da família *Pospiviroidae* seguem a variante assimétrica (HUTCHINS et al., 1985; BRANCH et al., 1988), enquanto que os da família *Avsunviroidae* a simétrica (DARÒS et al., 1994; FLORES et al., 2004). O mecanismo de replicação pode gerar duplicações em regiões da molécula de RNA, as quais são responsáveis pelo aumento do tamanho das moléculas de determinados viróides conforme tem sido observado para o CCCVd (HASELOFF et al., 1982) e o CEVd (SEMANCIK et al., 1994; FADDA et al., 2003b). As interações com fatores do hospedeiro e a pressão de seleção determinará o sucesso ou não dessas moléculas maiores (FADDA et al., 2003b). Daròs e Flores (2004), estudando a interação de viróides em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com construções diméricas de cDNAs de CEVd, HSVd, CCCVd, ASSVd e ASBVd, mostraram que esta planta, apesar de não ser hospedeira de viróides, apresenta o aparato enzimático necessário para a replicação de viróides representativos da família *Pospiviroidae*. Os autores sugerem que os fatores limitantes para que um viróide colonize plantas de *Arabidopsis* sejam a deficiência no movimento ou a baixa replicação.

Dispõe-se também de dados sobre outras duas atividades enzimáticas requeridas na replicação dos viróides. Experimentos de inibição com  $\alpha$ -amanitina sugerem que no PSTVd e outros viróides relacionados a RNA polimerase implicada é a II nuclear (MÜHLBACH; SÄNGER, 1979; FLORES; SEMANCIK, 1982; SCHINDLER; MÜHLBACH, 1992). Recentemente, Kolonko et al. (2006) determinaram que o sítio de início da transcrição do PSTVd pela RNA polimerase II está localizado no “loop” do domínio terminal esquerdo. Experimentos

paralelos com tagetitoxina sugerem no caso do ASBVd a participação de uma RNA polimerase cloroplástica codificada no núcleo (NAVARRO; FLORES, 2000). Em ambos casos trata-se de RNA polimerases que em condições fisiológicas normais atuam sobre moldes de DNA e que os viróides são capazes de subverter em benefício próprio. Quanto à atividade da RNA ligase, a informação disponível é escassa, mas provavelmente se tratam de enzimas distintas, a nuclear e cloroplástica nos viróides das famílias *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*, respectivamente (FLORES et al., 2005a). Liu e Symons (1998) descreveram transcritos de CCCVd (membro da família *Pospiviroidae*) com capacidade de auto-clivagem *in vitro*, sendo que o motivo de corte está posicionado em uma estrutura conservada em todos os membros desta família, sugerindo que estes viróides podem também se auto-clivar por um ou mais novos tipos de ribozimas distintas das do tipo cabeça-de-martelo (ver mais detalhes a seguir).

### 2.3.3 Ribozimas: RNAs auto-catalíticos

Inicialmente, acreditava-se que as três atividades enzimáticas requeridas eram da célula hospedeira, pois já havia indicações de que os viróides careciam de capacidade codificante. Foi surpreendente descobrir que no ASBVd (HUTCHINS et al., 1986; FORSTER; SYMONS, 1987), e mais tarde em três outras espécies da família *Avsunviroidae* (HERNÁNDEZ; FLORES, 1992; NAVARRO; FLORES, 1997; FADDA et al., 2003a), o processamento dos oligômeros de ambas polaridades aos monômeros lineares correspondentes era mediado por ribozimas (RNAs capazes de catalisar uma reação na ausência total de proteínas) da classe denominada estruturas de cabeça-de-martelo (“*hammerhead*”). Este nome deriva da conformação bidimensional proposta para estas ribozimas, que se assemelha à dita ferramenta e que é constituída por um núcleo central de 11 nucleotídeos conservados, flanqueados por três ramos de nucleotídeos não conservados que formam duplas hélices. Estudos envolvendo cristalografia de raio X (SCOTT et al., 1995), demonstraram que a conformação tridimensional das estruturas em cabeça-de-martelo é mais próxima do tipo  $\gamma$ , com hélice III formando a base, e a I e II, os dois ramos superiores (Fig. 2). Existem provas sólidas de que estas ribozimas são operativas não só *in vitro*, mas também *in vivo* (FLORES et al., 2000). Recentemente, Delgado et al. (2005) demonstraram, empregando técnicas de “*RNase protection*” ou “*RNA-ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends*”, que durante a replicação do PLMVd a polimerização das moléculas inicia em sítios específicos, com as estruturas ribozimáticas do tipo cabeça-de-martelo formadas somente durante a elongação das

fitas. A localização dos sítios de início da transcrição é fundamental para a adequada formação das estruturas ribozimáticas e auto-clivagem (DELGADO et al., 2005).

As ribozimas convenientemente manipuladas têm se mostrado poderosas ferramentas biotecnológicas para degradação de RNAs específicos em plantas transgênicas e outros sistemas (YANG et al., 1997). A presença das ribozimas em alguns viróides tem também importantes implicações evolutivas. Além dos viróides, estas ribozimas têm sido descritas em outros pequenos RNAs (PRODY et al., 1986; DIENER, 1991; SYMONS, 1997). Khovorova et al. (2003) e De La Peña et al. (2003) demonstraram que modificações na periferia das estruturas de cabeça-de-martelo promovem uma redução de 100 vezes na capacidade de auto-clivagem da ribozima. Esses dados indicam que regiões externas ao núcleo central da cabeça-de-martelo desempenham papel chave na catálise e sugerem a existência de interações entre estas regiões periféricas. Outros trabalhos têm sido realizados visando à compreensão dos aspectos que influenciam a eficiência e ação das ribozimas de cabeça-de-martelo, tanto naturais como artificiais, nas possíveis interações com proteínas da hospedeira, às seqüências específicas de nucleotídeos envolvidos em maior ou menor eficiência de clivagem, na ação do pH e na concentração de magnésio (DARÒS; FLORES, 2002; FLORES et al., 2005a).

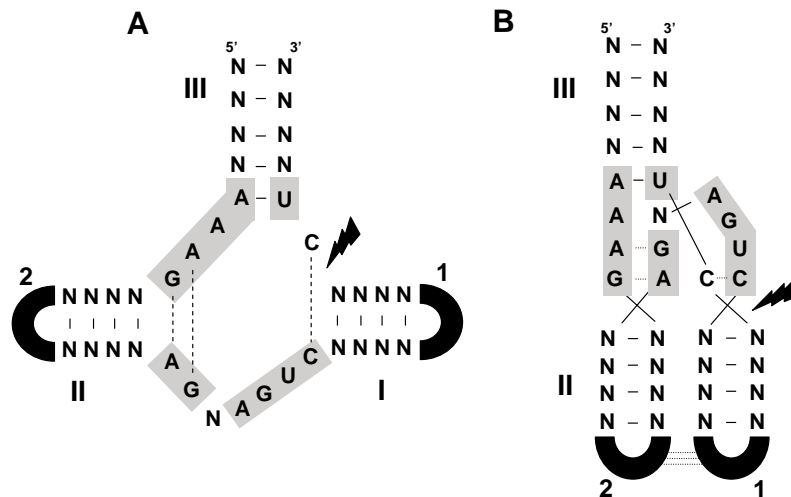


Figura 2 – (A) estrutura secundária consenso da ribozima do tipo cabeça-de-martelo, onde se destacam os onze nucleotídeos conservados presentes na maioria dessas ribozimas encontradas na natureza. Esta estrutura está formada por três hélices (I, II e III) que flanqueiam um “loop” central conservado. Na maioria das ribozimas naturais as hélices I e II estão fechadas por dois pequenos “loops” 1 e 2, respectivamente. A flecha aponta para o ponto de auto-clivagem da molécula; N indica qualquer nucleotídeo possível e linhas contínuas e descontínuas correspondem aos pareamentos Watson-Crick e não-canônicos, respectivamente; (B) modelo derivado de cristalografia de raio-X de uma ribozima artificial onde nota-se que os “loops” 1 e 2 estão fisicamente próximos (interação representada pelas linhas descontínuas).

### 2.3.4 Aspectos biológicos e moleculares da interação viróide/hospedeiro

Como efeito da ausência de proteínas codificadas pelos viróides, parece evidente que estes aparentemente simples RNAs devam interagir com proteínas celulares utilizando-as para mediar diferentes passos no seu ciclo infeccioso (GOZMANOVA et al., 2003; QI; DING, 2003a). Apesar de haver alguns dados sobre o envolvimento da RNA polimerase de plantas hospedeiras na replicação de membros da família *Pospiviroidae* (MÜHLBACH; SÄNGER, 1979; FLORES; SEMANCIK, 1982; SCHINDLER; MÜHLBACH, 1992; WARRILOW; SYMONS, 1999) e da participação de uma proteína de floema no movimento de viróides desta família (GÓMEZ; PALLÁS, 2001; OWENS et al., 2001), pouco se sabe sobre outras interações com proteínas

biologicamente relevantes. Martínez de Alba et al. (2003) identificaram uma proteína (Virp1) de tomateiro capaz de se unir especificamente ao PSTVd. Para membros da família *Avsunviroidae* há somente informações sobre a natureza da RNA polimerase do cloroplasto que provavelmente catalisa a replicação do ASBVd (NAVARRO et al., 2000) e do PLMVd (PELCHAT et al., 2001). Daròs e Flores (2002) reportaram o primeiro caso de uma proteína do hospedeiro (no caso o abacateiro) fisicamente associada ao RNA viroidal, que media a clivagem de uma ribozima de cabeça-de-martelo *in vitro* e presumivelmente *in vivo*, favorecendo o processo de replicação do viróide (ASBVd). Os autores sugerem também que esta família de proteínas, envolvidas no processamento e estabilidade dos transcritos do cloroplasto, esteja relacionada com a preservação do RNA viroidal da degradação atuando como uma “capa protéica”. Além disso, estas proteínas poderiam facilitar o transporte do viróide para o cloroplasto (DARÒS; FLORES, 2002).

No que se refere à localização subcelular, experimentos de hibridização *in situ* combinada com microscopia confocal mostraram que membros representativos da família *Pospiviroidae* acumulam-se no núcleo e alguns deles especificamente no nucléolo (HARDERS et al., 1989). Isto sugere que deve haver sinais que os dirigem aos ditos compartimentos celulares de forma análoga a alguns pequenos RNAs nucleares da célula. Por outro lado, pelo menos dois dos três membros da família *Avsunviroidae*, ASBVd e PLMVd acumulam-se no cloroplasto (BONFIGLIOLI et al., 1994; LIMA et al., 1994; BUSSIÈRE et al., 1999) o que ressalta, uma vez mais, as diferenças entre estas duas famílias. Observou-se também no caso do PSTVd que, além da forma circular mais abundante, os RNAs viroidais de polaridade complementar (que atuam como intermediários no ciclo replicativo) também se localizam no núcleo, o que indica que estes viróides não só se acumulam como também se replicam nesta organela. De forma paralela, o ASBVd se replica e se acumula nos cloroplastos (FLORES et al., 2000). Recentemente, Qi e Ding (2003a), em um elegante trabalho envolvendo hibridização *in situ*, propuseram um modelo para a replicação e transporte do PSTVd no interior do núcleo da célula: (i) após a passagem do viróide do citoplasma para o núcleo, ocorre a síntese das moléculas de ambas polaridades no nucleoplasma; (ii) as moléculas de polaridade negativa (complementar) permanecem no nucleoplasma; (iii) as moléculas de polaridade positiva são transportadas seletivamente para o nucléolo; (iv) após a circularização, as novas moléculas (positivas) retornam ao nucleoplasma e em seguida passam ao citoplasma para serem transportadas célula-a-célula. Assim, como já demonstrado para outros RNAs (LEWIS; TOLLERVEY, 2000), o nucléolo deve ser o sítio de processamento dos membros

da família *Pospiviroidae*, os quais devem conter motivos para a localização e transporte para esta organela (QI; DING, 2003b).

### 2.3.5 Movimento na planta

Os viróides, apesar de seu tamanho mínimo, atuam visando completar seu ciclo infeccioso nas plantas hospedeiras, que além da replicação, inclui movimento intracelular (transporte para o núcleo no caso dos *Pospiviroidae*, e para o cloroplasto para os *Avsunviroidae*), intercelular (célula-a-célula) e a longas distâncias (via floema) (PALUKAITIS, 1987; WOO et al., 1999; ZHAO et al., 2001; ZHU et al., 2001). Ao contrário dos vírus, que codificam suas próprias proteínas de movimento, os viróides devem interagir com fatores do hospedeiro para que possam ser transportados por toda planta. De acordo com Zhu et al. (2001), os viróides que se replicam no núcleo devem apresentar as seguintes fases em seu ciclo infeccioso: (i) importação para o núcleo através dos poros nucleares, antes da replicação; (ii) exportação do núcleo para o citoplasma, após a replicação; (iii) movimento célula-a-célula via plasmodesmata; (iv) movimento a longa distância via floema.

Com relação ao movimento intracelular, Woo et al. (1999), empregando protoplastos permeabilizados, demonstraram que monômeros de PSTVd são transportados do núcleo para o nucléolo e este transporte é mediado pela seqüência-estrutura específica da molécula de RNA viroidal e é independente da interação com o citoesqueleto. Qi e Ding (2003a) demonstraram que moléculas de PSTVd de diferentes polaridades são transportadas e acumulam-se diferencialmente no núcleo e nucléolo, o que indica que fatores da célula hospedeira devem estar implicados no reconhecimento de motivos específicos do RNA viroidal.

Após a replicação e transporte intracelular e acúmulo nas primeiras células, o sucesso da colonização das plantas pelos viróides dependerá da capacidade que estes tenham de se mover célula-a-célula. Este movimento foi estudado, no caso do PSTVd, mediante microinjeções de RNA viroidal em células e protoplastos de mesófilo de fumo e tomate. Os resultados indicaram que o viróide se move célula-a-célula através dos plasmodesmas e que este movimento é determinado por elementos estruturais específicos do RNA viroidal (DING et al., 1997). Além disso, um sofisticado modelo de transporte de RNAs célula-a-célula foi recentemente proposto por Ding et al. (2005). Os autores sugerem que distintos motivos de estrutura secundária do RNA

viroidal devem interagir com fatores específicos do hospedeiro, sendo que esta interação deve regular o transporte em distintas fases do desenvolvimento da planta.

O movimento célula-a-célula culmina com a chegada do viróide ao sistema vascular, onde via floema será distribuído por toda a planta. Experimentos com o patossistema PSTVd/tomateiro revelaram que o viróide se transloca via floema junto com os produtos da fotossíntese (PALUKAITIS, 1987), seguindo a mesma via da maioria dos vírus de plantas (MAULE et al., 2002). Hammond (1994) havia apontado que a estrutura e/ou a estabilidade do domínio TR era essencial para o movimento do PSTVd célula-a-célula e à longa distância, e Palukaitis (1987) sugeriu que para ambos tipos de movimento os viróides deveriam se associar a proteínas da planta hospedeira. Maniataki et al. (2003) descreveram a interação da proteína Virp1 de tomateiro com uma região de 71 nucleotídeos localizada no domínio TR do PSTVd, e Gozmanova et al. (2003) apontaram a importância do motivo RY (denominado assim por sua composição de bases), dentro do mesmo domínio TR, na interação com a proteína Virp1 de tomateiro para o movimento sistêmico do PSTVd. Com experimentos de hibridização *in situ*, Zhu et al. (2001) demonstraram que o PSTVd além de se mover a longas distâncias, também se replica ativamente no floema. Sugeriram também que o movimento do PSTVd via floema possa ser governado por parâmetros celulares e relacionados ao desenvolvimento. O PSTVd foi detectado em plantas de tomateiro e *Nicotiana benthamiana* em células do parênquima floemático, no mesófilo e na epiderme, não tendo sido detectado nos meristemas apical caulinar e laterais. Nos órgãos florais, foi detectado somente nas pétalas, não sendo encontrado nas sépalas, estames e carpelos. No caule, foi detectado em praticamente todos os tecidos como epiderme, córtex, floema e xilema. Os autores observaram também que o PSTVd tem seu movimento direcionado para as folhas jovens (drenos) e não para as folhas fonte (responsáveis pela fotossíntese) durante o desenvolvimento, o que sugere que o viróide segue o padrão de transporte dos fotoassimilados (ZHU et al., 2001). Vale ressaltar que o movimento sistêmico de sinais, para mecanismos de silenciamento gênico segue o mesmo padrão (VOINNET et al., 1998). Zhu et al. (2002), analisando plantas transgênicas transformadas com o PSTVd sob o controle do promotor constitutivo 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), observaram que o PSTVd se replica em todos os órgãos florais. Assim, o fato do PSTVd não ter sido detectado em alguns órgãos florais de plantas não transformadas inoculadas mecanicamente indica que o movimento de RNAs nos vasos não segue simplesmente um fluxo direcionado da fonte para o dreno, ao contrário, é controlado por mecanismos que envolvem a

interação de motivos do RNA viroidal com fatores do hospedeiro. Portanto os viróides podem ser considerados como RNAs exógenos que desenvolveram motivos estruturais que mimetizam motivos de RNAs endógenos de plantas, de maneira que são reconhecidos por fatores celulares que facilitam seu movimento (ZHU et al., 2002). Neste contexto, Qi et al. (2004) identificaram um motivo presente na molécula do PSTVd que media seu transporte unidirecional das células da bainha do floema para o mesófilo. Além disso, os autores com ensaios de hibridização *in situ* demonstraram que o transporte é regulado por fatores relacionados ao desenvolvimento.

Recentemente, Gómez e Pallás (2004), utilizando ensaios de imunoprecipitação, demonstraram que uma proteína de floema de espécies de *Cucurbita* interage com o HSVd *in vivo* formando um complexo ribonucleoprotéico (RNP), que deve permitir que o RNA do HSVd possa se mover via floema. Os autores também caracterizaram a proteína (denominada CsPP2), a qual apresenta um domínio estrutural com propriedades para ligação a RNA, sendo que o possível envolvimento no transporte de um RNP sugere que essa proteína atue como uma chaperona (GÓMEZ; PALLÁS, 2004). Não há dados disponíveis sobre o movimento dos *Avsunviroidae*.

### 2.3.6 Silenciamento gênico

A ativação de mecanismos de defesa do hospedeiro do tipo silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) tem sido relatada para viróides (ITAYA et al., 2001; PAPAETHIMIOU et al., 2001; MARTÍNEZ DE ALBA et al., 2002). Em muitos casos, esses mecanismos são insuficientes para impedir a indução de efeito patogênico (DIENER, 1999). O PTGS, mecanismo que regula a expressão gênica em eucariontes, resulta em degradação de RNAs de fita simples (ssRNAs) e é ativado por RNAs de fita dupla (dsRNAs) derivados em muitos casos de ssRNAs que alcançam níveis anormais na célula e servem como molde para a RNA polimerase dependente de RNA. Esses dsRNAs são subseqüentemente processados em fragmentos de 21 a 25 nucleotídeos, denominados pequenos RNAs interferentes (siRNAs) (VANCE; VAUCHERET, 2001; BAULCOMBE, 2002), que são considerados marcadores desse fenômeno por estarem sempre associados a sistemas exibindo PTGS. Recentemente, siRNAs homólogos às fitas positiva e negativa do PSTVd foram detectados em plantas infectadas por este viróide, indicando que o PSTVd induz PTGS (ITAYA et al., 2001; PAPAETHIMIOU et al., 2001). Martínez de Alba et al. (2002) observaram também para dois viróides da família *Avsunviroidae* a presença de siRNAs indicando que o PLMVd e o *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* – CChMVd (NAVARRO;



FLORES, 1997) são indutores de PTGS. Porém o mesmo não se verificou para o ASBVd, que se acumula em níveis elevados no tecido da hospedeira enquanto que PLMVd e CChMVd apresentam baixas concentrações. Esta correlação inversa entre acúmulo do viróide e a presença ou ausência dos siRNAs é consistente com o envolvimento dos últimos em uma resposta de defesa do tipo PTGS do hospedeiro que atenuaria o efeito dos viróides reduzindo seu título. Markarian et al. (2004) demonstraram que o ASBVd também é alvo de PTGS, particularmente em áreas sintomáticas observando uma direta correlação entre a concentração de siRNAs e do viróide. Os mesmos autores analisaram também plantas de *Gynura* infectadas com dois variantes de CEVd, que causam sintomas severos e fracos, e verificaram que os níveis de acúmulo de siRNAs estão relacionados com a severidade dos sintomas e não com o título do viróide.

Wang et al. (2004) sugerem que o silenciamento de RNA em plantas desempenha um importante papel nos mecanismos de patogenicidade de viróides e VL-satRNAs (ver mais adiante), e também na evolução de suas estruturas secundárias. De acordo com esta hipótese, viróides e VL-satRNAs causariam sintomas pela atuação de seus siRNAs como microRNAs (uma classe de pequenos RNAs endógenos implicados na regulação do desenvolvimento em plantas e outros organismos) que silenciariam mRNAs fisiologicamente importantes do hospedeiro. Em acordo com esta proposição, Denti et al. (2004) estudando silenciamento no patossistema PSTVd-tomateiro, encontraram siRNAs predominantemente no citoplasma. Por outro lado, os viróides e VL-satRNAs, por não codificarem proteínas próprias, supressoras de silenciamento, devem garantir sua existência e seu sucesso ao longo da evolução utilizando exclusivamente estratégia baseada em sua seqüência e estrutura secundária, o que os tornam significativamente resistentes à degradação mediada pelo silenciamento de RNA (WANG et al., 2004).

### 2.3.7 Patogênese

Os viróides induzem enfermidades em culturas de importância econômica de plantas tanto herbáceas como lenhosas. Em alguns casos, seus efeitos podem ser devastadores como sucedeu com o CCCVd que matou mais de vinte milhões de coqueiros no sudoeste asiático. Em outros casos, a infecção transcorre de forma latente, sem sintomas perceptíveis na hospedeira natural como é o caso do CLVd. Alguns viróides apresentam círculo de hospedeiras restrito, como na família *Avsunviroidae* cujo membro tipo, o ASBVd, só infecta abacateiro e cinamomo (família Lauraceae). Certos membros da família *Pospiviroidae* também apresentam poucas hospedeiras,

como o ASSVd que infecta apenas macieira e pereira e o CCCVd que infecta palmáceas. Já o PSTVd, HSVd, CSVd e o CEVd apresentam amplo círculo de hospedeiras, podendo no caso do PSTVd infectar mais de 160 espécies em 13 famílias botânicas (SINGH et al., 2003b).

Trabalhos recentes, envolvendo padrão de expressão de genes em hospedeiras infectadas, têm sido realizados por meio de análise de “macroarrays” para viróides (ITAYA et al., 2002). Entretanto, mesmo com a utilização de técnicas sofisticadas de análise de expressão gênica e hibridização comparativa, há dificuldade de associação de interações moleculares e expressão de sintomas. A expressão dos sintomas e os níveis de severidade observados em uma determinada hospedeira são, muitas vezes, determinados por diferenças mínimas de seqüências de nucleotídeos entre as variantes de um viróide (GROSS et al., 1981; SCHNÖLZER et al., 1985; VISVADER; SYMONS, 1986; SKORIC et al., 2001). Essas diferenças, porém, podem resultar em mudanças na estrutura secundária da molécula com conseqüente influência na ligação a fatores da hospedeira e expressão dos sintomas (SCHMITZ; RIESNER, 1998). Poucos estudos têm demonstrado que elementos não codificantes de genomas de RNA podem controlar o desenvolvimento de sintomas via interação entre estruturas do RNA e fatores do hospedeiro. Porém, parece evidente que interações entre fatores do hospedeiro e seqüências específicas de RNA devem ter um papel na patogênese, e ao mesmo tempo promover o sucesso dos viróides, vírus e RNAs satélites na colonização dos tecidos vegetais (MAULE et al., 2002). Qi e Ding (2003a) demonstraram que a infecção do PSTVd em tomateiro causa restrição na expansão celular mas não altera divisão e diferenciação, o que leva ao encurtamento dos entrenós e diminuição do tamanho das folhas. Por outro lado, uma série de evidências sugere que mecanismos de fosforilação de proteínas desempenham um importante papel na patogenicidade dos viróides (HIDDINGA et al., 1988), e neste contexto Hammond e Zhao (2000) caracterizaram uma proteína quinase de tomateiro que tem sua transcrição ativada pelo PSTVd. Qi e Ding (2003a), analisando o patossistema PSTVd/tomateiro, identificaram que a modificação de um nucleotídeo no “*loop E*” da região central conservada confere uma condição letal às plantas de tomateiro inoculadas, além de promover a inibição do crescimento celular e do desenvolvimento da parte aérea. Os mesmos autores em estudos prévios analisaram substituições nesse mesmo motivo “*loop E*”, e embora não tenham ocorrido alterações na estrutura do RNA, houve aumento dos níveis de transcrição em até 100 vezes em células de fumo (QI; DING, 2002). Isso indica que o motivo supra citado de PSTVd deva atuar no processamento, transcrição e patogenicidade (QI; DING, 2003a). Um papel

patogênico similar ao desempenhado pelo “loop E” em PSTVd seria desempenhado por um “tetraloop” em CChMVd, sendo que uma simples mutação no “tetraloop” pode converter uma variante sintomática em assintomática (DE LA PEÑA et al., 1999, DE LA PEÑA; FLORES, 2002).

Após a introdução do viróide na planta hospedeira, o primeiro evento relacionado à patogênese envolve a interação entre o RNA viroidal e fatores do hospedeiro de natureza desconhecida. Estudos relacionando seqüências ou estruturas determinantes de patogenicidade têm sido realizados, principalmente com o PSTVd e outros membros da família *Pospiviroidae*, pela facilidade de realização de ensaios biológicos e por possuírem hospedeiras herbáceas (GROSS et al., 1981; SCHNÖLZER et al., 1985; VISVADER; SYMONS, 1986; SANO et al., 1992; SCHMITZ; RIESNER, 1998; REANWARAKORN; SEMANCIK, 1998). Trabalhos dessa natureza para membros da família *Avsunviroidae* têm sido limitados pela dificuldade de realização de ensaios biológicos, pelo limitado número de hospedeiras e pelo normalmente longo período de tempo após a inoculação, necessário para o aparecimento de sintomas (SEMANCIK; SZYCHOWSKI, 1994; AMBRÓS et al., 1998; MALFITANO et al., 2003; DE LA PEÑA et al., 1999). Um outro fator que dificulta os estudos de aspectos ligados a patogenicidade do PLMVd é a elevada variabilidade deste viróide (AMBRÓS et al., 1998). Já o CChMVd, quando inoculado em plantas de crisântemo, exibe sintomas entre 8 e 10 dias (NAVARRO; FLORES, 1997). Além disso, a ocorrência de estirpes severas e latentes deste viróide permitiu a identificação via mutagênese sítio dirigida de motivos específicos, possibilitando estudos experimentais de proteção cruzada e de evolução destes patógenos *in vivo* (DE LA PEÑA; FLORES, 2002).

A construção de quimeras contendo seqüências derivadas de variantes de um simples viróide (GÓRA et al., 1996; VISVADER; SYMONS, 1986), de viróides relacionados (SANO et al., 1992) e de viróides de diferentes gêneros (SANO; ISHIGURO, 1998), tem indicado que a patogênese é controlada por determinantes distribuídos em uma ou mais regiões da molécula. Fatores que determinam o círculo de hospedeiras dos viróides são pouco conhecidos, porém mutações de ponto na região central conservada podem alterar o círculo de hospedeiras e a eficiência de replicação do PSTVd (WASSENEGGER et al., 1996; ZHU et al., 2002). Em membros da família *Pospiviroidae*, mutações têm sido associadas a domínios específicos similares para o PSTVd e CEVd com importantes efeitos na patogenicidade (VISVADER; SYMONS, 1986; SANO et al., 1992). Mutações que geram alterações na conformação de regiões

associadas à patogenicidade e presumivelmente nas interações RNA-proteína têm sido relatadas para alguns viróides (OWENS et al., 1996; SCHMITZ; RIESNER, 1998). O motivo da estrutura secundária RY localizado no domínio TR do PSTVd também parece determinar o círculo de hospedeiros (GOZMANOVA et al., 2003). Owens et al. (2003) ao compararem as propriedades estruturais das quimeras PSTVd/CLVd (construídas artificialmente) sugeriram que interações entre nucleotídeos no domínio de patogenicidade e no “*loop*” do domínio terminal direito (TR) desempenham um papel crítico na replicação e movimento do CLVd. Além disso, resultados de bioensaios indicaram que mudanças na porção direita do domínio de patogenicidade tiveram efeito acentuado na infectividade do CLVd.

Em CChMVd, conforme já comentado, uma alteração no “*tetraloop*” da conformação ramificada tem sido identificada como determinante da patogenicidade (DE LA PEÑA; FLORES, 2002). Malfitano et al. (2003), analisando variantes de PLMVd de plantas de pêssogo com sintomas de forte clorose nas folhas, talos e frutos conhecidos como “*peach calico*”, estabeleceram uma relação causal entre esses sintomas e uma inserção de 12 a 13 nucleotídeos na molécula do RNA viroidal. Este caso difere do comumente observado para viróides em que substituições ou inserções/deleções de um pequeno número de nucleotídeos são associadas com patogenicidade. A associação dos sintomas causados pelas variantes de PLMVd em pessegueiro e por variantes de ASBVd em abacateiro, viróides com propriedades biológicas e estruturais distintas, indica que efeitos fenotípicos similares podem ser causados por diferentes interações moleculares (MALFITANO et al., 2003).

Ao nível citológico têm sido observadas diversas alterações que afetam a parede celular e a membrana plasmática em plantas infectadas com o CEVd, e malformações dos cloroplastos em plantas infectadas pelo ASBVd (isto provavelmente como consequência da localização do ASBVd nesta organela). Em tecidos com sintomas induzidos pelo CEVd tem-se detectado o acúmulo de uma série de proteínas denominadas PR (“*pathogenesis related*”), que incluem enzimas hidrolíticas do tipo proteases, glucanases e quitinases, ou de óxido-redução como peroxidases além de modificações nos níveis de certos hormônios como o etileno. É possível que estas alterações formem parte da cadeia de transdução do sinal que conecta o efeito patogênico primário com os sintomas macroscópicos. Desconhece-se, contudo, o fator da célula hospedeira que interage inicialmente com o RNA viroidal determinando o efeito patogênico primário (SEMANCIK, 2003).

## 2.4 Virusóides: pequenos RNAs satélites circulares

Os satélites são agentes subvirais que, diferentemente dos viróides, não se replicam de forma autônoma, sendo sua replicação dependente da co-infecção de uma célula hospedeira com um vírus auxiliar. Os ácidos nucléicos dos satélites caracterizam-se por seqüências que são substancialmente distintas das de seus vírus auxiliares e de suas hospedeiras e nele se diferenciam dos RNAs defectivos interferentes (DI) e dos RNAs defectivos que derivam em sua totalidade do genoma do vírus auxiliar (RUBINO et al., 2003). Entretanto, os ácidos nucléicos de satélites e do vírus auxiliar correspondente podem compartilhar seqüências curtas, normalmente nas extremidades da molécula; um *replicon* quimérico com seqüências que provêm de um RNA satélite (satRNA) e de seu vírus auxiliar foi descrito por Simon e Howell (1986). A presença de um satélite também pode afetar o nível de acúmulo do vírus auxiliar. Por todas as características anteriores, consideram-se os satélites como parasitas moleculares de seus vírus auxiliares.

Normalmente, a relação vírus auxiliar/satélite é específica enquanto que a replicação de um satélite particular só é mantida por uma espécie de vírus, ou por um grupo de espécies relacionadas. Porém, não há correlação entre a taxonomia dos satélites e a de seus vírus auxiliares, sendo que um determinado vírus pode ter satélites taxonomicamente distintos. Isto sugere que o “satelitismo” evoluiu independentemente uma série de vezes (VOGT; JACKSON, 1999). A epidemiologia dos satélites está condicionada por características do vírus auxiliar (VOGT; JACKSON, 1999). Diferentemente, a disseminação dos viróides, por não dependerem de um vírus auxiliar e por não apresentarem envolvimento com vetores, é dada pelas práticas agrícolas (DIENER, 2001). Do mesmo modo, o controle das enfermidades associadas aos satélites é como o das causadas pelo vírus auxiliar.

Os satélites não formam uma unidade taxonômica, já que é um grupo muito mais heterogêneo que os viróides. Há satélites que codificam proteínas que se expressam *in vivo* e satélites que são ácidos nucléicos não codificantes. Quando a proteína codificada pelo satélite é uma proteína estrutural, são referidos como **vírus satélites**, que se encontram como componentes nucleoprotéicos diferenciados nas preparações purificadas do vírus auxiliar. Os satélites que não codificam proteínas estruturais são denominados **ácidos nucléicos satélites**. Os vírus ou ácidos nucléicos satélites não são necessários para a multiplicação dos vírus auxiliares, porém têm sido descritas moléculas de RNA com características de satélite que não são necessárias para que o vírus auxiliar infecte em condições experimentais, mas que podem ser necessárias para que

complete seu ciclo em condições naturais. Também têm sido descritos **agentes subvirais do tipo satélite** que dependem de um vírus auxiliar para serem encapsidados, mas não para sua replicação (SYMONS, 1997; HULL, 2002; RUBINO et al., 2003).

O termo satélite foi cunhado por Kassanis (1962) para denominar as partículas de 17 nm de diâmetro associadas com o *Tobacco necrosis virus* (TNV) e dependentes deste para seu acúmulo. A partir daí, o termo satélite se estendeu para incluir ácidos nucleicos satélites. A maioria dos satélites descritos são RNAs de fita simples que se associam a vírus de RNA, mas também existem satélites que são DNAs de fita simples e RNAs de fita dupla. Além dos satélites que se associam a vírus de plantas, há também aqueles associados a vírus de insetos, de protozoários e de fungos (MAYO et al., 2000). Os satélites têm sido considerados modelos apropriados para o estudo de aspectos fundamentais a virologia, como os processos de replicação, encapsidação, patogênese, recombinação e variabilidade genética. As relações, geralmente complexas, entre satélites e vírus auxiliar suscitam questões interessantes de biologia evolutiva sobre os satélites (COLLMER; HOWELL, 1992; VOGT; JACKSON, 1999). Apesar dos recentes avanços da biologia molecular, o conhecimento é ainda escasso em questões fundamentais tais como: (i) de que maneira a maquinaria de replicação do vírus auxiliar replica os satélites? (ii) como os satélites alteram o acúmulo e a patogênese do vírus auxiliar? (iii) e qual a origem dos satélites e como eles influenciaram as populações do vírus auxiliar?

Os agentes subvirais do tipo RNA satélite com estrutura do tipo viróide (*viroid-like satellite RNAs* - **VL-satRNAs**) são subdivididos em membros dependentes de um vírus auxiliar do gênero *Sobemovirus*, os quais são encapsidados como moléculas circulares com forte estrutura secundária (esses RNAs satélites são denominados **virusóides**) e membros dependentes de um vírus auxiliar dos gêneros *Nepovirus* e *Polerovirus*, os quais são encapsidados na forma linear (MAYO et al., 2000; RUBINO et al., 2003). Juntamente com os viróides, os **virusóides** são os menores agentes infecciosos conhecidos. Apresentam características físicas de viróides, porém diferem na seqüência, função e biologia (SYMONS; RANGLES, 1999). Foram primeiramente relatados como satélites do *Velvet tobacco mottle virus* (VTMoV). Posteriormente, demonstrou-se que um isolado de VTMoV livre de satélite poderia encapsidar o PSTVd (FRANCKI et al., 1986), o que sugere a possibilidade de que viróides devam ser RNAs satélites que escaparam, e que inicialmente eram auxiliados em sua replicação e transmissão por um vírus auxiliar.

Em alguns casos (p.ex., os VL-satRNAs do *Tobacco ringspot virus* - TRSV e do *Barley yellow dwarf virus* - BYDV), o VL-satRNA atenua os sintomas do vírus auxiliar e reduz seu acúmulo. Nos outros (p.ex. VTMoV) os VL-satRNAs agravam consideravelmente os sintomas do vírus auxiliar (RUBINO et al., 2003). Os VL-satRNAs têm um tamanho de 220-457 nt. Em tecidos infectados, são encontrados em suas formas circular e linear, mas o vírus auxiliar encapsida preferencialmente as formas lineares (no caso de *Polerovirus* e *Nepovirus*) ou circulares (*Sobemovirus*). Os VL-satRNAs não têm atividade de RNA mensageiro, ainda que alguns possuam ORFs potenciais. Todos os VL-satRNAs dos sobemovírus e dos polerovírus caracterizados até o momento que apresentam domínios com atividade de ribozima são do tipo cabeça-de-martelo e aparecem, em sua maioria, nas cadeias de polaridade positiva: RNAs satélites do *Solanum nodiflorum mottle virus* (SNMoV), do *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV), do VTMoV, e do *Rice yellow mottle virus* (RYMV). No caso dos RNAs satélites do *Lucerne transient streak virus* (LTSV, *Sobemovirus*) e do BYDV (*Polerovirus*) as ribozimas são encontradas em ambas polaridades. Os VL-satRNAs dos nepovírus (*Tobacco ringspot virus* - TRSV, *Chicory yellow mottle virus* - CYMV e *Arabis mosaic virus* - ArMV) têm ribozimas com estrutura de cabeça-de-martelo na cadeia positiva e com estrutura em forquilha (“*hairpin*”) na cadeia negativa (MAYO et al., 2000; RUBINO et al., 2003).

A replicação dos VL-satRNAs ocorre por meio de um mecanismo de círculo rolante conforme descrito para os viróides (e por isto são chamados também de satRNAs do tipo viróide), sendo que para alguns foi demonstrado que ocorre auto-corte mediado por ribozimas das cadeias multiméricas lineares para dar lugar às formas monoméricas. As ribozimas que apresentam estrutura de cabeça-de-martelo promovem auto-corte do RNA, enquanto que as que têm estrutura do tipo forquilha catalisam tanto o corte como a ligação do RNA (BUZAYAN et al., 1986; PRODY et al., 1986; FORSTER; SYMONS, 1987). Deve-se destacar que, pelo menos para um RNA com estas características, foi encontrada uma contrapartida de DNA, formando um elemento do tipo “retroviróide” (DARÒS; FLORES, 1995). Vera et al. (2000) obtiveram evidências do possível envolvimento de uma transcriptase reversa do *Carnation etch ring virus* (CERV) na origem desse retroviróide. Em animais também tem sido relatada a ocorrência de RNAs similares aos viróides. O RNA do *Hepatitis delta virus* (HDV) depende para sua encapsidação do *Hepatitis B virus* (HBV), e apresenta características estruturais e mecanismo de replicação comuns aos

viróides e VL-satRNAs, como molécula circular com forte estrutura secundária e ribozimas específicas presentes nas duas polaridades (TAYLOR, 1999; HARRIS; ELDER, 2000).

## **2.5 Origem e evolução dos viróides e virusóides: uma viagem ao mundo de RNA**

Diener (1996) aponta os viróides como os patógenos que apresentam os processos evolucionários mais dinâmicos entre os sistemas biológicos conhecidos. A presença de estruturas periódicas com repetições de nucleotídeos, o tamanho reduzido do genoma e a atividade auto-catalítica caracterizam os viróides como moléculas muito antigas que podem ser considerados “fósseis vivos” (DIENER, 1989; 2001). Há outras hipóteses sobre a possível origem dos viróides: (i) a primeira delas sugere que os viróides poderiam ter se originado a partir de elementos genéticos transponíveis ou de retrovírus, pois há certas semelhanças de seqüência entre a CCR de alguns viróides e os extremos de uma região polipurínica que também está presente em retrovírus (KIEFER et al., 1983); (ii) Numa segunda hipótese, os viróides seriam “introns fugitivos”, pois foram observadas certas semelhanças de seqüência entre viróides e introns do grupo I. Além disso, viróides e introns do grupo I têm tamanhos similares e alguns deles são capazes de auto-processamento (corte e circularização) (HADIDI, 1986; CECH, 1990). Entretanto, análises mais detalhadas demonstraram que o mecanismo auto-catalítico é muito diferente em ambos os casos e, além disso, apesar de repetidos esforços não foi encontrada em viróides uma contrapartida de DNA homólogo como ocorre com os introns.

Comparações entre seqüências de nucleotídeos de viróides e RNAs satélites indicam que estes constituem um grupo monofilético, apresentando como ancestrais os viróides auto-catalíticos (ELENA et al., 1991). Outros resultados apontam para uma origem quimérica do RNA do HDV, a partir de um RNA do tipo viróide que capturou um RNA mensageiro codificando uma proteína que favoreceria sua replicação (BRAZAS; GANEM, 1996). O descobrimento da atividade catalítica em alguns RNAs viroidais reforçou a idéia de que previamente ao mundo celular atual, baseado em DNA e proteínas, existiu provavelmente um “Mundo de RNA” (“*RNA world*”) em que tanto as macromoléculas que armazenavam como as que expressavam a informação genética eram de RNA (GILBERT, 1986). Os viróides e os VL-satRNAs poderiam ser relíquias evolutivas dessa era antiga (DIENER, 1989). A estrutura dos RNAs do tipo viróide, e em particular seu pequeno tamanho e alto conteúdo de G+C, teriam permitido superar a baixa fidelidade de cópia dos primitivos sistemas replicativos e, por outro lado, sua estrutura circular



teria dispensado os sinais de início e término da replicação. Porém, o argumento que mais reforça esta hipótese é a presença nos viróides da família *Avsunviroidae* e em todos os VL-satRNAs de ribozimas estruturalmente muito simples que poderiam ter catalisado a replicação durante as etapas iniciais da evolução da vida na Terra (DIENER, 1989; LANDWEBER et al., 1998). Posteriormente, os viróides teriam adquirido uma dependência da célula hospedeira (os VL-satRNAs de um vírus auxiliar), convertendo-se assim em parasitas intracelulares. A atividade ribozimática presente em alguns RNAs do tipo viróide seria um vestígio de seu passado evolutivo (DIENER, 1996; 2001; ELENA et al., 1991; 2001).

Há também fortes evidências que suportam a hipótese de que cloroplastos são organelas que evoluíram de cianobactérias por simbiose (MARGULIS, 1993; MARTIN, 1999), sugerindo que estes procariontes de vida livre poderiam ter hospedado viróides, principalmente os ancestrais da família *Avsunviroidae*, anteriormente à colonização das plantas superiores. Isso implica que os membros da família *Avsunviroidae* sejam os viróides mais antigos (LIMA et al., 1994; FLORES et al., 2000; DARÒS et al., 2006). Análises filogenéticas são consistentes com essas suposições e também sugerem que viróides possam estar presentes atualmente em cianobactérias (ELENA et al., 1991; FLORES et al., 2000).

A análise detalhada das seqüências dos viróides mostra também que alguns deles parecem ter surgido como quimeras resultantes da recombinação de duas ou mais seqüências parentais que estariam co-infetando a mesma hospedeira (KEESE; SYMONS, 1985). Portanto, a história evolutiva dos viróides pode ter sido moldada por fenômenos de recombinação similares aos que têm sido descritos para vírus. O exemplo mais representativo de recombinação entre viróides é o caso do CLVd que é formado por um mosaico de seqüências provenientes de PSTVd, TPMVd, HSVd e TASVd (HAMMOND et al., 1989). Esta natureza quimérica, em nível estrutural, manifesta-se também em suas propriedades biológicas, pois o CLVd compartilha a gama de hospedeiras de dois de seus parentes presumíveis, o PSTVd e o HSVd (HAMMOND, 2003).

Há outra fonte de variabilidade genética que merece destaque. Há algum tempo sabe-se que os genomas de RNA são capazes de variar e evoluir muito mais rapidamente que os de DNA (JOYCE, 1989). A diferença principal entre ambos os sistemas reside na existência de tamanhos populacionais muito grandes nos genomas de RNA e numa baixa fidelidade de replicação dos mesmos em comparação com os de DNA. Isto se deve à ausência de uma atividade corretora de erros nas polimerases de RNA, assim como de mecanismos pós-replicativos de reparação que

operam em sistemas baseados no DNA. O resultado final é que os vírus de RNA e os viróides se propagam em suas hospedeiras como um conjunto de seqüências estreitamente relacionadas, mas não idênticas que formam o que se denomina uma quase espécie (*quasispecies*) viral ou viroidal (DOMINGO; HOLLAND, 1994). Estas populações de moléculas, flutuantes no espaço e no tempo, conferem aos vírus de RNA e aos viróides sua grande plasticidade e, como conseqüência, sua capacidade de evadir de pressões evolutivas adversas. Deve-se ressaltar, contudo, que esta plasticidade tem uma série de restrições que impedem a fixação de mutações em regiões da molécula que determinam algumas funções chave. É o caso dos nucleotídeos que formam o núcleo central das estruturas em cabeça-de-martelo onde não se observa variabilidade (AMBRÓS et al., 1998; FLORES et al., 2001).

Os satélites constituem um grupo altamente heterogêneo, e por não haver correlação entre sua taxonomia e de seus vírus auxiliares, provavelmente apresentam origens distintas. Uma origem comum para as ribozimas cabeça-de-martelo e *hairpin* foi recentemente proposta por Harris e Elder (2000). Elena et al. (2001) sugerem que as ribozimas do tipo cabeça-de-martelo possam ser o elo evolucionário de ligação entre viróides e RNAs satélite do tipo viróide, que teriam uma origem filogenética comum. Seqüências do tipo cabeça-de-martelo não ativas foram recentemente relatadas para variantes do HSVd, membro da família *Pospiviroidae*, cujos membros carecem de ribozimas (AMARI et al., 2001). Viróides e VL-satRNAs contêm seqüências e estruturas na molécula que atuam como sinais necessários para interagir com fatores e enzimas da célula hospedeira e conseqüentemente completar seu ciclo infeccioso. Para os viróides alguns destes sinais têm sido identificados, como exemplo o sítio de início da transcrição e possíveis seqüências promotoras para o ASBVd (NAVARRO; FLORES, 2000); para o PSTVd os dados obtidos são contraditórios (TABLER; TSAGRIS, 2004). Pouco se conhece sobre sinais presentes nas moléculas de VL-satRNAs; contudo, possíveis sinais de reconhecimento devem estar presentes, considerando que os vírus auxiliares suportam um grande número desses satélites (SEHGAL et al., 1993). Conforme anteriormente mencionado, viróides e VL-satRNAs poderiam derivar de moléculas auto-replicativas anteriores ao mundo celular baseado no DNA, que teriam passado a depender para sua replicação de uma hospedeira (os viróides) ou de uma planta e um vírus auxiliar (VL-satRNAs). Esta hipótese ligaria os VL-satRNAs e viróides em um processo evolutivo em que teria havido perda de autonomia replicativa (RUBINO et al., 2003).

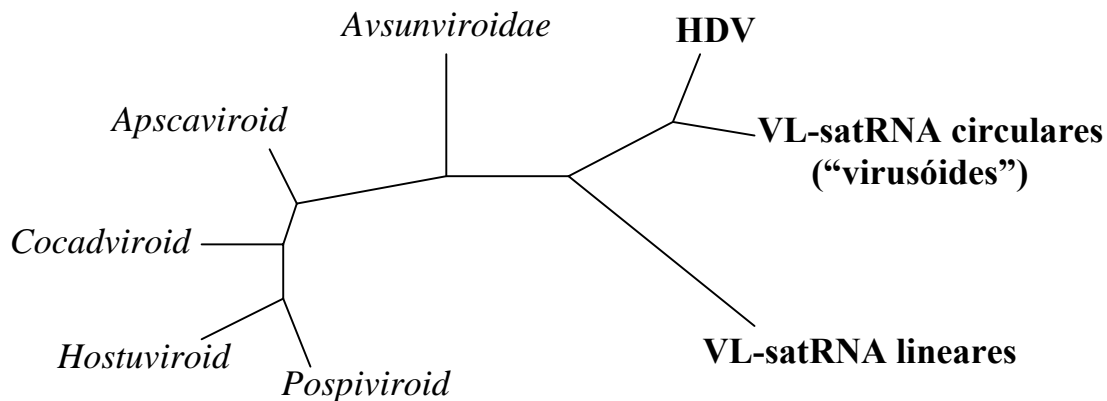


Figura 3 – Árvore filogenética obtida pelo alinhamento das seqüências de RNAs de viróides, VL-satRNAs e o domínio viroidal do RNA do *Hepatitis delta virus* (HDV). A distribuição indica uma origem monofilética para estes agentes subvirais, sendo os membros da família *Avsunviroidae* os prováveis ancestrais tanto dos *Pospiviroidae* (à esquerda) como dos satélites (à direita). Modificado de Elena et al. (1991). Ver texto para maiores detalhes

## 2.6 Considerações finais: perspectivas futuras para moléculas do passado

Os vírus, até meados do século XX, eram considerados os representantes mais simples da escala biológica (HULL, 2002). A descoberta dos satélites e dos viróides (KASSANIS, 1962; DIENER, 1971) foi surpreendente, pois a partir de então se comprovou a existência de uma nova classe de parasitas intracelulares ainda mais simples denominados agentes subvirais, que passou a compor diferentes linhas de pesquisa visando sua caracterização e entendimento. Atualmente, os viróides e os VL-satRNAs são considerados o nível mais baixo da escala biológica com origem evolutiva independente dos vírus (ELENA et al., 1991, 2001). A simplicidade dos viróides e dos VL-satRNAs e o fato de que a molécula de RNA deve interagir diretamente com componentes celulares do hospedeiro para o desenvolvimento do seu ciclo infeccioso, colocam esses agentes como um interessante modelo para o estudo dos processos biológicos e moleculares envolvendo aspectos da interação patógeno/hospedeiro (DIENER, 2001; RUBINO et al., 2003). Portanto, avanços nos estudos dos mecanismos da interação viróide/hospedeiro deverão auxiliar no entendimento dos processos de regulação da expressão gênica mediado por RNAs e permitirão o

desenvolvimento de motivos artificiais de RNA como ferramentas moleculares para o estudo de processos biológicos específicos (QI; DING, 2003a).

O conhecimento atual dos mecanismos envolvidos nas diversas interações dos viróides e VL-satRNAs com fatores do hospedeiro, apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, ainda é escasso. A compreensão de como RNAs patogênicos que não codificam proteínas próprias desenvolveram a capacidade de completar seu ciclo infeccioso nas plantas hospedeiras, os mecanismos moleculares das interações RNA-RNA e RNA-proteína, a ativação e repressão de processos que regulam a expressão gênica, a regulação da expressão de sintomas e o recrutamento de fatores da célula para a replicação e movimento na planta apresentam questionamentos para pesquisas futuras.

Outras aplicações para moléculas de RNA e motivos como ribozimas cabeça-de-martelo têm sido intensamente estudadas. Nas últimas décadas diversas empresas farmacêuticas têm investido no desenvolvimento de ribozimas artificiais para utilização em *trans* visando o controle de vírus humanos como hepatite C e o *Human immunodeficiency virus* (HIV) (PERSIDIS, 1997). Outras aplicações para as ribozimas em estudos de evolução *in vitro* (TSANG; JOYCE, 1996), no controle de viróides via plantas transgênicas (YANG et al., 1997) e nos estudos de interação de moléculas de RNA com fatores do hospedeiro (DARÒS; FLORES, 2002) têm sido recentemente relatados e provavelmente continuarão sendo alvo de discussões sobre o potencial biotecnológico das ribozimas, abrindo um futuro promissor para estas moléculas do passado.

Com origens distintas e incertas e com relações evolutivas pouco conhecidas, os agentes subvirais apresentam um contínuo de relações complexas com outros agentes patogênicos e com suas plantas hospedeiras que fazem seu estudo intrigante e ao mesmo tempo fascinante. Nos últimos 30 anos, desde a descoberta dos RNAs auto-catálíticos, houve uma profunda reviravolta no pensamento evolutivo pois acreditava-se que essa propriedade fosse exclusiva das proteínas. Assim, juntamente com outras evidências, postulou-se a existência de um mundo baseado exclusivamente em moléculas de RNA.

Apesar de serem relíquias de um passado longínquo, os viróides parecem ter emergido como patógenos somente no século XX e provavelmente originaram as doenças pela sua introdução acidental em plantas cultivadas a partir de plantas selvagens (DIENER, 1996). Uma possibilidade que complementaria a anterior considera que os problemas causados por viróides se deram principalmente quando a agricultura se tornou mais intensiva e quando plantas sensíveis a

estes patógenos foram introduzidas em regiões geográficas em que já havia plantas cultivadas tolerantes aos viróides, tendo estes “saltado”, via práticas agrícolas, para as plantas susceptíveis (DIENER, 1979).

### Referências

- AMARI, K.; GÓMEZ, G.; MYRTA, A.; DI TERLIZZI, B.; PALLÁS, V. The molecular characterization of 16 new sequence variants of Hop stunt viroid reveals the existence invariable regions and a conserved hammerhead-like structure on the viroid molecule. **Journal of General Virology**, Reading, v.82, p.953-962, 2001.
- AMBRÓS, S.; FLORES, R. In vitro and in vivo self-cleavage of a viroid RNA with a mutation in the hammerhead catalytic pocket. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.26, p.1877-1883, 1998.
- AMBRÓS, S.; HERNÁNDEZ, C.; DESVIGNES, J.C.; FLORES, R. Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasi-species. **Journal of Virology**, Washington DC, v.72, p.7397-7406, 1998.
- BARBOSA, C.J.; COELHO, Y.S.; SANTOS FILHO, H.P. Pomar de limeira ácida ‘Tahiti’, clone quebra galho, severamente afetado pela exocorte na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.348, 2000. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 33., 2000, Belém.
- BARTOLINI, I.; SALAZAR, L.F. Viroids in South America. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. chap. 39, p.265-267.
- BATISTA, M.F.; MARINHO, V.L.; FONSECA, M.E.N. Detection methods for pests in plant germplasm introduced into Brazil for research purposes. **EPP0 Bulletin**, Paris, v.25, p.411-417, 1995.
- BAULCOMBE, D.C. RNA silencing. **Current Biology**, London, v.12, p.R82-R84, 2002.
- BAUMSTARK, T.; SCHRÖDER, A.R.W.; RIESNER, D. Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. **EMBO Journal**, Oxford, v.16, p.599-610, 1997.
- BONFIGLIOLI, R.G.; McFADDEN, G.I.; SYMONS, R.H. *In situ* hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. **Plant Journal**, Oxford, v.6, p.99-103, 1994.
- BRANCH, A.D.; ROBERTSON, H.D. A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. **Science**, Washington DC, v.223, p.450-454, 1984.

- BRANCH, A.D.; BENENFELD, B.J.; ROBERTSON, H.D. Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.85, p.9128-9132, 1988.
- BRAZAS, R.; GANEM, D. A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. **Science**, Washington DC, v.275, p.90-94, 1996.
- BUSSIÈRE, F.; LEHOUX, J.; THOMPSON, D.A.; SKIZECZKOWSKI, L.J.; PERREAULT, J. Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. **Journal of Virology**, Washington DC, v.73, p.6353-6360, 1999.
- BUZAYAN, J.M.; GERLACH, W.L.; BRUENING, G. Nonenzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. **Nature**, London, v.323, p.349-353, 1986.
- CECH, T.R. Self-splicing of group I introns. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.59, p.543-568, 1990.
- COLLMER, C.W.; HOWELL, S.H. Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.419-442, 1992.
- DARÒS, J.A.; FLORES, R. Identification of a retroviroid-like element from plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.92, p.6856-6860, 1995.
- DARÒS, J.A.; FLORES, R. A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. **EMBO Journal**, Oxford, v.21, p.749-759, 2002.
- DARÒS, J.A.; FLORES, R. *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.101, p.6792-6797, 2004.
- DARÒS, J.A.; ELENA, S.F.; FLORES, R. Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. **EMBO Reports**, Oxford, v.7, p. 593-598, 2006.
- DARÒS, J.A.; MARCOS, J.F.; HERNÁNDEZ, C.; FLORES, R. Replication of avocado sunblotch viroid: Evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.91, p.12813-12817, 1994.
- DE LA PEÑA, M.; FLORES, R. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid RNA: dissection of the pathogenicity determinant and comparative fitness of symptomatic and non-symptomatic variants. **Journal of Molecular Biology**, New York, v.321, p.411-421, 2002.
- DE LA PEÑA, M.; GAGO, S.; FLORES, R. Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. **EMBO Journal**, Oxford, v.22, p.5561-5570, 2003.

- DE LA PEÑA, M.; NAVARRO, B.; FLORES, R. Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: a tetraloop within the in vivo branched RNA conformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.96, p.9960-9965, 1999.
- DELGADO, S.; MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; HERNÁNDEZ, C.; FLORES, R. A short double-strand RNA motif of peach latent mosaic viroid contains the initiation and self-cleavage sites of both polarity strands. **Journal of Virology**, Washington DC, v.79, p. 12934-12943, 2005.
- DENTI, M.A.; BOUTLA, A.; TSAGRIS, M.; TABLER, M. Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. **Plant Journal**, Oxford, v.37, p.762-769, 2004.
- DIENER, T.O. Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTVd-RNA and the question of whether virions exit in extracts or in situ. **Virology**, Duluth, v.43, p.75-89, 1971.
- DIENER, T.O. **Viroids and viroid diseases**. New York: John Wiley, 1979. 252 p.
- DIENER, T.O. Circular RNAs: Relics of precellular evolution? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.86, p.9370-9374, 1989.
- DIENER, T.O. The frontier of life: the viroids and viroid-like satellite RNAs. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Viroids and satellites: molecular parasites at the frontier of life**. London: CRC Press, 1991. p.1-20.
- DIENER, T.O. Origin and evolution of viroids and viroid-like satellite RNAs. **Virus Genes**, Norwell, v.11, p.119-131, 1996.
- DIENER, T.O. Viroids and the nature of viroid disease. **Archives of Virology**, Vienna, v.15, suppl., p.203-220, 1999.
- DIENER, T.O. The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? **Advances in Virus Research**, Orlando, v.57, p.137-184, 2001.
- DING, B.; ITAYA, A.; ZHONG, X. Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v.8, p.1-7, 2005.
- DING, B.; KWON, M.O.; HAMMOND, R.; OWENS, R. Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. **Plant Journal**, Oxford, v.12, p.931-936, 1997.
- DINGLEY, A.J.; STEGER, G.; ESTERS, B.; RIESNER, D.; GRZESIEK, S. Structural characterization of the 69 nucleotide potato spindle tuber viroid left-terminal domain by NMR and thermodynamic analysis. **Journal of Molecular Biology**, New York, v.334, p.751-767, 2003.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: MORSE, S.S. (Ed.). **Evolutionary biology of viruses**. New York: Raven Press, 1994. chap. 25, p.171-180.

EIRAS, M.; TARGON, M.L.P.N.; FAJARDO, T.V.M.; FLORES, R.; KITAJIMA, E.W. RT-PCR detection and sequencing of *Citrus exocortis viroid* and *Hop stunt viroid* isolates from grapevine in Brazil. **Virus: Reviews and Research**, Rio de Janeiro, v.9, p.245-246, 2004 (Abstract).

ELENA, S.F.; DOPAZO, J.; FLORES, R.; DIENER, T.O.; MOYA, A. Phylogeny of viroids, viroid-like satellite RNAs and viroid-like domain of hepatitis delta virus RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.88, p.5631-5634, 1991.

ELENA, S.F.; DOPAZO, J.; DE LA PEÑA, M.; FLORES, R.; DIENER, T.O.; MOYA, A. Phylogenetic analysis of viroid and viroid-like satellite RNAs from plants: a reassessment. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.53, p.155-159, 2001.

FADDA, Z.; DARÒS, J.A.; FLORES, R.; DURAN-VILA, N. Identification in eggplant of a variant of citrus exocortis viroid (CEVd) with a 96 nucleotide duplication in the right terminal region of the rod-like secondary structure. **Virus Research**, Amsterdam, v.97, p.145-149, 2003b.

FADDA, Z.; DARÒS, J.A.; FAGOAGA, C.; FLORES, R.; DURAN-VILA, N. Eggplant latent viroid (ELVd): candidate type species for a new genus within family *Avsunviroidae* (hammerhead viroids). **Journal of Virology**, Washington DC, v.77, p.6528-6532, 2003a.

FLORES, R. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. **Comptes Rendus de la Academie des Seances Paris, Life Science**, Paris, v.324, p.1-10, 2001.

FLORES, R.; SEMANCIK, J.S. Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.79, p.6285-6288, 1982.

FLORES, R.; DARÒS, J.A.; HERNÁNDEZ, C. The *Avsunviroidae* family: viroids containing hammerhead ribozymes. **Advances in Virus Research**, Orlando, v.55, p.271-323, 2000.

FLORES, R.; HERNÁNDEZ, C.; DE LA PEÑA, M.; VERA, A.; DARÒS, J.A. Hammerhead ribozyme structure and function in plant RNA replication. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.341, p.540-552, 2001.

FLORES, R.; HERNANDEZ, C.; MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; DARÓS, J.A.; DI SERIO, F. Viroids and viroid-host interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.117-139, 2005a.

FLORES, R.; RANDLES, J.W.; OWENS, R.A.; BAR-JOSEPH, M.; DIENER, T.O. Viroidae. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER U.; BALL, A.L. (Eds.) **Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier/Academic Press, 2005b. p.1145-1159.



- FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. Viróides: minúsculos RNAs parasitas de plantas vasculares dotados de características e estruturas únicas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p.387-425, 1997.
- FONSECA, M.E.N.; KUHN, G. Natural infection of grapevine by Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.285, 1994 (Resumo).
- FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S.; SINGH, R.P.; KITAJIMA, E.W. A viroid from Coleus species in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, p.80, 1990.
- FONSECA, M.E.N.; MARINHO, V.L.A.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E.W. Hop latent viroid in hop germ plasm introduced into Brazil from the United States. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, p.952, 1993.
- FORSTER, A.C.; SYMONS, R.H. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active site. **Cell**, Cambridge, v.49, p.211, 1987.
- FRANCKI, R.I.B.; ZAITLIN, M.; PALUKAITIS, P. *In vivo* encapsulation of potato spindle tuber viroid by velvet tobacco mottle virus particles. **Virology**, Duluth, v.155, p.469-473, 1986.
- GILBERT, W. The RNA world. **Nature**, London, v.319, p.618, 1986.
- GÓMEZ, G.; PALLÁS, V. Identification of an *in vitro* ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.14, p.910-913, 2001.
- GÓMEZ, G.; PALLÁS, V. A long-distance translocable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex *in vivo* with *Hop stunt viroid* RNA. **Journal of Virology**, Washington DC, v.78, p.10104-10110, 2004.
- GÓRA, A.; CANDRESSE, T.; ZAGÓRSKI, W. Use of intramolecular chimeras to map molecular determinants of symptom severity of potato spindle tuber viroid (PSTVd). **Archives of Virology**, Vienna, v.141, p.2045-2055, 1996.
- GOZMANOVA, M.; DENTI, M.A.; MINKOV, I.N.; TSAGRIS, M.; TABLER, M. Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.31, p.5534-5543, 2003.
- GRILL, L.K.; SEMANCIK, J.S. RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.75, p.896-900, 1978.
- GROSS, H.J.; DOMDEY, H.; LOSSOW, C.; JANK, P.; RABA, M.; ALBERTY, H.; SÄNGER, H.L. Nucleotide sequence and secondary structural of potato spindle tuber viroid. **Nature**, London, v.273, p.203-208, 1978.

- GROSS, H.J.; LIEBL, U.; ALBERTY, H.; KRUPP, G.; DOMDEY, H.; RAMM, K.; SÄNGER, H.L. A severe and a mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges only. **Bioscience Reporter**, New York, v.1, p.235-241, 1981.
- HADIDI, A. Relationship of viroids and certain other plant pathogenic nucleic acids to group I and II introns. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.7, p.129-142, 1986.
- HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. 370p.
- HADIDI, A.; GIUNCHEDI, L.; SHAMLOUL, A.M.; POGGI-POLLINI, C.; AMER, M.A. Occurrence of Peach latent mosaic viroid in stone fruits and its transmission with contaminated blades. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.154-158, 1997.
- HAMMOND, R.W. Agrobacterium-mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto tomato reveals the biological effect of apparently lethal mutations. **Virology**, Duluth, v.201, p.36-45, 1994.
- HAMMOND, R.W. *Columnnea latent viroid*. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. chap. 34, p.265-267.
- HAMMOND, R.W.; ZHAO, Y. Characterization of a tomato protein kinase gene induced by infection by Potato spindle tuber viroid. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.13, p.903-910, 2000.
- HAMMOND, R.W.; SMITH, D.R.; DIENER, T.O. Nucleotide sequence and proposed secondary structure of *Columnnea latent viroid*: a natural mosaic of viroid sequences. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.17, p.10083-10094, 1989.
- HARDERS, J.; LUCAKS, N.; ROBERT-NICOUD, M.; JOVIN, J.M.; RIESNER, D. Imaging of viroids in the nuclei of tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. **EMBO Journal**, Oxford, v.8, p.3941-3949, 1989.
- HARRIS, R.J.; ELDER, D. Ribozyme relationships: the hammerhead, hepatitis delta and hairpin ribozymes have a common origin. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.51, p.182-184, 2000.
- HASELOFF, J.; MOHAMED N.A.; SYMONS, R.H. Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. **Nature**, London, v.229, p.316-321, 1982.
- HERNÁNDEZ, C.; FLORES, R. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.89, p.3711-3715, 1992.
- HIDDINGA, H.J.; CRUM, C.J.; ROTH, D.A. Viroid-induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA-dependent protein kinase. **Science**, Washington DC, v.241, p.451-453, 1988.
- HULL, R. **Matthews' plant virology**. New York: Academic Press, 2002. 1001 p.

- HUTCHINS, C.J.; RATHJEN, P.D.; FORSTER, A.C.; SYMONS, R.H. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.14, p.3627, 1986.
- HUTCHINS, C.J.; KEESE, P.; VISVADER, J.E.; RATHJEN, P.D.; MCINNES, J.L.; SYMONS, R.H. Comparison of multimeric plus and minus forms of viroids and virusoids. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.4, p.293-304, 1985.
- ITAYA, A.; FOLIMOV, A.; MATSUDA, Y.; NELSON, R.S.; DING, B. Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.14, p.1332-1334, 2001.
- ITAYA, A.; MATSUDA, Y.; GONZALES, R.A.; NELSON, R.S.; DING, B. Potato spindle tuber viroid strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.15, p.990-999, 2002.
- ITO, T.; IEKI, H.; OZAKI, K.; IWANAMI, T.; NAKAHARA, K.; HATAYA, T.; ITO, T., ISAKA, M.; KANO, T. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p.542-547, 2002.
- JOYCE, G.F. RNA evolution and the origins of life. **Nature**, London, v.338, p.217-224, 1989.
- KASSANIS, B. Properties and behavior of a virus depending for its multiplication on another. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.27, p.477-488, 1962.
- KEESE, P.; SYMONS, R.H. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.82, p.4582, 1985.
- KHOVOROVA, A.; LESCOUTE, A.; WESTHOF, E.; JAYASENA, S.D. Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. **Nature Structural Biology**, London, v.10, p.708-712, 2003.
- KIEFER, M.C.; OWENS, R.A.; DIENER, T.O. Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.80, p.6234-6238, 1983.
- KOLONKO, N.; BANNACH, O.; ASCHERMANN, K.; HU, K.H.; MOORS, M.; SCHMITZ, M.; STEGER, G.; RIESNER, D. Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. **Virology**, Dulluth, v. 347, p. 392-404, 2006.
- LANDWEBER, L.F.; SIMON, P.J.; WAGNER, T.A. Ribozyme engineer and early evolution. **Bioscience**, Arlington, v.48, p.2-103, 1998.
- LEWIS, J.D.; TOLLERVEY, D. Like attracts like: Getting RNA processing together in the nucleus. **Science**, Washington DC, v.288, p.1385-1389, 2000.

- LIMA, M.I.; FONSECA, M.E.N.; FLORES, R.; KITAJIMA, E.W. Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. **Archives of Virology**, Vienna, v.138, p.385-390, 1994.
- LIU, Y.; SYMONS, R.H. Specific RNA self-cleavage in coconut cadang-cadang viroid: potential for a role in rolling circle replication. **RNA**, Woodbury, v.4, p.418-429, 1998.
- MALFITANO, M.; DI SERIO, F.; COVELLI, L.; RAGOZZINO, A.; HERNÁNDEZ, C.; FLORES, R. *Peach latent mosaic viroid* variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. **Virology**, Duluth, v.313, p.492-501, 2003.
- MANIATAKI, E.; MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; SÄGESSER, R.; TABLER, M.; TSAGRIS, M. Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein Virp1. **RNA**, Woodbury, v.9, p.346-354, 2003.
- MARGULIS, L. **Symbiosis in cell evolution**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: W.H. Freeman, 1993. 452 p.
- MARKARIAN, N.; LI, H.W.; DING, S.W.; SEMANCIK, J.S. RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. **Archives of Virology**, Vienna, v.149, p.397-406, 2004.
- MARTIN, W. A briefly argued case that mitochondria and plastids are descendants of endosymbionts, but that the nuclear compartment is not. **Proceedings of Royal Society of London**, Washington DC, v.266, p.1387-1395, 1999.
- MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; FLORES, R.; HERNÁNDEZ, C. Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with postranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, Washington DC, v.76, p.13094-13096, 2002.
- MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; SÄGESSER, R.; TABLER, M.; TSAGRIS, M. A bromodomain-containing protein from tomato binds specifically potato spindle tuber viroid RNA *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Virology**, Washington DC, v.77, p.9685-9694, 2003.
- MAULE, A.; LEH, V.; LEDERER, C. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v.5, p.279-386, 2002.
- MAYO, M.A.; FRITSCH, C.; LEIBOWITZ, M.J.; PALUKAITIS, P.; SCHOLTHOF, K.B.G.; SIMONS, A.E.; TALIANSKY, M. Subviral Agents, Satellites. In: VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (Ed.) **Virus taxonomy**: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000. p. 1025-1032.
- MÜHLBACH, H.P.; SÄNGER, H.L. Viroid replication is inhibited by  $\alpha$ -amanitin. **Nature**, London, v.278, p.185-188, 1979.

- NAVARRO, B.; FLORES, R. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.94, p.11262-11267, 1997.
- NAVARRO, B.; FLORES, R. Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structural. **EMBO Journal**, Oxford, v.19, p.2662-2670, 2000.
- NAVARRO, B.; VERA, A.; FLORES, R. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. **Virology**, Duluth, v.268, p.218-225, 2000.
- OWENS, R.A.; BLACKBURN, M.; DING, B. Possible involvement of phloem protein 2 in long-distance viroid movement. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.14, p.905-909, 2001.
- OWENS, R.A.; SANO, T.; FELDSTEIN, P.A.; HU, Y.; STEGER, G. Identification of a novel structural interaction in *Columnea latent viroid*. **Virology**, Duluth, v.313, p.604-614, 2003.
- OWENS, R.A.; STEGER, G.; HU, Y.; FELS, A.; HAMMOND, R.W.; RIESNER, D. RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. **Virology**, Duluth, v.222, p.144-158, 1996.
- PALUKAITIS, P. Potato spindle tuber viroid: Investigation of long-distance intra-plant transport route. **Virology**, Duluth, v.158, p.239-241, 1987.
- PAPAEFTHIMIOU, I.; HAMILTON, A.J.; DENTI, M.A.; BAULCOMBE, D.C.; TSAGRIS, M.; TABLER, M. Replicating potato spindle tuber viroid is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.29, p.2395-2400, 2001.
- PELCHAT, M.; CÔTÉ, F.; PERREAULT, J.P. Study of the polymerization step of the rolling circle replication of peach latent mosaic viroid. **Archives of Virology**, Vienna, v.146, p.1753-1763, 2001.
- PELCHAT, M.; ROCHELEAU, L.; PERREAULT, J.; PERREAULT, J.P. Subviral RNA: a database of the smallest known auto-replicable RNA species. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.31, p.444-445, 2003.
- PERSIDIS, A. Ribozyme therapeutics. **Nature Biotechnology**, London, v.15, p.921-922, 1997.
- PRODY, G.A.; BAKOS, J.T.; BUZAYAN, J.M.; SCHNEIDER, I.R.; BRUENING, G. Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. **Science**, Washington DC, v.231, p.1577-1580, 1986.

- QI, Y.; DING, B. Replication of potato spindle tuber viroid in cultured cells of tobacco and *Nicotiana benthamiana*: the role of specific nucleotides in determining replication levels for host adaptation. **Virology**, Duluth, v.302, p.445-456, 2002.
- QI, Y.; DING, B. Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. **Plant Cell**, Rockville, v.15, p.2566-2577, 2003b.
- QI, Y.; DING, B. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. **Plant Cell**, Rockville, v.15, p.1360-1374, 2003a.
- QI, Y.; PELISSIER, T.; ITAYA, A.; HUNT, E.; WASSENEGGER, M.; DING, B. Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary. **Plant Cell**, Rockville, v.16, p.1741-1752, 2004.
- REANWARAKORN, K.; SEMANCIK, J.S. Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. **Journal of General Virology**, Reading, v.79, p.3163-3171, 1998.
- RODRIGUES, M.I.S.; BARBOSA, C.J.; SANTOS FILHO, H.P.; VILARINHOS, A.D.; MEISSNER FILHO, P.E. Caracterização biológica e molecular de viróides associados a exocorte de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.528-533, 1999.
- RUBINO, L.; DI SERIO, F.; MARTELLI, G.P. Viroid-Like Satellite RNAs. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. chap. 9, p.76-84.
- SANO, T.; ISHIGURO, A. Viability and pathogenicity of intersubgroup viroid chimeras suggest possible involvement of the terminal right region in replication. **Virology**, Duluth, v.240, p.238-244, 1998.
- SANO, T.; CANDRESSE, T.; HAMMOND, R.W.; DIENER, T.O.; OWENS, R.A. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.89, p.10104-10108, 1992.
- SCHINDLER, I.M.; MÜHLBACH, H.P. Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. **Plant Science**, Limerick, v.84, p.221-229, 1992.
- SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different potato spindle tuber viroid strains. **RNA**, Woodbury, v.4, p.1295-1303, 1998.
- SCHNÖLZER, M.; HAAS, B.; RAMM, K.; HOFMANN, H.; SÄNGER, H.L. Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid. **EMBO Journal**, Oxford, v.4, p.2181-2190, 1985.
- SCHRÖDER, A.R.W.; RIESNER, D. Detection and analysis of hairpin II, an essential metastable structural element in viroid replication intermediates. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.30, p.3349-3359, 2002.

SCOTT, W.G.; FINCH, J.T.; KLUG, A. The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalysis cleavage. **Cell**, Cambridge, v.81, p.991-1002, 1995.

SEHGAL, O.P.; SINHA, R.C.; GALLATLY, D.L.; IVANOV, I.; ABOUHAIIDAR, M.G. Replication and encapsidation of the viroid-like satellite RNA of Lucerne transient streak virus are supported in divergent hosts by cocksfoot mottle virus and turnip rosette virus. **Journal of General Virology**, Reading, v.74, p.785-788, 1993.

SEMANCIK, J.S. Pathogenesis. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. chap 6, p.61-66.

SEMANCIK, J.S.; SZYCHOWSKI, J.A. Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. **Journal of General Virology**, Reading, v.75, p.1543-1549, 1994.

SEMANCIK, J.S.; SZYCHOWSKI, J.A.; RAKOWSKI, A.G.; SYMONS, R.H. A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. **Journal of General Virology**, Reading, v.75, p.727-732, 1994.

SIMON, A.E.; HOWELL, S. The virulent satellite RNA of turnip crinkle virus has a major domain homologous to the 3' end of the helper virus genome. **EMBO Journal**, Oxford, v.5, p.3423-3428, 1986.

SINGH, R.P.; READY, K.F.M.; HADIDI, A. Viroids in North America and global distribution of viroid diseases. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003a. chap. 38, p.255-264.

SINGH, R.P.; READY, K.F.M.; NIE, X. Biology. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003b. chap. 3, p.30-48.

SKORIC, D.; CONERLY, M.; SZYCHOWSKI, J.A.; SEMANCIK, J.S. CEVd-induced symptom modification as a response to a host-specific temperature-sensitive reaction. **Virology**, Duluth, v.280, p.115-123, 2001.

STEGER, G.; RIESNER, D. Molecular characteristics. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. chap. 2, p.15-29.

SYMONS, R.H. Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, p.2683-2689, 1997.

SYMONS, R.H.; RANGLES, J.W. Encapsidated circular viroid-like satellite RNAs (virusoids) of plants. In: VOGT, P.K.; JACKSON, A.O. (Ed.). **Satellites and defective RNAs**. Berlin: Springer, 1999. p.81-75.

- TABLER, M.; TSAGRIS, M. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. **Trends in Plant Science**, v.9, p.339-348, 2004.
- TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; STUCHI, E.S.; SOUZA, J.M.; MULLER, G.W.; BORGES, K.M.; MACHADO, M.A. Hybridization techniques for indexing of citrus viroids in São Paulo State, Brazil. **Laranja**, Cordeirópolis, v.26, p.25-38, 2005.
- TAYLOR, J.M. Hepatitis delta virus. **Intervirolgy**, Basel, v.42, p.173-178, 1999.
- TSANG, J.; JOYCE, G.F. In vitro evolution of randomized ribozymes. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.267, p.410-426, 1996.
- VANCE, V.; VAUCHERET, H. RNA silencing in plant-defense and counterdefense. **Science**, Washington DC, v.292, p.2277-2280, 2001.
- VERA, A.; DARÒS, J.A.; FLORES, R.; HERNÁNDEZ, C. The DNA of a plant retroviroid-like element is fused to different sites in the genome of a plant pararetrovirus and shows multiple forms with sequence deletions. **Journal of Virology**, Washington DC, v.74, p.10390-10400, 2000.
- VISVADER, J.E.; SYMONS, R.H. Replication of in vitro constructed viroid mutants: location of the pathogenicity-modulating domain of citrus exocortis viroid. **EMBO Journal**, Oxford, v.5, p.2051-2055, 1986.
- VOGT, P.K.; JACKSON, A.O. **Satellites and defective viral RNAs**. Berlin: Springer, 1999. 179 p.
- VOINNET, O.; VAIN, P.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D.C. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is inhibited by localized introduction of ectopic promoterless DNA. **Cell**, Cambridge, v.95, p.177-187, 1998.
- WANG, M.B.; BIAN, X.Y.; WU, L.M.; LIU, L.X.; SMITH, N.A.; ISENEGGER, D.; WU, R.M.; MASUTA, C.; VANCE, V.; WATSON, J.M.; REZAIAN, A.; DENNIS, E.S.; WATERHOUSE, P.M. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.101, p.3275-3280, 2004.
- WARRILOW, D.; SYMONS, R.H. Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato *in vivo*. **Archives of Virology**, Vienna, v.144, p.2367-2375, 1999.
- WASSENEGGER, M.; SPIEKER, R.L.; THALMEIR, S.; GAST, F. U.; RIEDEL, L.; SÄNGER, H.L. A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid from noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. **Virology**, Duluth, v.226, p.191-197, 1996.



WOO, Y.; ITAYA, A.; OWENS, R.A.; TANG, L.; HAMMONS, R.W.; CHOU, H.C.; LAI, M.M.C.; DING, B. Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. **Plant Journal**, Oxford, v.17, p.627-635, 1999.

YANG, X.; YIE, Y.; ZHU, F.; KANG, L.; WANG, X.; TIEN, P. Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.94, p.4861-4865, 1997.

ZHAO, Y.; OWENS, R.A.; HAMMOND, R.W. Use of a vector based on Potato virus X in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of Potato spindle tuber viroid. **Journal of General Virology**, Reading, v.82, p.1491-1497, 2001.

ZHU, Y.; GREEN, L.; WOO, Y.; OWENS, R.A.; DING, B. Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. **Virology**, Duluth, v.279, p.69-77, 2001.

ZHU, Y.; QI, Y.; XUN, Y.; OWENS, R.A.; DING, B. Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. **Plant Physiology**, Bethesda, v.130, p.138-146, 2002.

### 3 VIDEIRAS DUPLAMENTE INFECTADAS PELO *Citrus exocortis viroid* E *Hop stunt viroid* NO BRASIL<sup>1</sup>

#### Resumo

Os viróides são os menores fitopatógenos conhecidos, sendo constituídos de uma molécula de RNA de fita simples, circular com forte estrutura secundária. Possuem genomas que variam de 246 a 401 nucleotídeos e por não traduzirem proteínas próprias são totalmente dependentes da célula hospedeira para sua replicação. São atualmente classificados em duas famílias e sete gêneros. O *Citrus exocortis viroid* (CEVd) pertence ao gênero *Pospiviroid*, enquanto que o *Hop stunt viroid* (HSVd) é o único membro do gênero *Hostuviroid*, sendo ambos pertencentes à família *Pospiviroidae*. Estes patógenos estão amplamente distribuídos e infectam um grande número de hospedeiras. No Brasil, isolados do CEVd e do HSVd foram detectados em citros por hibridização “dot-blot” e em videiras por eletroforese em géis de poliacrilamida e “Northern-blot”. Para confirmar a presença e caracterizar estes viróides, promoveu-se extração de RNAs totais de folhas de videira *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ e *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’ provenientes de Bento Gonçalves, RS, e RT-PCR com “primers” específicos para os cinco viróides já descritos em videira. Os fragmentos de DNA amplificados (com tamanhos esperados de 369-375 e 295-303 pares de bases para o CEVd e HSVd, respectivamente) foram eluídos, clonados e seqüenciados. As análises das seqüências revelaram que as amostras de videira estavam duplamente infectadas com o CEVd e HSVd. As análises filogenéticas mostraram que os clones de HSVd de videira aqui caracterizados agruparam-se com outros variantes de videira, formando um grupo separado de um segundo formado por variantes de citros. Já os clones de CEVd de videira agruparam-se com isolados de citros e videira.

#### Abstract

Viroids, non-protein-coding small (246-401 nt) circular single-stranded RNAs with autonomous replication, are currently classified into two families. Within the family *Pospiviroidae*, *Citrus exocortis viroid* (CEVd) belongs to the genus *Pospiviroid* while *Hop stunt viroid* (HSVd) is the single member of the genus *Hostuviroid*. In Brazil, isolates of CEVd and HSVd have been detected in citrus by dot-blot hybridization and in grapevine by polyacrylamide gel electrophoresis and northern-blot hybridization. To confirm their identity and to characterize these viroids, total RNAs from leaves of grapevine *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ and *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’ from Bento Gonçalves, RS, were RT-PCR amplified with specific primers for the five viroids described infecting grapevines. The resulting products were separated by agarose gel electrophoresis and DNA fragments of the expected full-size were eluted, cloned and sequenced. The grapevines samples analyzed were doubly-infected by CEVd and HSVd. A phylogenetic analysis showed that the Brazilian grapevine HSVd variants clustered with other grapevine HSVd variants forming a specific group separated from citrus variants, whereas the Brazilian CEVd variants clustered with other citrus and grapevine variants.

<sup>1</sup>Trabalho aceito para a publicação na revista Fitopatologia Brasileira

### 3.1 Introdução

Os viróides são pequenos RNAs (246-401 nucleotídeos) circulares de fita simples que não codificam proteínas, adotando uma conformação compacta devido às interações (complementariedade) entre as bases. Apresentam replicação autônoma e dependem das interações com fatores do hospedeiro para completar seu ciclo infeccioso (FLORES et al., 2005a).

Encontram-se, atualmente, classificados em duas famílias, de acordo com suas características biológicas e moleculares: família *Pospiviroidae*, que apresenta cinco gêneros (*Pospiviroid*, *Hostuviroid*, *Cocadviroid*, *Apscaviroid* e *Coleviroid*), ou na família *Avsunviroidae* com os gêneros *Avsunviroid*, *Pelamoviroid* e *Elaviroid* (FLORES et al., 2005b). Os membros da família *Pospiviroidae* apresentam algumas características como: (i) estrutura secundária do tipo haste (*rod-like*) com cinco domínios estruturais *terminal left*-TL, *pathogenic*-P, *central*-C, *variable*-V e *terminal right*-TR e uma região central conservada (CCR) dentro do domínio central; (ii) ausência de atividade ribozimática; (iii) e replicação nuclear via círculo rolante assimétrico. Os membros da família *Avsunviroidae* não possuem CCR, porém são capazes de se auto-clivar (nas moléculas de ambas as polaridades) por meio de ribozimas do tipo cabeça-de-martelo e se replicar nos cloroplastos via círculo rolante simétrico (FLORES et al., 2005a).

Na família *Pospiviroidae*, o *Citrus exocortis viroid* (CEVd) pertence ao gênero *Pospiviroid*, enquanto que o *Hop stunt viroid* (HSVd) é o único membro do gênero *Hostuviroid*. No domínio TL (*terminal left*), o CEVd apresenta o motivo denominado *terminal conserved region* (TCR), enquanto que o HSVd possui o motivo *terminal conserved hairpin* (TCH) (FLORES et al. 2005b).

O CEVd e o HSVd apresentam ampla distribuição mundial e um amplo círculo de hospedeiros (SINGH et al., 2003). O HSVd foi o primeiro viróide descrito em videiras, no Japão (SHIKATA et al., 1984; SANO et al., 1985). Depois de sua descrição, outros viróides foram relatados em videira como o CEVd (FLORES et al., 1985; GARCÍA-ARENAL et al., 1987) e três espécies do gênero *Apscaviroid* os quais ocorrem exclusivamente em videira: *Grapevine yellow speckle viroid 1* e *2* (GYSVd-1 e GYSVd-2) e o *Australian grapevine viroid* (AGVd) (REZAIAN et al., 1992; LITTLE; REZAIAN, 2003). Apesar dos sintomas de nanismo e amarelecimento que o HSVd induz em plantas de pepino, nenhum sintoma foi observado em videiras infectadas com esse viróide. O CEVd também foi isolado de videiras assintomáticas na Espanha, Austrália e

Califórnia (GARCÍA-ARENAL et al., 1987; REZAIAN et al., 1988; SEMANCIK; SZYCHOWSKI, 1992).

No Brasil, isolados do CEVd e HSVd têm sido detectados em citros por meio de hibridização pontual *dot-blot* (TARGON et al., 2005) e em videiras com dupla eletroforese em géis de poliacrilamida (d-PAGE) e *northern-blot* (FONSECA; KUHN, 1994). Para confirmar sua identidade e caracterizar estes viróides, amostras de folhas de videiras *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ e *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’ provenientes de Bento Gonçalves, RS, foram coletadas. RNAs totais foram extraídos e amplificados por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para as cinco espécies de viróides já descritas em videira. Os fragmentos de DNA amplificados foram clonados e seqüenciados, sendo a variabilidade encontrada para os isolados de CEVd e HSVd analisada e discutida.

### **3.2 Material e métodos**

#### **3.2.1 Amostras**

Amostras de folhas (5 g) de videira *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ (sem sintomas visíveis) e *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’ (apresentando sintoma de pontuações amarelas, conhecido como *yellow speckles*) foram coletadas na coleção de *Vitis* da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, Brasil.

#### **3.2.2 Extração de RNA e RT-PCR**

RNAs totais foram extraídos de acordo com o método 4 do protocolo descrito por Rowhani et al. (1993) desenvolvido para prevenir a oxidação do tecido, muito comum em plantas do gênero *Vitis*. Após a extração, os RNAs totais foram purificados por cromatografia de celulose (CF11, Whatman), recuperados em etanol, precipitados e finalmente ressuspensos em 250 µl de água estéril (FLORES et al., 1985). A preparação de RNAs purificados foi submetida a RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para as cinco espécies de viróides já relatadas em videira: HSVd, CEVd, GYSVd-1, GYSVd-2 e AGVd.

A síntese de cDNAs foi realizada misturando-se 0,25 ng de RNAs totais com os componentes do kit “*Preamplification System First Strand cDNA Synthesis*” (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante e empregando-se os respectivos pares de

oligonucleotídeos (Tabela 1). A PCR foi realizada com 10 µl da mistura de cDNAs, 10 ng/µl de cada par de oligonucleotídeo (Tabela 1); 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1 µl de deoxinucleotídeos – dNTPs (0.03M) e 5 µl do tampão da enzima (Invitrogen). Utilizou-se o termociclador PTC-100 (MJ-Research) sendo as amostras submetidas a um aquecimento inicial de 94 °C por 2 min seguindo 35 ciclos de 40 s a 94 °C, 30 s a 60 °C, e 1 min a 72 °C, com uma extensão final de 72 °C por 10 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0.01%) e visualizado sob luz ultravioleta em um transluminador. Os tamanhos esperados para os produtos de PCR são de 297-302 pares de bases (pb) para o HSVd, 369-375 pb para o CEVd, 222 pb para o GYSVd-1, 363 pb para o GYSVd-2 e 369 pb para o AGVd (Tabela 1).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados em RT-PCR para os cinco viróides descritos em videira

Viróides	Oligonucleotídeos (5' → 3')	Polaridade	Tamanho dos produtos (pb)
HSVd	actcttctcagaatccagcgag	+	297-302
	tgccccgggctcctttctcaggt	-	
CEVd	ggaaacctggaggaagtcg	+	369-375
	ccgggatccctgaagga	-	
GYSVd-1	gagtcctcggatcac	+	222
	agagcgcaatgctgaataggc	-	
GYSVd-2	ttgagcccgcgaaacgc	+	363
	accggcttcggagatagaag	-	
AGVd	gtcgacgaagggtcctcagcagacacc	+	369
	gtcgacgacgagtcgccaggtgagtctt	-	

### 3.2.3 Clonagem e seqüenciamento

Os produtos da RT-PCR foram purificados do gel de agarose com o kit “*Concert Rapid Gel Extraction System*” (Life Technologies), clonados no plasmídeo pGEM-T *Easy vector* (Promega), sendo este utilizado para a transformação de células competentes de *E. coli* (DH5- $\alpha$ ). Os procedimentos foram realizados de acordo com Sambrook e Russel (2001) ou seguindo as recomendações dos respectivos fabricantes. Os insertos dos plasmídeos recombinantes foram seqüenciados pela técnica de terminação em cadeia, empregando-se o kit para seqüenciamento *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – Ampli Taq DNA polymerase* (Applied Biosystem), seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.2.4 Análise das seqüências e filogenia

As seqüências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando-se o programa Sequencer 3.1 (Gene Codes Corporation). Comparações com outras seqüências depositadas no banco de genes internacional (GenBank) foram realizadas com o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponíveis na internet. Alinhamentos múltiplos foram feitos com o programa Clustal X 1.8 e os cálculos das porcentagens de identidade com o programa *GeneDoc* (NICHOLAS et al., 1997).

As variantes de viróides utilizadas nas comparações e análises filogenéticas com os respectivos números de acesso no *GenBank* estão apresentadas na Tabela 2. As árvores filogenéticas foram obtidas com o programa MEGA 3.2 (KUMAR et al., 2004) sendo as aproximações realizadas com *neighbor-joining*, com valores de *bootstrap* (em %) calculados para 2000 replicações.

As prováveis estruturas secundárias (obtidas para mínima energia livre) dos variantes brasileiros de HSVd e CEVd, isolados de videira, caracterizados neste trabalho, foram obtidas com o programa MFold para moléculas circulares (ZUKER, 1989) e visualizadas com o programa RNAviz (DE RIJK; DE WACHTER, 1997).

Tabela 2 – Variantes do HSVd e do CEVd, isolados de videira e de citros, sua origem e números de acesso (<http://subviral.med.uottawa.ca/cgi-bin/accueil.cgi?typeRNA=1>). As variantes caracterizadas neste trabalho estão destacadas em negrito

	<b>Variantes de HSVd</b>	<b>Origem</b>	<b>Acessos no GenBank</b>		<b>Variantes de CEVd</b>	<b>Origem</b>	<b>Acessos no GenBank</b>
<b>Videira</b>	<b>HCSC10</b>	Brasil	DQ444475	<b>Videira</b>	<b>CSC07</b>	Brasil	DQ444473
	<b>HCSC01</b>	Brasil	DQ471997		<b>CSC09</b>	Brasil	DQ471994
	<b>HCSC08</b>	Brasil	DQ471998		<b>CSC10</b>	Brasil	DQ471995
	<b>HNiagD08</b>	Brasil	DQ444476		<b>CSC11</b>	Brasil	DQ471996
	HSVd-RXX	Alemanha	X06873		<b>NiagD11</b>	Brasil	DQ444474
	HSVd-IIA	Alemanha	X87928		CEVd-g	Espanha	Y00328
	HSVd-IE	Alemanha	X87927	<b>Citros</b>	CEVd-HB	China	AY456136
	HSVd-IA	Alemanha	X87924		CEVd-dgM	EUA	AF298178
	HSVd-IC	Alemanha	X87925		CitE01	Brasil	-
	HSVd-Hung	Hungria	Y14050		CitE02	Brasil	-
	HSVd-IB	Alemanha	X87923		CEVd-01	-	J02053
	HSVd-SHV	Japão	M35717		CEVd-02	Australia	M34917
	HSVd-ID	Alemanha	X87926		CEVd-03	Australia	K00964
<b>Citros</b>	HSVd-Cit01	-	X06718		CEVd-30	Israel	U21126
	HSVd-Cit02	-	X06719		CEVd-43	Brasil	AF434678
	HSVd-Cit03	-	X13838		CEVd-46	Japão	AB054592
	HSVd-Cit33	Uruguai	AF359276	CEVd-205E1	Uruguai	AF428058	
	HSVd-Cit42	Uruguai	AF416554	CEVd-205E5	Uruguai	AF428060	
	HSVd-Cit41	EUA	X69518				
	HSVd-Cit46	Brasil	AF434679				

### 3.3 Resultados e Discussão

A amostra de videira ‘Cabernet Sauvignon’ não apresentava sintomas, enquanto que ‘Niagara Rosada’ apresentava pontuações amarelas (*yellow speckles*) nas folhas (Figura 1). A RT-PCR e as análises das seqüências revelaram que as duas variedades de videira estavam duplamente infectadas pelo CEVd e HSVd. Estes resultados confirmaram relatos prévios de dupla infecção por estes viróides em videira ‘Cabernet Sauvignon’ (FONSECA; KHUN, 1994) no Sul do Brasil, além de estenderem o mesmo caso de dupla infecção para a espécie *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’.

Apesar dos sintomas de pontuações amarelas, observados somente nas videiras *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’, os viróides GYSVd-1 e GYSVd-2, normalmente associados a estes sintomas, e o AGVd, que não causa sintomas, foram detectados. Os viróides que infectam videiras normalmente não induzem sintomas com a exceção do sinergismo que ocorre quando há dupla infecção do *Grapevine fanleaf virus* (GFLV, um vírus transmitido por nematóides) e o GYSVd-1, que resulta em um sintoma severo de faixas das nervuras nas folhas (*vein-banding*) (SZYCHOWSKI et al., 1995). Embora o GFLV já tenha sido relatado no Brasil (FAJARDO et al., 2000), o vírus não estava presente nessas amostras (dados não mostrados).

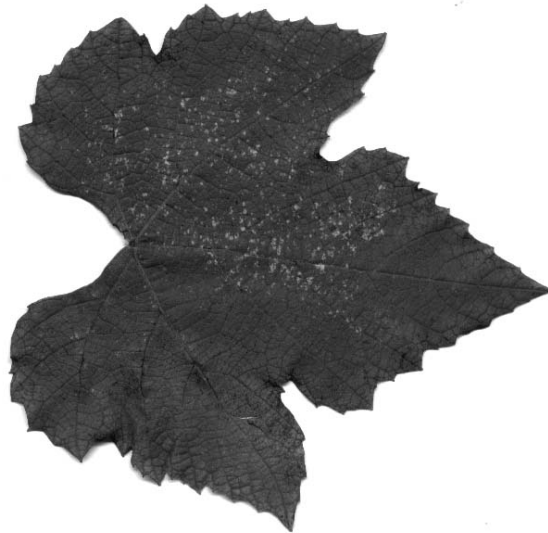


Figura 1 – Folha de *Vitis labrusca* ‘Niagara Rosada’ duplamente infectada pelo HSVd e CEVd apresentando pontuações amarelas (*yellow speckles*)

As causas dos sintomas de pontuações amarelas, observados na variedade ‘Niagara Rosada’, e sua relação com os viróides CEVd e HSVd devem ser pesquisadas. Por outro lado, as variantes seqüenciadas apresentam mutações distribuídas em todos os domínios da molécula (Figura 3), o que pode refletir na expressão dos sintomas (SANO et al., 1992). Portanto, experimentos adicionais deverão ser realizados para avaliar a variabilidade nas seqüências das variantes e a sua relação com a presença dos sintomas em infecções simples e mistas.

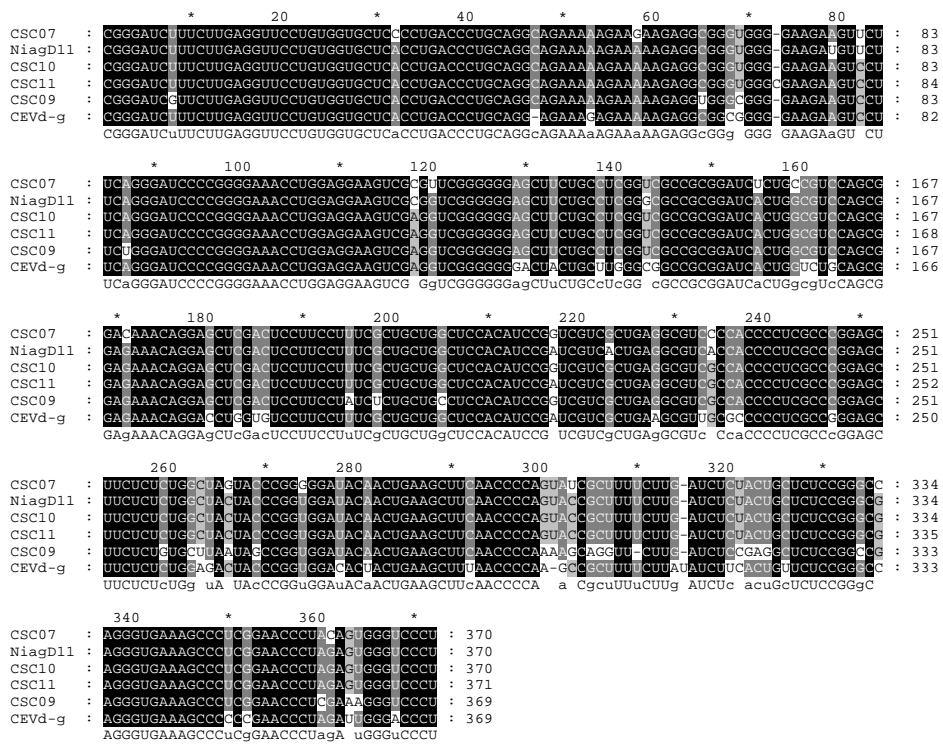
As comparações e análises das seqüências dos clones obtidos revelaram elevada identidade com variantes do CEVd e HSVd depositados no banco de dados específico para patógenos subvirais (<http://subviral.med.uottawa.ca/cgi-bin/accueil.cgi?typeRNA=1>). Na Figura 3 pode-se observar as estruturas secundárias propostas para uma mínima energia livre para os dois isolados de HSVd e os dois isolados de CEVd seqüenciados neste trabalho. As diferenças de nucleotídeos observadas entre os clones são indicadas para os dois viróides (Figura 2 e Figura 3). Quando se compararam os clones HCSC10 (código de acesso DQ444475), HNiagD08 (DQ444476) e HSVd-SHV (M35717), um total de 27 mudanças de nucleotídeos foram observadas, com 6 diferenças anotadas no domínio TL, e 2, 8, 2 e 9 nos domínios P, C, V e TR, respectivamente. Vale mencionar que estas alterações não afetaram a estrutura secundária da molécula e também não alteraram os motivos de seqüências conservadas TCH e CCR. Ao contrário de resultados obtidos com variantes de HSVd de citros (PALACIO-BIELSA et al. 2004), observaram-se algumas mutações no domínio C dos clones de HSVd aqui caracterizados.

Para o CEVd, 53 diferenças foram observadas entre os clones CSC07 (DQ444473), NiagD11 (DQ444474) and CEVd-g (Y00328), sendo 7 mutações no domínio TL, e 10, 9, 17 e 10 mutações observadas nos domínios P, C, V e TR, respectivamente. Neste caso, as mutações também não afetaram a estrutura secundária das moléculas (Fig. 3b). As principais mutações concentraram-se nos *loops* e em bases não pareadas, sendo também observadas algumas mutações compensatórias como nos resíduos 137 (C→U), 227 (G→A), 273 (G→U) e 302 (U→C), onde o pareamento foi restaurado. O motivo conservado TCR e o domínio C também foram preservados nos clones analisados (Figura 3b). Observou-se também elevada variabilidade no domínio V e pouca variabilidade no domínio TL, confirmando relatos prévios para variantes de CEVd de citros (GANDÍA et al., 2005). Estes autores também descreveram que muitas mutações foram verificadas no domínio P, resultando no aumento do tamanho dos *loops*. O múltiplo alinhamento das seqüências dos clones analisadas neste trabalho (Figura 2) apresentou mudanças aleatórias



distribuídas ao longo das moléculas, porém preservando alguns domínios e estruturas secundárias em ambos os viróides (CEVd and HSVd), o que indica que estes devem seguir um modelo de quase-espécie (*quasispecies*) como já demonstrado por Gandía et al. (2005) para variantes de viróides de citros.

A.



B.

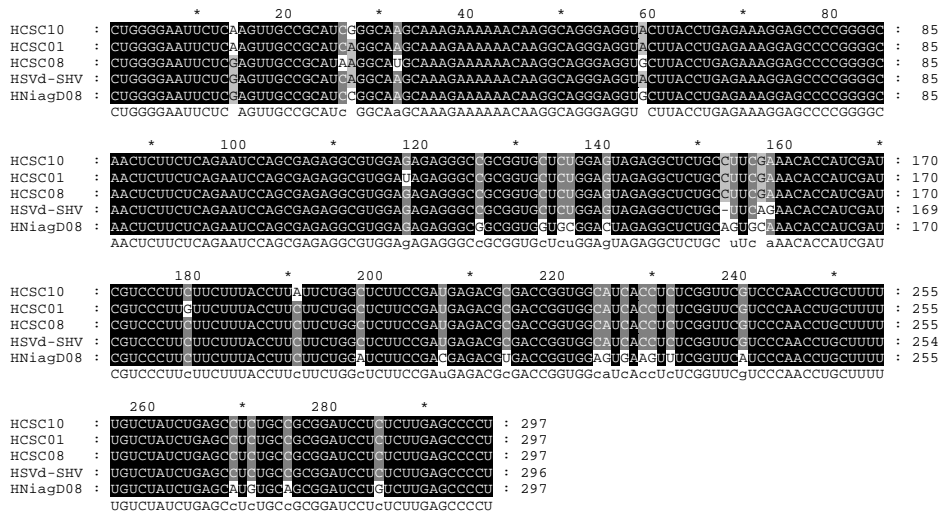
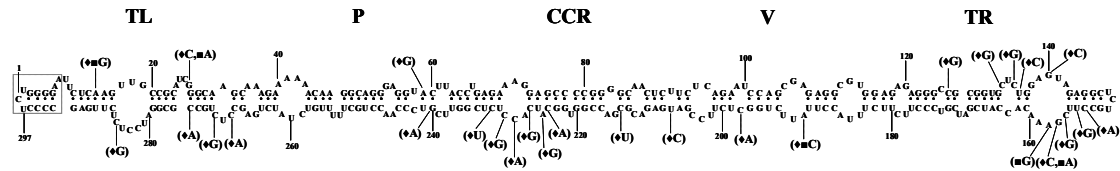


Figura 2 – Alinhamento múltiplo das variantes CEVd (A) e HSVd (B), isolados de videira. Os números correspondem aos resíduos e as seqüências consenso aparecem abaixo

### A. HSVd



### B. CEVd

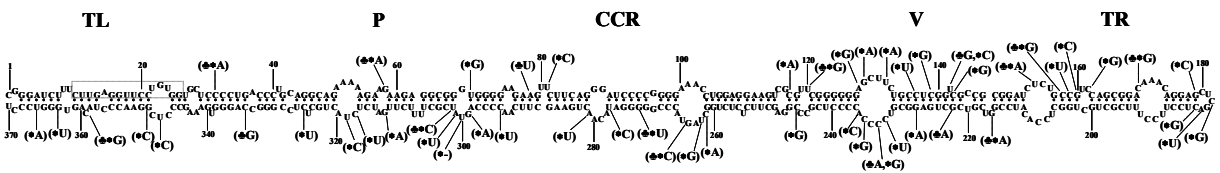


Figura 3 – (A) Estrutura secundária proposta para as variantes de HSVd, isoladas de videira *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ (HCSC10) com 297 nucleotídeos. A caixa identifica o motivo *Terminal Conserved Hairpin* (TCH). Os resíduos que diferem das seqüências do HSVd isolado de videira *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’ (HNiagD08) e do HSVd-SHV (M35717) estão marcados com “♦” e “■”, respectivamente; (B) Estrutura secundária proposta para as variantes de CEVd, isoladas de videira ‘Cabernet Sauvignon’ (CSC07) com 370 nucleotídeos. A caixa indica o motivo conservado *Terminal Conserved Region* (TCR). Os resíduos que diferem das seqüências do CEVd isolado de videira ‘Niagara Rosada’ (NiagD11) e CEVd-g (Y00328) estão marcados com “♣” e “\*”, respectivamente. No resíduo 300 está indicada a deleção na variante de CEVd-g (\*-), que apresenta 369 nucleotídeos. Para ambos (HSVd e CEVd), os cinco domínios (TL, P, C, V e TR) estão indicados e as estruturas estão representadas como mínima energia livre a 37 °C pelo programa MFold

Com as análises filogenéticas, baseadas nos alinhamentos múltiplos das variantes de HSVd e CEVd, pode-se observar que os quatro clones brasileiros de HSVd, isolados de videiras, agruparam-se com outros variantes de videira (do banco de dados), permanecendo isolados do grupo formado por variantes de citros (Figura 4). Além disso, observa-se na árvore filogenética que a variante HNiagD08 de ‘Niagara Rosada’ permaneceu isolada em um ramo único (Fig. 4). Isto pode ser devido à evolução e conseqüente adaptação desta variante a um novo genótipo (neste caso, a espécie *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’), ou pode representar uma seqüência de viróide que provavelmente não compartilha a mesma origem. Sano et al. (2001) sugeriram que o HSVd em lúpulo deve representar um estágio de transição de um viróide, originalmente de videira, que está em um processo de adaptação a um novo hospedeiro e, portanto, é mais agressivo e pode induzir sintomas. As variantes de HSVd têm sido divididas em três grupos baseados em análises filogenéticas: (i) grupo da videira e do lúpulo; (ii) grupo dos citros; e (iii) grupo das fruteiras de

caroço (SANO et al., 2001). Estes autores sugeriram que a doença em lúpulo tem sua origem em videira por meio de um “salto” do viróide do segundo para o primeiro. Bar-Joseph (2003) também relaciona a possível origem dos viróides de citros em videira. Esta conexão entre os viróides de videira e citros é provavelmente devido aos longos períodos de propagação vegetativa de materiais de videira infectados através da Ásia e Oriente Médio, antes da introdução de plantas cítricas nestas regiões.

Os clones brasileiros de CEVd agruparam-se com outras variantes de videira e citros, porém sem a formação de grupos específicos relacionados a origem geográfica ou hospedeira (Figura 5). Na verdade, há somente uma variante de CEVd isolada de videira depositada no banco de dados. Portanto as análises foram feitas comparando variantes de citros, as variantes seqüenciadas neste trabalho e a única seqüência de CEVd de videira, uma variante espanhola (CEVd-g, número de acesso Y00328), caracterizada por García-Arenal et al. (1987). Duas variantes de CEVd, isoladas de citros (CitE01 and CitE02) de São Paulo, foram também seqüenciadas neste trabalho e utilizadas nas análises (Figura 5).

Vale a pena mencionar que a presença de viróides em videira no Brasil é atribuída à introdução de material de propagação vegetativa (gemas e mudas) de outros países. O controle desses patógenos em videira nos Estados Unidos, Austrália, Espanha e Itália é baseado em programas de indexação, utilizando métodos moleculares para a detecção de viróides, além de um programa específico de limpeza clonal (obtenção de plantas-matrizes livres de vírus e viróides) destinado à manutenção e distribuição de material vegetal com elevada qualidade fitossanitária para os produtores. No Brasil, este sistema só é realizado para viróides de citros.

No presente trabalho, observou-se uma elevada variabilidade genética nas amostras analisadas, porém o panorama atual do comportamento dos viróides em videiras no Brasil permanece obscuro. Dado que os viróides apresentam ampla distribuição mundial em videiras, é possível que haja também uma ampla distribuição desses patógenos nos cultivos de videira no Brasil. Portanto, um levantamento da presença desses patógenos em cultivos de videira baseado em métodos moleculares permitirá estabelecer o panorama da distribuição e diversidade genética dos viróides no Brasil.

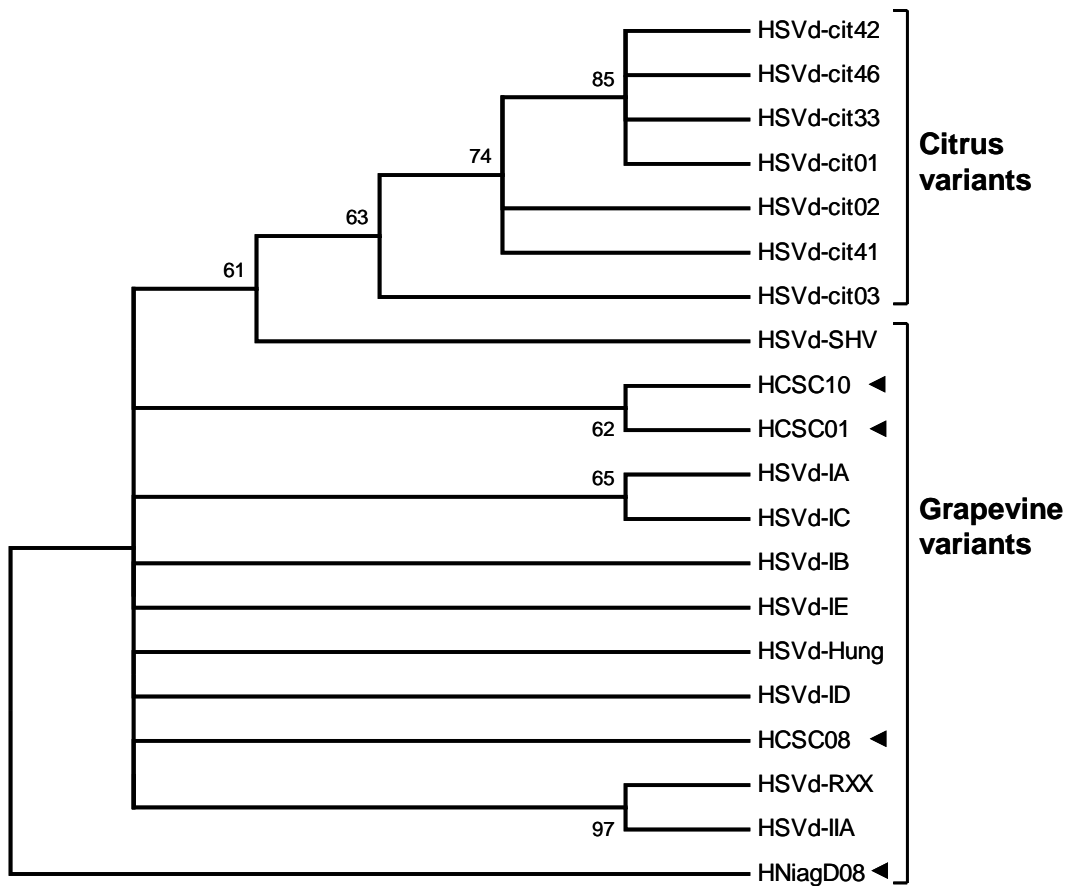


Figura 4 – Árvore filogenética obtida com o programa MEGA 3.2 utilizando neighbor-joining dos alinhamentos múltiplos das seqüências de nucleotídeos das variantes de HSVd de videira e citrus. HCSC01, HCSC08 and HCSC10 correspondem às variantes de videira *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ e HNiagD08 corresponde à variante de videira *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’ isoladas do Sul do Brasil (setas negras). Dois grupos principais são formados com variantes de vírus de citros e videira. Os valores de *bootstrap* (em porcentagem) para 2000 replicações estão indicados nos ramos. Os códigos de acesso no GenBank são apresentados na Tabela 2

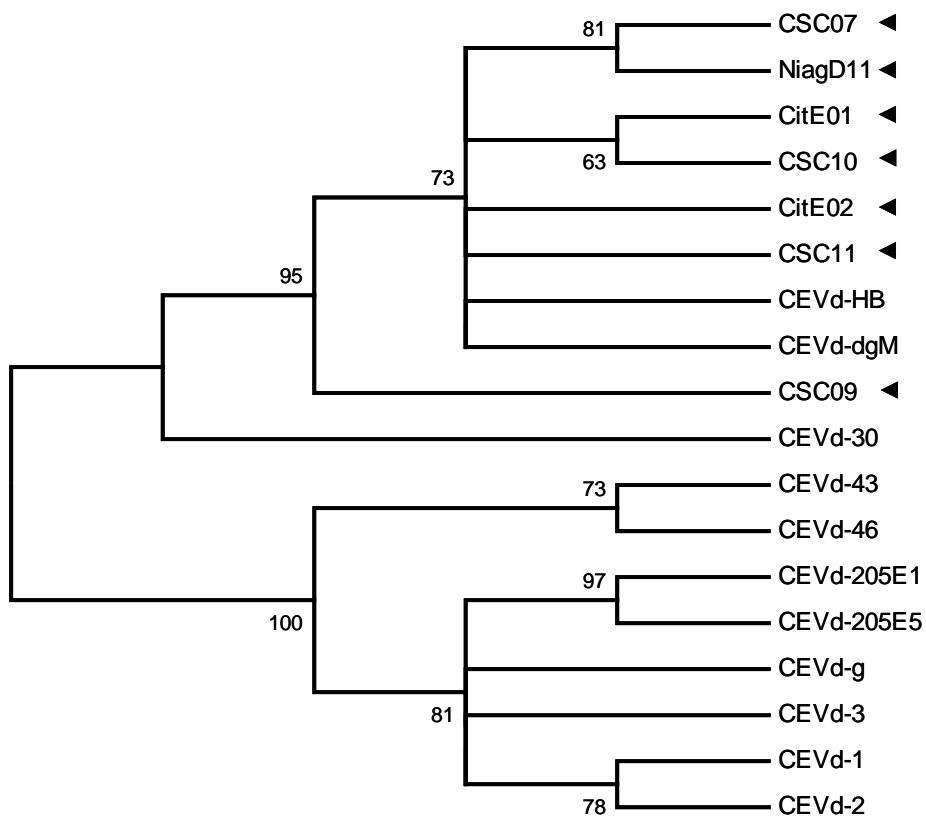


Figura 5 – Árvore filogenética obtida com o programa MEGA 3.2 utilizando neighbor-joining dos alinhamentos múltiplos das seqüências de nucleotídeos das variantes de CEVd de videira e citrus. CSC07, CSC09, CSC10 e CSC11 correspondem às variantes de CEVd isoladas de videira *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ e NiagD11 corresponde à variante isolada de videira *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’ provenientes do Sul do Brasil. CitE01 e CitE02 são variantes de CEVd de citrus de São Paulo seqüenciadas neste trabalho (setas negras). Os valores de *bootstrap* (em porcentagem) para 2000 replicações estão indicados nos ramos. Os códigos de acesso no GenBank são apresentados na Tabela 2

## Referências

- BAR-JOSEPH, M. Natural history of viroids – horticultural aspects. In: HADIDI, A., FLORES, R., RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. chap. 37, p.246-251. 2003.
- DE RIJK, P.; DE WACHTER, R. RNA Viz, a program for the visualization of RNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.4679-4684, 1997.
- FAJARDO, T.V.M.; KUHN, G.B.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Caracterização parcial de um isolado do *Grapevine fanleaf virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.505-511, 2000.
- FLORES, R.; DURAN-VILA, N.; PALLÁS, V.; SEMANCIK, J.S. Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevines. **Journal of General Virology**, Reading, v.66, p.2095-2102, 1985.
- FLORES, R.; HERNANDEZ, C.; MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; DARÓS, J.A.; DI SERIO, F. Viroids and viroid-host interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.117-139, 2005a.
- FLORES, R.; RANGLES, J.W.; OWENS, R.A.; BAR-JOSEPH, M.; DIENER, T.O. Viroidae. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER U.; BALL, A.L. (Ed.). **Virus taxonomy**: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier; Academic Press, 2005b. p.1145-1159.
- FONSECA, M.E.N.; KUHN, G. Natural infection of grapevine by Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.285, 1994. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 27., 1994, Itajaí.
- GANDÍA, M.; RUBIO, L.; PALACIO, A.; DURAN-VILA, N. Genetic variation and population structure of an isolate of *Citrus exocortis viroid* (CEVd) and of the progenies of two infectious sequence variants. **Archives of Virology**, Vienna, v.150, p.1945-1957, 2005.
- GARCÍA-ARENAL, F.; PALLÁS, V.; FLORES, R. The sequence of a viroid from grapevine closely related to severe isolates of citrus exocortis viroid. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.15, p.4203-4210, 1987.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v.5, p.150-163, 2004.
- LITTLE, A.; REZAIAN, M.A. Grapevine viroids. In: HADIDI, A., FLORES, R., RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. chap. 28, p.195-206.
- NICHOLAS, K.B., NICHOLAS, H.B.; DEERFIELD, D.W. II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetics Variation. **EMBNEW News**, v.4, p.14, 1997.

- PALACIO-BIELSA, A.; ROMERO-DURBÁN, J.; DURAN-VILA, N. Characterization of citrus HSVd isolates. **Archives of Virology**, Vienna, v.149, p.537-552, 2004.
- REZAIAN, M.A.; KOLTUNOW, A.M.; KRAKE, L.R. Isolation of three viroids and a circular RNA from grapevines. **Journal of General Virology**, Reading, v.69, p.413-422, 1988.
- REZAIAN, M.A.; KRAKE, L.R.; GOLINO, D.A. Common identity of grapevine viroids from USA and Australia revealed by PCR analysis. **Intervirolgy**, Basel, v.34, p.38-43, 1992.
- ROWHANI, A.; CHAY, C.; GOLINO, D.A.; FALK, B.W. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, p.749-753, 1993.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3<sup>th</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001. Não paginado.
- SANO, T.; CANDRESSE, T.; HAMMOND, R.W.; DIENER, T.O.; OWENS, R.A. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.89, p.10104-10108, 1992.
- SANO, T.; MIMURA, R.; OHSHIMA, K. Phylogenetic analysis of hop and grapevine isolates of Hop stunt viroid supports a grapevine origin for hop stunt disease. **Virus Genes**, Norwell, v.22, p.53-59, 2001.
- SANO, T.; OSHIMA, K.; HATAYA, T.; UYEDA, I.; SHIKATA, E.; CHOU, T.; MESHI, T.; OKADA, Y. A viroid-like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. **Journal of General Virology**, Reading, v.66, p.333-338, 1985.
- SEMANCIK, J.S.; SZYCHOWSKI, J.A. Relationships among the viroids derived from grapevines. **Journal of General Virology**, Reading, v.73, p.1465-1469, 1992.
- SHIKATA, E., SANO, T.; UYEDA, I. An infectious low molecular weight RNA was detected in grapevines by molecular hybridisation with hop stunt viroid cDNA. **Proceedings of Japan Academy Series B**, Tokyo, v.60, p.202, 1984.
- SINGH, R.P., READY, K.F.M.; NIE, X. Biology. In: HADIDI, A., FLORES, R., RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. chap. 3, p.30-48.
- SZYCHOWSKI, J.A., MCKENRY, M.V., WALKER, .A., WOLPERT, J.A., CREDI, R.; SEMANCIK, J.S. The vein-banding disease syndrome: a synergistic reaction between grapevine viroids and fanleaf virus. **Vitis**, Siebeldingen, v.34, p.229-232, 1995.
- TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; STUCHI, E.S.; SOUZA, J.M.; MULLER, G.W.; BORGES, K.M.; MACHADO, M.A. Hybridization techniques for indexing of citrus viroids in São Paulo State, Brazil. **Laranja**, Cordeirópolis, v.26, p.25-38, 2005.

ZUKER, M. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. **Science**, Washington DC, v.244, p.48-52, 1989.



## 4 ISOLAMENTO, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM RNA CIRCULAR DE SEQÜÊNCIA DESCONHECIDA: UM POSSÍVEL NOVO VIRÓIDE DE CITROS

### Resumo

Os viróides são considerados os menores e mais simples fitopatógenos conhecidos, por apresentarem um pequeno RNA circular de fita simples, com tamanho entre 246 e 401 nucleotídeos, com forte estrutura secundária, desprovidos de proteínas, sendo totalmente dependentes da célula hospedeira para a sua replicação. Atualmente, são classificados, de acordo com características biológicas e moleculares, em duas famílias (*Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*). No presente trabalho, empregou-se um método para a clonagem e caracterização de um RNA circular (com aproximadamente 300 nucleotídeos) de seqüência totalmente desconhecida, purificado de citros. Este RNA, quando submetido à eletroforese dupla em géis de poliacrilamida desnaturantes, apresentou um retardamento na migração, comportamento este similar ao dos viróides. Após a clonagem de fragmentos do RNA, amplificados via RT-PCR com oligonucleotídeos aleatórios (com seis nucleotídeos degenerados no terminal 3'), os clones foram seqüenciados. A partir desses dados, dois oligonucleotídeos adjacentes de polaridades opostas foram desenhados e utilizados para a amplificação via RT-PCR da seqüência completa do RNA circular. A análise das seqüências revelou a presença da CCR (região central conservada) do *Apple scar skin viroid* (ASSVd), espécie tipo do gênero *Apscaviroid*, compartilhando similaridades com outros membros deste gênero, sugerindo fortemente que o RNA circular é um viróide recombinante.

### Abstract

Viroids are the smallest known plant pathogens. They consist of unencapsidated, covalently closed circular single-stranded RNA (246 to 401 nucleotides), with autonomous replication, but totally dependent on host factors to complete their infectious cycle. Currently, they are classified, according to biological and molecular characteristics, in two families (*Pospiviroidae* and *Avsunviroidae*). Here we used a method for cloning and characterization of a circular RNA (with ca. 300 nucleotides) with unknown sequence, purified from citrus. This RNA, when submitted to PAGE in denaturing conditions, showed a slower mobility, similar to the typical viroids migration. After denaturation, the purified RNA was RT-PCR amplified, using a primer with six randomized positions at its 3' terminus, and finally cloned and sequenced. From these data, two adjacent primers of opposite polarities were designed and used to RT-PCR amplify the complete sequence. Analysis of the sequences revealed the presence of the CCR (central conserved region) of the *Apple scar skin viroid* (ASSVd), the type member of the genus *Apscaviroid*, and scattered similarities with other members of this genus, suggesting that the circular RNA is a viroid recombinant.

### 4.1 Introdução

Os viróides constituem os menores e mais simples fitopatógenos conhecidos, sendo considerados como parasitas moleculares no limiar da vida, pois os mesmos apresentam um

pequeno RNA circular de fita simples, com forte estrutura secundária (devido à complementariedade em amplas regiões da molécula), desprovidos de proteínas. Possuem genomas que variam entre 246 e 401 nucleotídeos e não codificam proteínas, sendo totalmente dependentes da célula hospedeira para a sua replicação (DIENER, 1991, 1996). Atualmente, são classificados em duas famílias: *Pospiviroidae* (replicação no núcleo via círculo rolante assimétrico) e *Avsunviroidae* (replicação nos cloroplastos via círculo rolante simétrico) (FLORES et al., 2005).

A molécula de RNA dos viróides da família *Pospiviroidae* apresenta cinco domínios: (i) Central (C), que contém a Região Central Conservada (CCR); (ii) Patogênico (P), relacionado com a expressão dos sintomas em alguns viróides; (iii) Variável (V), onde há a maior variabilidade entre viróides similares; (iv) terminal esquerdo (TL) e terminal direito (TR), em ambas extremidades da estrutura secundária em forma de haste e relacionam-se provavelmente com a replicação e recombinação dos viróides (KEESE; SYMONS, 1985; MCINNES; SYMONS, 1991; FLORES et al., 2005).

Os sintomas induzidos pelos viróides nas plantas hospedeiras são semelhantes àqueles induzidos pelos fitovírus. Este aspecto tem dificultado o diagnóstico e, de fato, uma série de doenças que inicialmente foram consideradas de etiologia viral comprovou-se posteriormente que o agente etiológico tratava-se de um viróide. Muitos viróides, assim como os vírus, são latentes: apesar de se replicarem e se acumularem nas plantas, não induzem sintomas visíveis. Porém, muitos deles induzem sintomas foliares como malformações, epinastia, rugosidade e manchas necróticas e/ou cloróticas; causam no caule de plantas lenhosas o encurtamento dos entrenós, descolorações, caneluras e necrose; e podem causar nos frutos e órgãos de reserva, deformações, descolorações e necrose. Como no caso dos vírus, o estudo dos viróides progrediu intensamente quando foram descobertas hospedeiras herbáceas, como o tomateiro para o *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) e a gynura para o *Citrus exocortis viroid* (CEVd), plantas que são fáceis de cultivar, desenvolvem sintomas específicos em pouco tempo e propiciam que o patógeno se replique e se acumule em elevadas concentrações (HADIDI et al., 2003).

Os primeiros estudos sobre a identificação de viróides foram feitos de maneira indireta, a partir de sintomas observados em hospedeiras naturais e mediante o uso de hospedeiras herbáceas que reagiam à infecção com sintomas específicos. Sobre esta suposta especificidade e tendo em conta que o PSTVd e o CEVd induziam sintomas semelhantes em suas hospedeiras experimentais

(tomateiro e gynura, respectivamente), presumiu-se que estes viróides seriam isolados de um mesmo agente. Com o advento de técnicas moleculares e, mais tarde com o seqüenciamento, observou-se que o PSTVd e o CEVd eram viróides distintos (com similaridade de seqüência em torno de 60%). Portanto, a identificação atual de novos viróides se faz preferencialmente por seqüenciamento ou mediante hibridização “*Northern-blot*” empregando-se sondas específicas que possibilita que se tenha uma idéia aproximada de seu tamanho e seqüência.

A caracterização completa de um RNA circular pode ser feita por meio de seqüenciamento direto do RNA, que apesar de ser uma técnica extremamente trabalhosa, permitiu que fosse seqüenciado e caracterizado o primeiro viróide, o PSTVd, espécie-tipo do gênero *Pospiviroid* (GROSS et al., 1978). Pode-se utilizar também oligonucleotídeos desenhados para hibridizar em uma região conhecida ou conservada da molécula, com a posterior amplificação por RT-PCR e seqüenciamento (VISVADER; SYMONS, 1985). Entretanto, para uma molécula de RNA circular (um putativo viróide) de seqüência totalmente desconhecida existem algumas aproximações que podem ser exploradas como as técnicas baseadas na hibridização de ácidos nucléicos (FLORES, 1986; FONSECA et al., 1996). Sinais de hibridização positivos, com sondas de seqüência conhecida indicam o provável relacionamento genético da molécula em questão; uma outra possibilidade é a RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados capazes de hibridizar com viróides de diferentes gêneros. Embora essas técnicas sejam extremamente sensíveis, há casos em que não é possível realizar a caracterização do RNA, uma vez que sua seqüência pode não apresentar similaridade com as sondas e oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Métodos para a clonagem e caracterização de RNAs de seqüência totalmente desconhecidas, baseados na utilização de pequenos oligonucleotídeos com porções degeneradas nos terminais 3', já haviam sido desenvolvidos (NAVARRO et al., 1996, 1998). Portanto, o presente trabalho visou à clonagem, identificação e caracterização de um pequeno RNA circular de seqüência totalmente desconhecida, isolado a partir de plantas de citros infectadas, sendo os procedimentos realizados de acordo com o protocolo do método 01, descrito por Navarro et al. (1998), com algumas modificações.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Material vegetal**

Plantas de cidra (*Citrus medica* L.), mantidas casa-de-vegetação sob condições controladas, provenientes de Valencia, Espanha, foram utilizadas como fonte de infecção. Os RNAs circulares foram propagados por enxertia. Vale ressaltar que alguns sintomas de arqueamento das folhas podiam ser observados durante os meses mais quentes do ano, o que indicou a possível presença de um viróide nessas plantas.

### **4.2.2 Extração de RNAs**

Para a extração de RNAs totais, 100 g de amostras foliares de plantas de cidra infectadas foram submetidas ao procedimento descrito por Flores et al. (1985).

### **4.2.3 Eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE)**

Os procedimentos foram realizados de acordo com Flores et al. (1985). Os RNAs extraídos foram submetidos a migração eletroforética por 1,5 h a 100 volts e 0,072 amperes em géis de poliacrilamida (PAGE) 5% não desnaturante e, posteriormente corados com brometo de etídeo para identificação da região de interesse (“viroid-range”). A região compreendida entre 250 e 350 pares de bases (tendo como referência o marcador de DNA 100 bp - Roche) foi cortada e cuidadosamente transferida para um segundo PAGE 5%, este por sua vez desnaturante (contendo uréia 8 M), sendo submetidos a uma nova eletroforese por 2,5 h, a 350 volts e 0,020 amperes. Os RNAs circulares foram identificados pela migração diferencial característica, após coloração com brometo de etídeo. Marcadores de DNA de dupla fita 100 bp e 50 bp (Roche) serviram como referência nas eletroforeses nativas.

### **4.2.4 Corte das bandas de interesse**

Após identificação das bandas de interesse (pela migração retardada em géis desnaturantes), as mesmas foram cortadas com lâmina de acrílico, sob luz ultravioleta, colocadas cuidadosamente sobre parafilme, cortadas em pequenos cubos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> e acondicionadas em tubos estéreis de 50 ml.

#### 4.2.5 Eluição de ácidos nucléicos de géis de poliacrilamida

Adicionou-se aos tubos que continha pequenos cubos de poliacrilamida com as bandas de RNA circular de interesse, 5 ml de TEP (0,1 M Tris-HCl, pH 9,0, 0,1 M 2-mercaptoetanol, 10 mM EDTA, 1% SDS) e 1 ml de fenol-clorofórmio (1-1). Após agitação por 12 h a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10000 rpm. A fase aquosa foi recuperada e transferida para um tubo limpo. Adicionou-se 1 ml de TEP e procedeu-se nova extração com forte agitação em vórtex e centrifugação por 5 min a 10000 rpm. Recuperou-se novamente a segunda fase aquosa e se combinou com a primeira, adicionou-se 1 ml de clorofórmio, e após agitação vigorosa em vórtex e centrifugação por 15 min a 13000 rpm recuperou-se a nove fase aquosa. Para a precipitação dos ácidos nucléicos adicionou-se 0,5 µl de azul de dextrano (*glycoblue*) como co-precipitante, 70 µl de acetato de sódio 3 M, pH 5,5 e 800 µl de isopropanol pré-resfriado. Após agitação por inversão, as amostras foram mantidas por 2,5 h a -20 °C e a seguir centrifugadas por 15 min a 13000 rpm. O sedimento foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 400 µl de água estéril. O conteúdo foi transferido para microtubo e precipitado com 1/10 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol. Em seguida, os RNAs purificados foram secos a vácuo e ressuspenso em 10 µl de água estéril.

#### 4.2.6 Transcrição reversa (RT)

Para a RT-PCR foi utilizado um oligonucleotídeo (*primer*) aleatório (NAVARRO et al., 1998), visando o anelamento em diversas regiões da molécula do RNA circular purificado do gel de poliacrilamida após eletroforese dupla (nativa e desnaturizante). Os RNAs purificados foram transferidos para um microtubo de 0,2 ml contendo o oligonucleotídeo RF503, que contém seis nucleotídeos degenerados no terminal 3'OH (5' GCCCATCACTGTCTGCCCGNNNNNN 3') (FROUSSARD, 1992). A relação de concentração (em massa) do oligonucleotídeo RF503 e do RNA circular molde deve ser de aproximadamente 10:1, respectivamente. Assim, empregou-se 5 µg do oligonucleotídeo RF503, pois a quantidade total de RNA circular foi de aproximadamente 500 ng. Misturaram-se 10 µl de RNA circular purificado (~500 ng), 1,3 µl de RF503 (~5 µg) e 4,7 µl de água estéril em um microtubo de 0,2 ml. Após incubação por 1,5 min a 100 °C, a amostra foi imediatamente colocada em gelo. Adicionou-se a seguir, 2,5 µl de tampão KGB 2X (200 mM KGlu, 50 mM Tris, 20 mM acetato de magnésio, 1 mM 2-mercaptoetanol, 0,1 mg/ml soro albumina bovina, pH 7,6), 0,5 µl de dNTPs (10 mM) e 1 µl (200 U/µl) da enzima transcriptase

reversa *SuperScript III* (Invitrogen), e incubou-se por 15 min a 42 °C, seguidos de 10 min a 55 °C, 5 min a 65 °C, 2 min a 100 °C e imediatamente resfriada em gelo. Após a transcrição reversa, adicionaram-se 4 µl de água estéril, 10 µl de tampão KGB 2X, 1 µl de Klenow DNA polimerase (5 U/µl) seguindo incubação por 30 min a 37 °C.

#### 4.2.7 PCR

As reações de PCR foram realizadas adicionando-se em um micro tubo de 0,2 ml, 40,5 µl de água estéril, 5 µl de tampão da Taq DNA polimerase (10X), 1 µl dNTPs 10 mM, 2 µl do oligonucleotídeo RF504 (5' GCCCCATCACTGTCTGCCCG 3'), complementar à região não degenerada do RF503, diluído a 50 pmoles e 1 µl de molde (obtido por RT-Klenow). Foi utilizado o termociclador *Mini Cycle TM* (MJ Research) e os reagentes do *kit Taq DNA Polymerase* (Roche), seguindo as recomendações do fabricante. As condições para a PCR foram de 94 °C/2 min de desnaturação inicial, seguida de trinta ciclos de 94 °C/40 s, 60 °C/2 min, 72 °C/2min, e extensão final de 72 °C por 10 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em géis de poliacrilamida 5% corados com brometo de etídeo sob luz ultravioleta (SAMBROOK et al., 1989).

#### 4.2.8 PAGE-Southern-blot

Após eletroforese em gel de poliacrilamida 5% por 2 h (75 mA, 110 volts), os produtos da RT-PCR (20 µl de DNA) foram transferidos para membrana de náilon de carga positiva (Roche). Além da amostra de interesse foram transferidos o controle da RT (reação de transcrição reversa sem o molde de RNA) e o controle da PCR (reação de PCR sem o molde RT-Klenow). Antes da transferência, o gel de poliacrilamida foi tratado com solução alcalina (0,2 M NaOH + 0,5 M NaCl) por 15 min para desnaturalizar os DNAs. Após a desnaturalização, promoveu-se lavagem com água destilada e neutralização com tampão de eletrotransferência 10X (250 mM Tris + 2 M glicina) por 5 min. A seguir o gel foi lavado com água e equilibrado com tampão de eletrotransferência 1X. Antes da eletrotransferência a membrana de náilon também foi equilibrada durante 5 min no mesmo tampão (1X). A transferência foi realizada fazendo-se um sanduíche de papéis (*Gel Blotting Paper 005*, Schleicher and Schuell) envolvendo o gel de poliacrilamida diretamente em contato com a membrana de náilon e utilizando-se do aparato de eletrotransferência *Semiphor* (Hoefer), seguindo as recomendações do fabricante. Após a

eletrotransferência por 1 h, os ácidos nucleicos foram fixados à membrana utilizando-se um aparato de *UV crosslinker UVC500* (Hoefler) com um pulso de 1200 ( $\times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ).

Para a síntese da sonda de RNA radioativa (“riboprobe”), RNAs circulares purificados de acordo com o descrito no item “Eluição de ácidos nucleicos de géis de poliacrilamida”, foram ressuspensos em 50  $\mu\text{l}$  de formamida e a seguir fervidos a 100 °C por 15 min para se promover a quebra aleatória da molécula em fragmentos de distintos tamanhos. A seguir, a precipitação foi realizada em presença de 2,5 volumes de etanol e 0,1 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5 e os RNAs foram ressuspensos em 6,5  $\mu\text{l}$  de água estéril. A marcação da sonda foi realizada adicionando-se aos 6,5  $\mu\text{l}$  de RNA, 2  $\mu\text{l}$  do tampão da enzima polinucleotídeo quinase (PNK) (10X), 0,5  $\mu\text{l}$  de inibidor de RNases, 1  $\mu\text{l}$  de PNK e 10  $\mu\text{l}$  de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (3000 Ci/mmol). A reação foi incubada por 30 min a 37 °C e fracionada em uma mini-coluna Sephadex G-50 (Roche) de acordo com as recomendações do fabricante (Obs: estas colunas são utilizadas para purificar sondas radiotivas por cromatografia de exclusão molecular, que visa eliminar nucleotídeos radioativos não incorporados). Após a purificação, a radioatividade da sonda foi estimada por meio de leitura em contador de cintilações (*Liquid Scintillation Counter, Wallac 1409*, Pharmacia). O valor obtido foi de 6500 cpm/ $\mu\text{l}$ .

A membrana de náilon foi pré-hibridizada em solução de hibridização (0,25 volumes de SSC, 0,1 volume de SDS, 0,5 volume de formamida, 10 mg/ml de DNA de esperma de salmão, 0,1 volume de Ficoll, 0,1 volume de polivinilpirrolidone) por 3 h a 55 °C. A seguir, a membrana foi incubada a 55 °C por 12 h em contato com 10  $\mu\text{l}$  da sonda radioativa (previamente desnaturada em 100  $\mu\text{l}$  de solução de hibridização a 99 °C por 3 min e imediatamente resfriada em gelo). Após a hibridização, a membrana foi lavada três vezes em SSC 2X e 0,1% SDS por 15 min a temperatura ambiente, e uma vez com SSC (0,1X) e 0,1% SDS a 55 °C e, finalmente, colocada em contato com um filme Super RX (*Medical X-Ray Film*, Fuji) e revelada após 72 h de exposição (SAMBROOK et al., 1989).

#### **4.2.9 Cinética para a síntese da sonda**

Os RNAs circulares purificados foram submetidos a uma nova dupla eletroforese em gel de poliacrilamida (conforme descrito anteriormente). As bandas foram cortadas e os RNAs eluídos por difusão, precipitados e ressuspensos em 100  $\mu\text{l}$  de formamida. A seguir, alíquotas de 10  $\mu\text{l}$  foram submetidas a diferentes tempos (0, 5, 15, 30, 60, 120 e 240 min) de desnaturação a

100 °C. As alíquotas foram precipitadas com 2,5 volumes de etanol, 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5, 0,5 µl de azul de dextrano e ressuspendidas em 6,0 µl de água estéril. A marcação radioativa em 5' foi realizada conforme descrito no item anterior, sendo as alíquotas desnaturadas a 100 °C por 2 min, colocadas imediatamente em gelo e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 5% 8 M uréia, em TBE 1X, a 200 volts por 2 h.

#### 4.2.10 Clonagem

Os produtos amplificados via RT-PCR foram eluídos do gel de poliacrilamida, de acordo com o método descrito acima, sendo realizada ao final uma precipitação adicional com 1/10 do volume de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol. Após a eluição, promoveu-se reação de ligação dos produtos da RT-PCR com 55 ng/µl do vetor pTZ57R/T (Fermentas) em presença de T4 DNA ligase (Roche) e tampão apropriado. A ligação foi realizada em um volume total de 10 µl, a 22 °C por 12 h. Os 10 µl de ligação foram purificados com um kit (*MinElute Gel Extraction*, Qiagen) e eluídos em 10 µl de tampão de eluição diluído 5X. O kit *DNA Clean & Concentrator* (Zymo Research) também foi alternativamente utilizado por apresentar colunas mais adequadas para eluição de volumes pequenos de DNA. Ambos os kits foram utilizados seguindo às recomendações dos respectivos fabricantes.

Para as transformações utilizaram-se células competentes de *Escherichia coli* (DH5-α). As transformações foram realizadas adicionando-se 40 µl de células competentes e 10 µl da reação de ligação purificada em uma cubeta de eletroporação de 0,1 cm. A seguir, aplicou-se um pulso de 1,25 milivolts, 25 µF e 200 ohms em eletroporador (Bio-Rad). Imediatamente após a eletroporação adicionou-se 1 ml de SOC (20 g/l triptona, 5 g/l extrato de levedura, 0,5 g/l NaCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) à cubeta pipetando vigorosamente por 4 a 6 vezes. A seguir, passou-se o conteúdo para microtubo onde permaneceu a 37 °C por 1 h sob agitação. Em seguida, 100 µl foram transferidos para placas de Petri contendo meio sólido LB (15 g de ágar, 5 g extrato de levedura, 10 g triptona e 10 g NaCl para um litro de água) contendo ampicilina (50 µg/ml) e X-Gal (30 µl). As placas foram mantidas a 37 °C por 12 h.

#### 4.2.11 Mini-preparações (mini-preps)

As colônias brancas (aproximadamente 10 colônias por placa) resultantes da transformação, que possivelmente continham os insertos de interesse, foram selecionadas e



repicadas para tubos estéreis contendo 2 ml de meio LB com ampicilina (50 µg/ml) e mantidos a 37 °C sob agitação por 12 h. Após esse período, 1,5 ml do meio foram transferidos para microtubos de 1,5 ml para se promover à extração dos plasmídeos. Utilizou-se o kit de purificação de plasmídeos da Roche, seguindo indicações do fabricante. A concentração de DNAs purificados foi estimada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e também por espectrofotometria.

#### **4.2.12 Análise dos plasmídeos**

Para verificar a presença de insertos, promoveu-se digestão dos plasmídeos com a enzima de restrição *EcoRI*. Os produtos digeridos foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo sob luz ultravioleta. Os DNAs do gel foram transferidos para membrana de náilon seguindo os tratamentos e protocolos descritos acima para PAGE-Southern. Utilizou-se também a mesma sonda sintetizada a partir de RNAs purificados da dupla eletroforese (PAGE 5% e PAGE 5% com uréia 8 M).

#### **4.2.13 Seqüenciamento dos clones selecionados**

Os plasmídeos contendo insertos, selecionados pela digestão seguida de hibridização com sonda sintetizada a partir dos RNAs purificados, foram enviados para seqüenciamento com os oligonucleotídeos iniciadores T7 (senso) e SP6 (anti-senso). As comparações com seqüências existentes no banco de genes internacional (*GenBank*) foram feitas com o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponível na internet no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. As seqüências foram alinhadas e analisadas com os programas *Clustal X* e *GeneDoc*.

#### **4.2.14 Desenho dos oligonucleotídeos a partir das seqüências obtidas**

A partir do alinhamento múltiplo das seqüências obtidas dos clones positivos, desenharam-se oligonucleotídeos adjacentes e de polaridade oposta (senso e anti-senso) para a amplificação de toda a molécula do RNA circular via RT-PCR. Um esquema do método, utilizado neste trabalho, para a clonagem e caracterização de um RNA circular de seqüência totalmente desconhecida, baseado no método 1 do trabalho e Navarro et al. (1998), é apresentado na Figura 1.

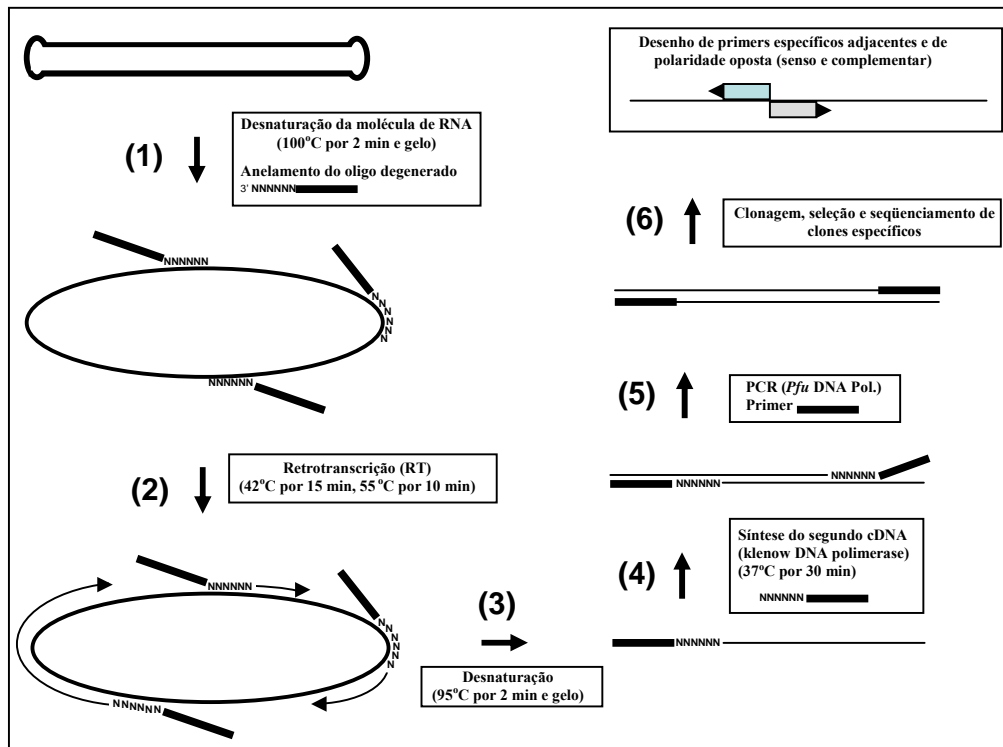


Figura 1 – Esquema simplificado do método empregado para a caracterização de um RNA circular de sequência desconhecida. Adaptado de Navarro et al. (1998)

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Extração dos RNAs totais e RT-PCR

Os RNAs totais extraídos foram separados mediante PAGE 5% (em condições nativas), corados com brometo de etídeo e observados sob luz ultravioleta (Figura 2). Em seguida promoveu-se o corte do gel na posição indicada pelo colchete (Figura 2), e transferiu-se a tira de gel para um outro gel, sendo realizada uma segunda eletroforese, porém em condições desnaturantes (em presença de uréia 8 M). Os resultados são apresentados na Figura 3, onde há bandas que se retardaram no gel, indicando a possibilidade de serem RNAs circulares do tipo viroidal.

Essas bandas de RNA circular (indicadas com uma seta na Figura 3) foram eluídas e submetidas à RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores aleatórios (NAVARRO et al., 1998). Os resultados (Figura 4) mostram que um rastro (populações de moléculas de DNA amplificadas de

diferentes tamanhos, no caso entre 100 e 500 pares de bases) foi obtido. As bandas foram cortadas (em três alíquotas - indicadas com colchetes à direita da Figura 4 - de 100 a 200, 200 a 300 e 300 a 500 pb), eluídas do gel por difusão e utilizadas para a clonagem em plasmídeo pTZ57R/T.

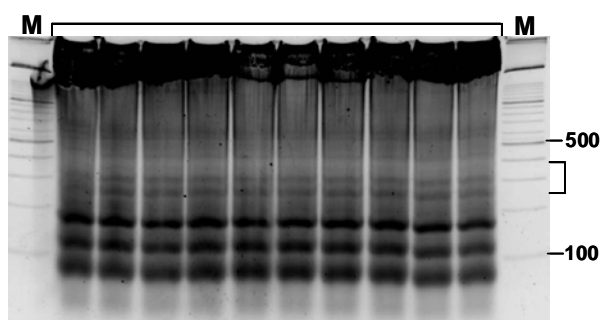


Figura 2 – PAGE 5% (nativo) dos RNAs extraídos e parcialmente purificados de cidra (a amostra total foi subdividida em 10 alíquotas de 50  $\mu$ l). M – Marcador de DNA 100 bp (Roche); O gel foi cortado entre as bandas de 250 pb e 350 pb do marcador de DNA (indicado pelo colchete à direita) e colocado sobre outro PAGE 5% contendo uréia 8M

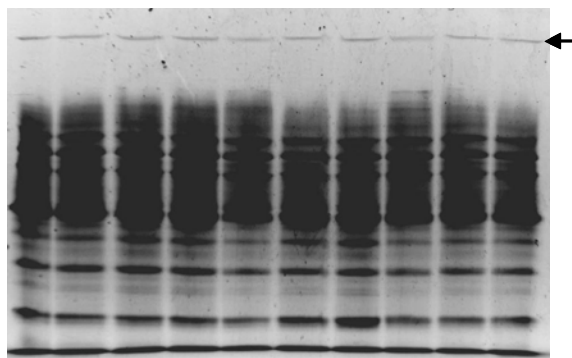


Figura 3 – Resultado da eletroforese em PAGE 5% (8M de uréia - desnaturante) de parte do gel cortado da figura 2; a seta indica os RNAs circulares de interesse, os quais migram mais lentamente. Esses RNAs foram cortados e eluídos do gel

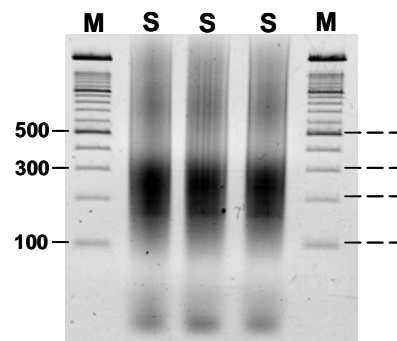


Figura 4 – PAGE (5%) da RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores aleatórios dos RNAs circulares purificados. M – Marcador de DNA – 100 bp (Roche); S – Amostras amplificadas; Os colchetes indicam as três regiões que foram cortadas do gel para clonagem (entre 100 e 200 pb, 200 e 300 pb e 300 a 500 pb)

#### 4.3.2 Preparação e análise da sonda

Os RNAs circulares purificados e precipitados foram eluídos em formamida e divididos em alíquotas de 10  $\mu$ l e submetidas a diferentes tempos (0, 5, 15, 30, 60, 120 e 240 min) de incubação a 100 °C. Após a precipitação, eluição e marcação radioativa em 5', realizou-se a desnaturação a 100 °C por 2 min, resfriamento em gelo e eletroforese em gel de poliacrilamida 5% em condições desnaturantes. Os resultados (Figura 5) mostram que a partir de 60 min inicia-se o acúmulo de uma maior concentração de RNAs marcados (sonda). A partir desses resultados, empregou-se o tempo de 2 h (120 min) de desnaturação para posterior marcação da sonda. Observou-se também que acima de 120 min de desnaturação, uma significativa quantidade de RNAs (sonda) foi degradada.

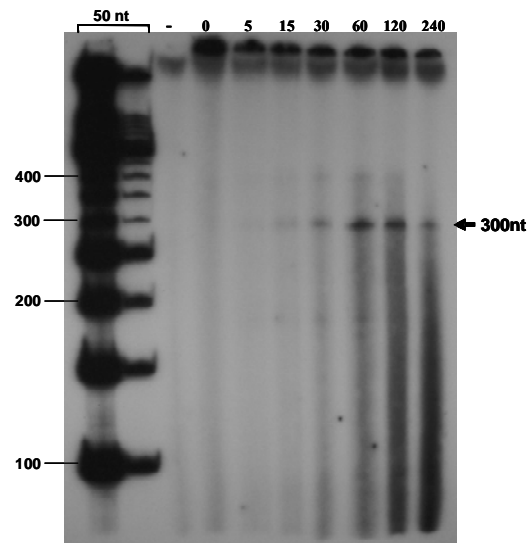


Figura 5 – Cinética para a síntese da sonda em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 15, 30, 60, 120 e 240 min) de incubação a 100 °C, sendo os RNAs a seguir resfriados em gelo e submetidos à PAGE 5% em condições desnaturantes. A partir de 60 min de desnaturação inicia-se o acúmulo de uma maior concentração de RNAs marcados com 300 nucleotídeos, sonda (seta). À esquerda observa-se o marcador de RNA (50 nt) marcado com  $^{32}\text{P}$

#### 4.3.3 Southern-Blot

Para a confirmação da identidade dos produtos amplificados, promoveu-se a transferência dos produtos de DNA do gel da RT-PCR para uma membrana de náilon, que foi hibridizada com uma sonda radioativa, previamente sintetizada a partir de uma alíquota dos RNAs circulares purificados. O resultado do *Southern-blot* (Figura 6) mostra a ausência de sinal de hibridização nos controles e um forte sinal na amostra infectada.

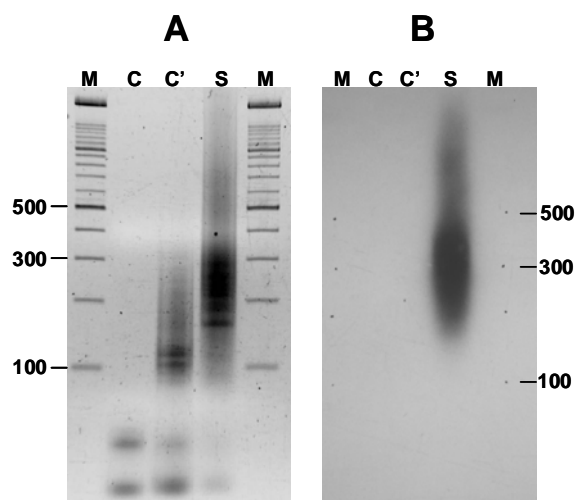


Figura 6 – (A) Análise em PAGE dos produtos de RT-PCR obtidos com iniciadores aleatórios dos RNAs circulares purificados em gel corado com brometo de etídeo. Os DNAs contidos neste gel foram eletro-transferidos para membrana de náilon. M – Marcador de DNA – 100 bp (Roche), C – controle da RT, C' – controle da PCR; S – amostra de RNAs de cidra amplificada via PCR; (B) Southern-blot correspondente ao gel contendo fragmentos amplificados via RT-PCR, com sonda de RNA (riboprobe) sintetizada a partir dos RNAs purificados em dupla eletroforese

#### 4.3.4 Clonagem e análise dos clones obtidos

Na Figura 7A podem ser observados os resultados das análises das digestões dos clones candidatos a conter fragmentos oriundos dos RNAs circulares purificados e amplificados via RT-PCR com primers aleatórios. A confirmação da identidade dos clones foi realizada por meio de *Southern-blot* utilizando uma sonda sintetizada a partir dos RNAs circulares purificados, sendo obtidos alguns sinais positivos como indicados nas setas (Figura 7B). Alguns clones candidatos foram enviados para seqüenciamento.

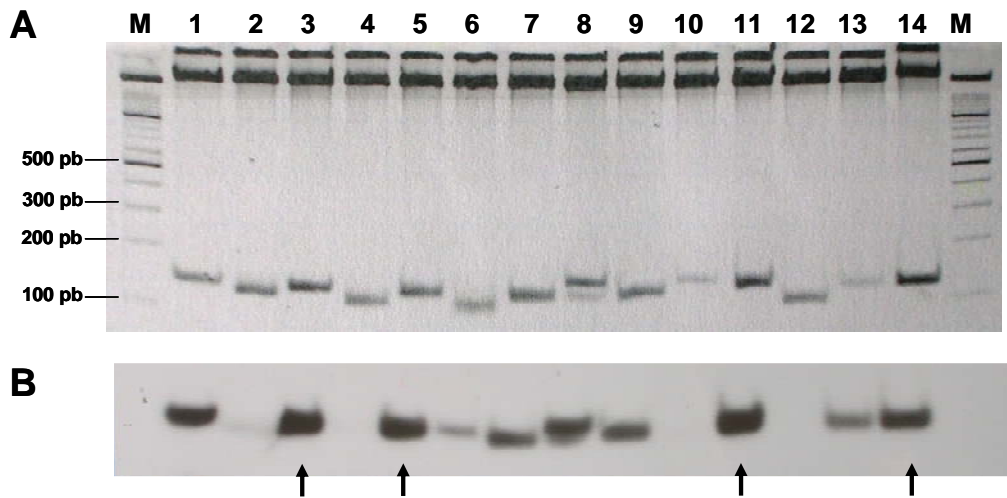


Figura 7 – (A) Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo dos produtos da digestão com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I dos plasmídeos isolados por meio de mini-preparações (mini-prep, kit Roche); 1 a 14 – clones digeridos e insertos liberados com tamanho entre 100 e 200 pb; M=Marcador de DNA – 100 pb (Roche); (B) *Southern-blot* com riboprobe (sonda de RNA marcada em 5') sintetizada a partir do RNA circular de seqüência desconhecida para identificar os insertos de interesse – as setas indicam os clones selecionados e enviados para seqüenciamento

#### 4.3.5 Seqüenciamento e análise das seqüências

Os plasmídeos (contendo os insertos), que hibridizaram por *Southern-blot* com a sonda sintetizada a partir do RNA circular de seqüência desconhecida, foram seqüenciados com os oligonucleotídeos T7 e SP6. As seqüências dos clones obtidas foram comparadas com outras existentes no banco de genes internacional (*GenBank*), e quatro apresentaram 31 nucleotídeos com 99% de identidade com a CCR do *Apple scar skin viroid*, espécie tipo do gênero *Apscaviroid* (Figuras 8 e 9). O restante das seqüências dos clones não apresentou similaridade significativa com outras seqüências depositadas no *GenBank*. A partir do alinhamento dos clones, desenharam-se oligonucleotídeos específicos (5' CTGTCCACTCATGAAAGAAGAGG 3' - senso, e 5' CAGCAGCTGCTTCCGGCCACTCG 3' - anti-senso), para a amplificação da seqüência completa do viróide via RT-PCR (Figura 8). Os resultados da RT-PCR com os oligonucleotídeos específicos estão apresentados na Figura 9. Observou-se que fragmentos de aproximadamente 300 pares de bases foram amplificados com sucesso, além da amplificação de fragmentos com aproximadamente 600 pares de bases que devem corresponder a seqüências diméricas. A análise das seqüências dos clones referentes à molécula inteira (com 294 nucleotídeos) revelou a presença

da CCR do *Apple scar skin viroid* (ASSVd), espécie tipo do gênero *Apscaviroid*, além de compartilhar similaridades com outros membros deste gênero, sugerindo fortemente que o RNA circular é um viróide recombinante.

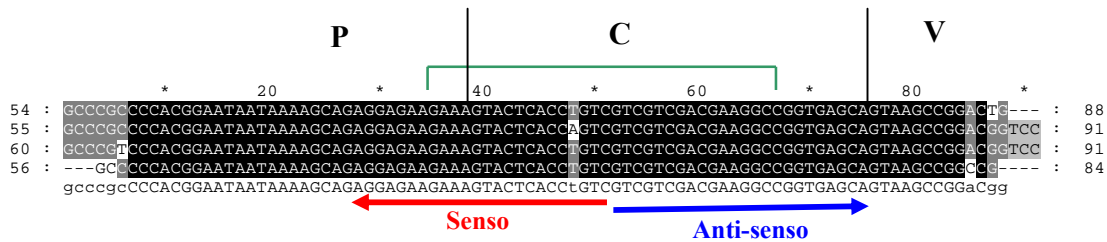


Figura 8 – Alinhamento de parte das seqüências de nucleotídeos dos quatro clones (54, 55, 56 e 60) selecionados via *Southern-blot*. As setas vermelha e azul correspondem aos oligonucleotídeos senso e anti-senso, respectivamente, desenhados (a partir deste alinhamento) para a amplificação por RT-PCR do RNA circular do viróide. P, C e V são os domínios patogênico, central e variável, respectivamente. Em verde está marcada a região que apresentou homologia com o *Apple scar skin viroid* (ASSVd), espécie-tipo gênero *Apscaviroid*

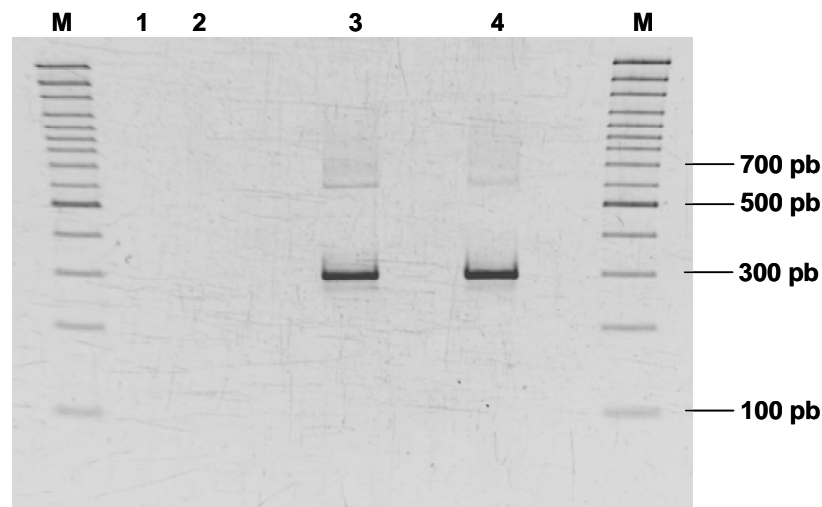


Figura 9 – Análise em PAGE (5%) dos produtos da RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos baseados na região conservada dos clones seqüenciados (54, 55, 56, 60). Produtos de DNA com aproximadamente 300 pares de bases (monômero) e 600 pb foram amplificados com sucesso (amostras 3 e 4). M – marcador de DNA (100 bp ladder, Roche); 1 – controle da PCR; 2 – controle da RT-PCR; 3 – RT-PCR a partir de preparação de RNA circular purificado; 4 – RT-PCR a partir de preparação de RNAs totais

A estrutura secundária proposta, obtida com o programa MFold com mínima energia livre (formada a 24°C) e visualizada pelo programa RNAviz para o RNA circular do viróide de citros



com 294 nucleotídeos, revelou uma molécula de RNA estruturada devido aos pareamentos de bases, típica dos viróides da família *Pospiviroidae*, além da presença dos domínios conservados TCR (terminal conserved region), presente nos gêneros *Pospiviroid*, *Apscaviroid* e *Coleviroid* e a CCR, onde na parte superior está presente o “hairpin I” (Figura 10).

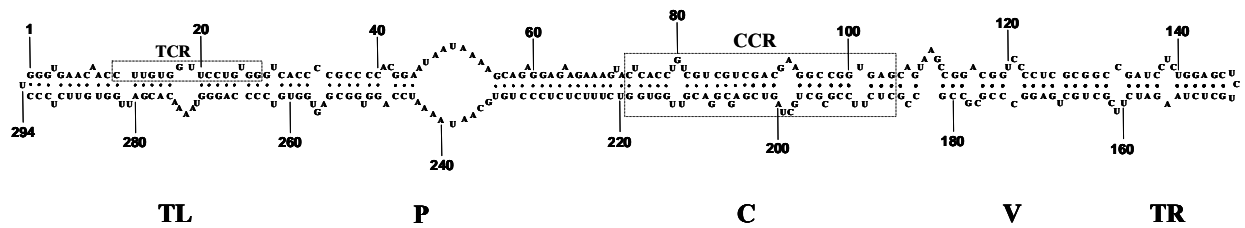


Figura 10 – Estrutura secundária proposta, obtida com o programa MFold com mínima energia livre (formada a 24°C) e visualizada pelo programa RNAviz, para o RNA circular do viróide de citros com 294 nucleotídeos. Os domínios terminal esquerdo e direito (TL and TR, respectivamente), central (C), patogênico (P) e variável (V) estão indicados. A região central conservada (CCR) e a região terminal conservada (TCR, presente nos gêneros *Pospiviroid*, *Apscaviroid* e *Coleviroid*) estão também indicadas em caixas. Na parte superior da CCR está presente o motivo de sequência invertida “hairpin I”

#### 4.4 Discussão

O método para a clonagem de um RNA circular de sequência totalmente desconhecida (NAVARRO et al., 1998), utilizado com sucesso neste capítulo, já foi empregado em outros trabalhos para a clonagem: (i) de um intron de cloroplastos de cherimoleira (*Annona cherimola* L.) (DARÒS; FLORES, 1996); (ii) do *Apple dimple fruit viroid* de macieira (DI SERIO et al., 1996); (iii) de um RNA do tipo viroidal de cerejeira (DI SERIO et al., 1997); (iv) e, mais recentemente, de um novo viróide isolado de berinjela (FADDA et al., 2003a). Além da principal vantagem do método, de não haver a necessidade de conhecimento prévio da sequência do RNA para a sua clonagem, somente quantidades mínimas de RNAs presentes nas amostras são requeridas. Porém, estes RNAs devem ser purificados (submetidos, pelo menos a duas eletroforeses, sendo uma delas em condições desnaturantes) para que estejam livres de outros RNAs contaminantes (NAVARRO et al., 1998), uma vez que a metodologia é baseada na potente técnica de RT-PCR com oligonucleotídeos aleatórios, capazes de se hibridizarem em qualquer

molde, e principalmente com os RNAs ribossômicos, presentes em grandes concentrações nos extratos foliares.

As seqüências de quatro clones apresentaram até 99% de identidade com a CCR do *Apple scar skin viroid*, espécie-tipo do gênero *Apscaviroid* (Figura 8), sendo que o restante das seqüências não apresentou similaridade significativa com outras seqüências depositadas no *GenBank*. A análise da seqüência e da estrutura secundária proposta (Figura 10) revelou que o RNA circular isolado de citros é um possível novo viróide e que, provavelmente, seja derivado de um ou mais eventos de recombinação. O posicionamento taxonômico definitivo deste novo viróide dependerá de análises moleculares para se estabelecer os níveis de identidade de diferentes porções do genoma e os níveis de ocorrência dos prováveis eventos de recombinações, além dos ensaios biológicos para se avaliar o círculo de hospedeiros, proteção cruzada e efeitos em infecções simultâneas com outros viróides de citros.

A ocorrência de eventos de recombinação entre diferentes viróides tem sido freqüente como nos casos do *Australian grapevine viroid* (AGV) (REZAIAN, 1990), do *Columnnea latent viroid* (CLVd) (HAMMOND et al., 1989) e do *Pear blister canker viroid* (PBCVd) (HERNÁNDEZ et al., 1992), além dos eventos intra-específicos já relatados para o *Coconut cadang-cadang viroid* (CCCVd) em coqueiro (HASELOFF et al., 1982) e para o *Citrus exocortis viroid* em tomateiro (SEMANCIK et al., 1994) e berinjela (FADDA et al., 2003b).

Os citros são hospedeiros de cinco espécies de viróides relatadas até o momento: o *Citrus exocortis viroid* (CEVd) pertencente ao gênero *Pospiviroid*; o *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) e o *Citrus viroid III* (CVd-III), ambos do gênero *Apscaviroid*; o *Hop stunt viroid* (HSVd), do gênero *Hostuviroid*; e o *Citrus viroid IV* (CVd-IV), do gênero *Cocadviroid*, sendo todos pertencentes à família *Pospiviroidae*. Há pelo menos duas doenças descritas em variedades de citros de importância econômica: (i) a exocorte dos citros causada por variantes do *Citrus exocortis viroid*; (ii) e a xiloporose (ou cachexia), causada por variantes específicas do *Hop stunt viroid* (DURAN-VILA; SEMANCIK, 2003). Porém, outras infecções induzidas por viróides em plantas cítricas transcorrem sem a expressão de sintomas, o que facilita a disseminação desses patógenos via práticas agrícolas, principalmente por meio de enxertia.

Um outro aspecto que deve ser lembrado é que, em muitos dos casos, diferentes viróides podem infectar uma mesma planta e causar sintomas distintos daqueles causados em infecções simples. Podem também ocorrer casos em que a presença de viróides distintos levam à indução de

um sintoma característico de um determinado viróide, mesmo na sua ausência (ITO et al., 2002). Além disso, muitos viróides comportam-se nas suas plantas hospedeiras como populações de moléculas quase idênticas (ou *quasispecies*), fato já observado para alguns viróides de citros (GANDÍA; DURAN-VILA, 2004; GANDÍA et al., 2005). Estas variantes resultam de mutações que podem afetar tanto a estrutura secundária da molécula como a indução dos sintomas. Como os viróides não codificam proteínas e, portanto, necessitam de fatores do hospedeiro para completar as diferentes etapas de seu ciclo infeccioso, eles devem manter sua estrutura secundária e os motivos conservados em sua molécula (GANDÍA et al., 2005). Vale a pena lembrar também que uma simples mutação na molécula de RNA de um viróide pode ampliar sua gama de hospedeiros (WASSENBERGER et al., 1996), e que algumas mutações em motivos específicos da molécula de RNA estão relacionadas com a indução de determinados sintomas (PALACIO-BIELSA et al., 2004). Estes fatos demonstram a importância da caracterização completa da molécula de RNA dos viróides para que se possam estabelecer ações estratégicas de controle e também para que se tenha um melhor entendimento dos diferentes fatores que mediam as interações destes patógenos com a planta hospedeira.

## Referências

DARÒS, J.A.; FLORES, R. A group I plant intron accumulates as circular RNA forms with extensive 5' deletions in vivo. **RNA**, Woodbury, v.2, p.928-936, 1996.

DI SERIO, F.; DARÒS, J.A.; RAGOZZINO, A.; FLORES, R. A 451-nucleotide circular RNA from cherry with hammerhead ribozymes in its strands of both polarities. **Journal of Virology**, Washington DC, v.71, p.6603-6610, 1997.

DI SERIO, F.; APARICIO, F.; ALIOTO, D.; RAGOZZINO, A.; FLORES, R. Identification and molecular properties of a 306 nucleotide viroid associated with apple dimple fruit disease. **Journal of General Virology**, Reading, v.77, p.2833-2837, 1996.

DIENER, T.O. The frontier of life: the viroids and viroid-like satellite RNAs. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.) **Viroids and satellites: molecular parasites at the frontier of life**. London: CRC Press, 1991. chap. 1, p.1-20.

DIENER, T.O. Origin and evolution of viroids and viroid-like satellite RNAs. **Virus Genes**, Norwell, v.11, p.119-131, 1996.

DURAN-VILA, N.; SEMANCIK, J.S. Citrus viroids. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, p.178-194. 2003.

- FADDA, Z.; DARÒS, J.A.; FLORES, R.; DURAN-VILA, N. Identification in eggplant of a variant of citrus exocortis viroid (CEVd) with a 96 nucleotide duplication in the right terminal region of the rod-like secondary structure. **Virus Research**, Amsterdam, v.97, p.145-149, 2003b.
- FADDA, Z.; DARÒS, J.A.; FAGOAGA, C.; FLORES, R.; DURAN-VILA, N. Eggplant latent viroid (ELVd): candidate type species for a new genus within family Avsunviroidae (hammerhead viroids). **Journal of Virology**, Washington DC, v.77, p.6528-6532, 2003a.
- FLORES, R. Detection of citrus exocortis viroid in crude extracts by dot-blot hybridization: conditions for reducing spurious hybridization results and for enhancing the sensitivity of the technique. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.13, p.161, 1986.
- FLORES, R.; DURAN-VILA, N.; PALLÁS, V.; SEMANCIK, J.S. Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevines. **Journal of General Virology**, Reading, v.66, p.2095-2102, 1985.
- FLORES, R.; HERNÁNDEZ, C.; MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; DARÒS, J.A.; DI SERIO F. Viroids and viroid-host interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p. 117-139, 2005.
- FONSECA, M.E.N.; MARCELLINO, L.H.; GANDER, E. A rapid and sensitive dot-blot hybridization assay for the detection of citrus exocortis viroid in *Citrus medica* with digoxigenin-labelled RNA probes. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.57, p.203-207, 1996.
- FROUSSARD, P. A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, p.2900, 1992.
- GANDÍA, M.; DURAN-VILA, N. Variability of the progeny of a sequence variant of *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd). **Archives of Virology**, Vienna, v.149, p. 407-416, 2004.
- GANDÍA, M.; RUBIO, L.; PALACIO, A.; DURAN-VILA, N. Genetic variation and population structure of an isolate of *Citrus exocortis viroid* (CEVd) and of the progenies of two infectious sequence variants. **Archives of Virology**, Vienna, v.150, p. 1945-1957, 2005.
- GRILL, L.K.; SEMANCIK, J.S. RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.75, p.896-900, 1978.
- GROSS, H.J.; DOMDEY, H.; LOSSOW, C.; JANK, P.; RABA, M.; ALBERTY, H.; SANGER, H.L. Nucleotide sequence and secondary structural of potato spindle tuber viroid. **Nature**, London, v.273, p.203-208, 1978.
- HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. 370p.
- HAMMOND, R.W.; SMITH, D.R.; DIENER, T.O. Nucleotide sequence and proposed secondary structure of Columnea latent viroid: a natural mosaic of viroid sequences. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.17, p.10083-10094, 1989.

- HASELOFF, J.; MOHAMED N.A.; SYMONS, R.H. Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. **Nature**, London, v.229, p.316-321, 1982.
- HERNÁNDEZ, C.; ELENA, S.F.; MOYA, A.; FLORES, R. Pear blister canker viroid is a member of the apple scar skin viroid subgroup (apscaviroids) and also has sequence homologies with viroids from other subgroups. **Journal of General Virology**, Reading, v.73, p. 2503-2507, 1992.
- ITO, T.; IEKI, H.; OZAKI, K.; IWANAMI, T.; NAKAHARA, K.; HATAYA, T.; ITO, T., ISAKA, M.; KANO, T. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p.542-547, 2002.
- KEESE, P.; SYMONS, R.H. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.82, p.4582, 1985.
- McINNES, J.L.; SYMONS, R.H. Comparative structure of viroids and their rapid detection using radioactive and nonradioactive nucleic acid probes. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Viroids and satellites: molecular parasites at the frontier of life**. London: CRC Press, 1991. p.21-58.
- NAVARRO, B.; DARÒS, J.A.; FLORES, R. A general strategy for cloning viroids and other small circular RNAs that uses minimal amounts of template and does not require prior knowledge of its sequence. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.56, p.59-66, 1996.
- NAVARRO, B.; DARÒS, J.A.; FLORES, R. Reverse transcription polymerase chain reaction protocols for cloning small circular RNAs. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.73, p.1-9, 1998.
- OWENS, R.A.; DIENER, T.O. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. **Science**, Washington DC, v.213, p.670-672, 1981.
- PALACIO-BIELSA, A.; ROMERO-DURBÁN, J.; DURAN-VILA, N. Characterization of citrus HSVd isolates. **Archives of Virology**, Vienna, v.149, p.537-552, 2004.
- REZAIAN, M.A. Australian grapevine viroid – evidence for extensive recombination between viroids. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.10, p. 5587-5598, 1990.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. Não paginado.
- SEMANCIK, J.S.; SZYCHOWSKI, J.A.; RAKOWSKI, A.G.; SYMONS, R.H. A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. **Journal of General Virology**, Reading, v.75, p.727-732, 1994.
- VISVADER, J.E.; SYMONS, R.H. Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.13, p.2907-2920, 1985.

WASSENEGER, M.; SPIEKER, R.L.; THALMEIR, S.; GAST, F. U.; RIEDEL, L.; SANGER, H.L. A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid from noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. **Virology**, Duluth, v.226, p.191-197, 1996.

**5 *Potato spindle tuber viroid*: EXISTÊNCIA DO LOOP E *IN VIVO* E UNIÃO ESPECÍFICA *IN VITRO* ÀS PROTEÍNAS RIBOSSOMAL L5 E AO FATOR DE TRANSCRIÇÃO IIIA DE *Arabidopsis thaliana***

**Resumo**

Experimentos *in vitro* identificaram no *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), espécie tipo dos viróides nucleares, um elemento de estrutura terciária – loop E – previamente envolvido na transcrição e movimento do rRNA 5S de eucariontes mediado pela proteína ribossomal L5 e pelo fator de transcrição IIIA (TFIIIA). No presente trabalho, foi comprovada a existência do loop E *in vivo* no PSTVd, e também foi demonstrado que as proteínas L5 e TFIIIA de *Arabidopsis thaliana* se unem especificamente a este RNA *in vitro* com a mesma afinidade que as mesmas se unem ao seu substrato natural, o rRNA 5S, enquanto que a afinidade por um viróide cloroplástico (o *Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) foi significativamente menor. Estas duas proteínas devem participar na síntese e movimento intracelular do PSTVd *in vivo*.

**Abstract**

*In vitro* experiments have identified in *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), the type species of nuclear viroids, an element of tertiary structure –loop E– previously involved in transcription and movement of eukaryotic 5S rRNA mediated by ribosomal protein L5 and transcription factor IIIA (TFIIIA). Here we show the existence *in vivo* of loop E in PSTVd, and that *Arabidopsis thaliana* L5 and TFIIIA bind this RNA *in vitro* with the same affinity as they bind 5S rRNA, whereas affinity for a chloroplastic viroid (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) is significantly lower. These two proteins may participate in synthesis and delivery of PSTVd *in vivo*.

**5.1 Introdução**

Os viróides são patógenos subvirais com genoma composto exclusivamente por um pequeno RNA circular que não codifica proteínas (DIENER, 2003; FLORES et al., 2005; TABLER; TSAGRIS, 2004). As quase 30 diferentes espécies de viróides que infectam plantas superiores são atualmente classificadas em duas famílias (FLORES et al., 2005). A maioria dos viróides pertence à família *Pospiviroidae* e como o *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (DIENER, 1972; GROSS et al., 1978), a espécie tipo desta família, contem uma região central conservada (CCR) e replica-se no núcleo das células infectadas, seguindo um mecanismo envolvendo a RNA polimerase II dependente de DNA (FLORES; SEMANCIK, 1982; MÜHLBACH; SÄNGER, 1979; SCHINDLER; MÜHLBACH, 1992). As moléculas de polaridade (+) do PSTVd acumulam-se no nucléolo e no nucleoplasma, enquanto que as de polaridade (-) localizam-se somente no

nucleoplasma, sugerindo que a transcrição das fitas de ambas as polaridades ocorre no nucleoplasma, com as fitas (+) sendo transferidas e processadas no nucléolo (QI; DING, 2003a). À família *Avsunviroidae* pertencem os viróides que não possuem CCR e que se auto-clivam por meio de ribozimas do tipo cabeça-de-martelo durante sua replicação nos cloroplastos (FLORES et al., 2000), sendo a espécie tipo o *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) (SYMONS, 1981). O fato dos viróides não codificarem proteínas próprias indica que estes devam utilizar fatores da célula hospedeira para auxiliar os diferentes passos do seu ciclo infeccioso (FLORES et al., 2005).

O PSTVd é um RNA circular de fita simples com tamanho de 359 nucleotídeos (com pequenas variações de tamanho dependendo do isolado) que adota uma forte estrutura secundária devido aos pareamentos entre as bases complementares (GROSS et al., 1978). Irradiações com raios ultravioleta *in vitro* e de preparações purificadas de moléculas de polaridade (+) do PSTVd revelaram que sua CCR contem um elemento de estrutura terciária com elevada similaridade de seqüência e também estrutural ao loop E do rRNA 5S de eucariontes (BRANCH et al., 1985; GAST et al., 1996). Este elemento está presente em uma região do rRNA 5S protegida por duas proteínas nucleares que se unem a este RNA *in vitro* e *in vivo*: a proteína ribossomal L5 e o fator de transcrição IIIA (TFIIIA) (DINITTO; HUBER, 2003; STEITZ et al., 1988; PELHAM; BROWN, 1980; BOGENHAGEN; SANDS, 1992; THEUNISSEN et al., 1992).

No presente trabalho, demonstrou-se que moléculas de polaridade (+) do PSTVd também formam o loop E *in vivo* e que L5 e TFIIIA clonadas e purificadas de *Arabidopsis thaliana* unem-se *in vitro* a este RNA com a mesma afinidade que se unem ao seu substrato natural, o 5S rRNA. Demonstrou-se também, por meio de ensaios de competição, que a afinidade destas proteínas é significativamente menor pelo ASBVd, um viróide cloroplástico. Baseado nestes resultados, acredita-se que as duas proteínas (L5 e TFIIIA) possam desempenhar um importante papel no ciclo infeccioso do PSTVd.

## 5.2 Material e Métodos

### 5.2.1 Preparação e análises dos RNAs

As preparações de RNAs foram obtidas por meio de maceração de tecido em tampão (0,1 M Tris-HCl, pH 9,0, 5 M uréia, 0,1 M NaCl, 0,1 M 2-mercaptoetanol, 10 mM EDTA) em uma relação de 5 ml/g de peso fresco. O homogeneizado foi clarificado com centrifugação e o



sobrenadante foi extraído com 0,5 volumes de fenol/clorofórmio (1:1). Os RNAs presentes na fase aquosa foram recuperados por meio de uma precipitação em isopropanol ou (quando necessário) por cromatografia em celulose não iônica (CF11, Whatman) (DARÒS; FLORES, 2002, 2004). Para as hibridizações *Northern-blot*, os RNAs foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 5% em condições desnaturantes (contendo 8 M de uréia), transferidos para membrana de náilon, hibridizados com ribosondas marcadas com  $^{32}\text{P}$  a 70 °C na presença de 50% de formamida e autorradiografados (DARÒS; FLORES, 2002, 2004). Os ensaios de *primer extensions* foram realizados com a enzima transcriptase reversa *SuperScript III* (Invitrogen) e com o oligonucleotídeo I (5'-GAAAACCCTGTTTCGGCGGGAATTAC-3') marcado com  $^{32}\text{P}$  no terminal 5'. Uma “escada” de seqüenciamento foi obtida com o mesmo oligonucleotídeo, utilizando-se o plasmídeo pUmPSTVd+ e o kit *Thermo Sequenase cycle sequencing* (USB). As transcrições dos RNAs foram dirigidas pelo promotor T7 presente nos plasmídeos (previamente linearizados com *Xba*I) pU5S e pUmPSTVd+, gerando o 5S rRNA de *Arabidopsis thaliana* (código de acesso M65137, posições 220 a 339) mais duas pequenas “caudas” provenientes do vetor nos terminais 5' (GGGAU) e 3' (AUCU), e um RNA monomérico, linear de polaridade (+) do PSTVd (código de acesso M16826, posições 95 a 94) com as mesmas “caudas” do vetor, respectivamente. O mesmo RNA do PSTVd, porém sem a presença de “cauda” proveniente do vetor e das posições 88 a 87, foi obtido por meio de transcrições, também dirigidas pelo promotor T7, de um plasmídeo (previamente linearizado com *Hind*III) denominado pRPSTVd no qual duas ribozimas flanqueiam a seqüência do viróide. Um RNA monomérico de polaridade (+) do ASBVd (código de acesso X52041) foi obtido pela auto-clivagem (durante a transcrição) do plasmídeo pBdASBVd (linearizado com *Xba*I) contendo um cDNA dimérico sob o controle do promotor T3. Os RNAs (5S e PSTVd) foram marcados com  $^{32}\text{P}$  pela substituição, na transcrição, de UTPs não marcados por 5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  de  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-UTP}$ , 400 Ci/mmol. Os RNAs foram purificados em PAGE 5%, em condições desnaturantes e, após a eluição, foram quantificados por medida de radiação Cerenkov.

### 5.2.2 Expressão e purificação das proteínas L5 e TFIIIA de *Arabidopsis*

A expressão em *Escherichia coli* transformadas com os plasmídeos pEL5 e pETFIIIA resultou nas versões recombinantes das proteínas de *Arabidopsis* L5 (código de acesso AAM10263) e TFIIIA (código de acesso AAO73339), que apresentam inclusão de uma cauda de seis histidinas

na porção carboxi-terminal (LEH<sub>6</sub> tag). As proteínas recombinantes foram purificadas em condições não desnaturizantes utilizando colunas de ácido nitrilotriacético de níquel (Ni-NTA) de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen), e então analisadas por SDS-PAGE 12,5%, corados com *Coomassie brilliant blue* ou por *Western-blot* com um anticorpo monoclonal contra a cauda de histidinas, *anti-His<sub>6</sub>-tag antibody* (Clontech). A concentração das proteínas purificadas (L5 e TFIIIA) nas preparações foi estimada por espectrofotometria e por reagente Bradford, sendo armazenadas a -20 °C em glicerol 50%.

### 5.2.3 Ensaios de retardo em gel (*Electrophoretic mobility shift assays*)

Os RNAs marcados com <sup>32</sup>P foram misturados com cada proteína em diferentes relações (concentrações crescentes de proteínas) em 10 µl de tampão de união (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol), incubados em gelo por 15 min, e separados em PAGE 5% não-desnaturantes com tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM acetato de sódio, 1 mM EDTA, pH 7,2) a 4 °C. Os géis foram fixados em presença de ácido acético 10% e etanol 20%, secos a vácuo, e a seguir expostos a autoradiografia ou análise em *phosphorimage* utilizando o aparato *BAS 1500* (Fuji). Nos experimentos de competição, diferentes quantidades de RNAs transcritos não marcados (concentrações crescentes 5, 50 e 500X) foram misturados com os RNAs transcritos marcados com <sup>32</sup>P (“sonda”), sendo finalmente misturados às proteínas em um volume final de 20 µl.

### 5.2.4 Ensaios de entrecruzamento com luz ultravioleta (*UV cross-linking assays*)

Para os ensaios de entrecruzamento com luz ultravioleta (*UV cross-linking*) *in vivo*, folhas de tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill.) não inoculados e folhas de tomateiros infectados com PSTVd foram irradiadas (10 J/cm<sup>2</sup>) em gelo com o aparato *UV cross-linker* (Hoefler), e seus RNAs extraídos e analisados como descrito previamente (DARÒS; FLORES, 2002). Os RNAs purificados foram irradiados com UV com 0,1 J/cm<sup>2</sup>. Para os ensaios de *UV cross-linking*, RNAs marcados com <sup>32</sup>P (sondas) foram misturadas com proteínas em diferentes concentrações (crescentes) em 10 µl de tampão de união, transferidos cuidadosamente para um pedaço de parafilme sobre gelo, e irradiados com 0,5 J/cm<sup>2</sup>. Após a adição de 1 µg de RNase A e incubação por 30 min a 37 °C, as reações foram paralisadas e analisadas por SDS-PAGE (12,5%) que após

eletroforese a 200 v por 2h, foram fixados, secos, expostos em filmes de raio-X e observados conforme já descrito acima.

### 5.3 Resultados

#### 5.3.1 Entrecruzamento induzido por luz UV revela a existência do loop E no PSTVd (+) *in vivo*

Com o objetivo de investigar se a molécula de polaridade (+) do RNA do PSTVd também contem o loop E *in vivo* (Fig. 1A), folhas de tomateiro infectadas com o PSTVd foram irradiadas com UV e seus RNAs foram subsequentemente extraídos e analisados em PAGE (em condições desnaturantes) e por *Northern-blot* com uma sonda para a detecção de fitas de polaridade (+) do PSTVd. Além das bandas proeminentes correspondentes aos RNAs monoméricos de polaridade (+) do PSTVd circular (mc) e linear (ml), uma banda de menor intensidade e de mobilidade intermediária foi observada (Fig. 1B, comparar linhas 7 e 8). Algumas evidências indicam que esta banda intermediária (cl) foi gerada *in vivo* pela união (intra-molecular) específica via irradiação com UV no loop E das moléculas de polaridade (+) circulares do PSTVd (mc-PSTVd), incluindo que: (i) a banda estava ausente em extratos de RNAs de tecidos saudáveis e de tecidos infectados pelo PSTVd, porém não irradiados (Fig. 1B, linhas 6 e 7), (ii) sua intensidade aumenta com a dose de irradiação UV (dados não apresentados), e (iii) sua posição coincide com aquela observada na união intra-molecular entre os resíduos G98 e U260, componentes do loop E (Fig. 1A) (BRANCH et al., 1985), resultado de irradiação com UV dos extratos de RNA de tecidos infectados pelo PSTVd e de moléculas de RNAs de polaridade (+) circulares (mc-PSTVd) (Fig. 1B, linhas 3 e 5). Para se obter maiores evidências que suportassem esses resultados prévios, os quais indicavam que o entrecruzamento com UV *in vivo* envolvia resíduos (G98 e U260) componentes do loop E, as bandas originadas após irradiação do tecido foliar com luz UV foram eluídas de um gel desnaturante e submetidas a ensaio de *primer extension* com o oligonucleotídeo I. Uma parada proeminente foi observada na posição A99, quando se confrontou com a “escada” de seqüenciamento (Fig. 1C, linha 5), identificando-se o G98 como um dos resíduos que se entrecruzam. Um ensaio paralelo de *primer extension* com um monomero circular de polaridade (+) do PSTVd não apresentou a mesma parada (Fig. 1C, linha 6). Com estes resultados,



### 5.3.2 União *in vitro* do PSTVd (+) com as proteínas recombinantes L5 e TFIIIA

A cromatografia em colunas de níquel (Ni-NTA) resultou em preparações altamente purificadas das proteínas recombinantes L5 e TFIIIA de *Arabidopsis* (Figura 2A), embora as mobilidades tenham sido menores que aquelas esperadas em função das suas massas moleculares (35400 e 47700 Da para as proteínas recombinantes L5 e TFIIIA, respectivamente). Análises de *western-blot* em um gel paralelo confirmaram que as bandas mais intensas das preparações purificadas correspondiam às proteínas recombinantes, em função da especificidade das reações com o anticorpo específico (anti-His<sub>6</sub>), sendo que a banda que apresentou migração mais rápida, no caso da TFIIIA, trata-se provavelmente de processamento parcial desta proteína (Figura 2B).

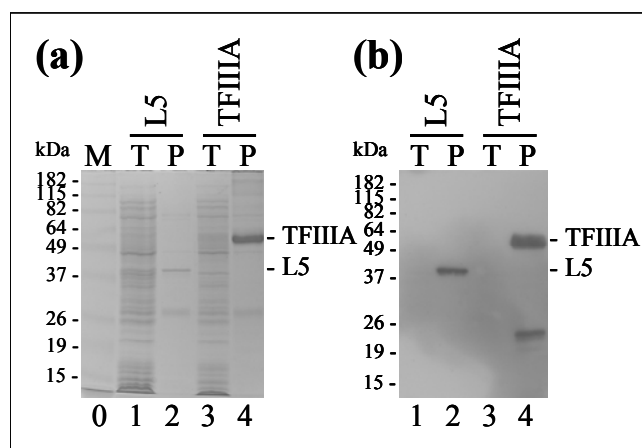


Figura 2 – Purificação das proteínas recombinantes L5 e TFIIIA de *Arabidopsis*. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE (12,5%) e em seguida (A) foram coradas em presença de *coomassie brilliant blue* ou (B) realizou-se *western blot* com um anticorpo anti-His<sub>6</sub>. Linha 0, marcador de proteína com suas massas moleculares indicadas à esquerda. Linhas 1 e 3, proteínas totais (T) de cultura de *E. coli* induzidas a expressar L5 e TFIIIA, respectivamente. Linhas 2 e 4, preparações purificadas (P) de L5 e TFIIIA, respectivamente. As posições das proteínas recombinantes L5 e TFIIIA estão indicadas à direita de ambos os painéis

A união de moléculas de polaridade (+) do PSTVd às duas proteínas recombinantes (L5 e TFIIIA) de *Arabidopsis* foi estudada empregando duas aproximações distintas: análise da mobilidade eletroforética (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) e ensaios de entrecruzamentos com luz UV (*UV-cross-linking label transfer assays*) (LANE et al., 1992; WALKER et al., 1998) utilizando como “sonda” um RNA linear de tamanho completo (359 nucleotídeos) do PSTVd de polaridade (+) marcado com <sup>32</sup>P mais uma pequena “cauda” do vetor.

Com as duas aproximações demonstrou-se que L5 e TFIIIA de *Arabidopsis* unem-se ao RNA de polaridade (+) do PSTVd *in vitro*. Nos ensaios de retardo em gel (EMSA), L5 iniciou o retardo da sonda em uma concentração de proteína de 0,5  $\mu\text{M}$ , sendo que o retardo foi completo a uma concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  (Fig. 3A, linhas 4 e 5), enquanto que TFIIIA retardou a sonda completamente a uma concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  (Fig. 3A, linhas 8 a 10), indicando que deve haver uma maior afinidade do PSTVd (+) a esta segunda proteína. O retardo não foi observado com pequenas concentrações de proteínas nem no controle sem proteínas (Fig. 3A). A presença de bandas correspondendo à sonda livre e o total retardo do complexo (RNA + proteína) sem a presença de retardo parcial sugere uma união do tipo cooperativa, particularmente para a proteína TFIIIA. Os ensaios de união por meio de entrecruzamento com UV confirmaram estes resultados. A união do PSTVd (+) às proteínas foi observada iniciando a uma concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  para L5 (Fig. 3B, linhas 4 e 5) e 0,1  $\mu\text{M}$  para TFIIIA (Fig. 3B, linhas 8 a 10). Marcação a baixas concentrações de proteínas e nos controles sem proteínas não foram observadas (Fig. 3B).

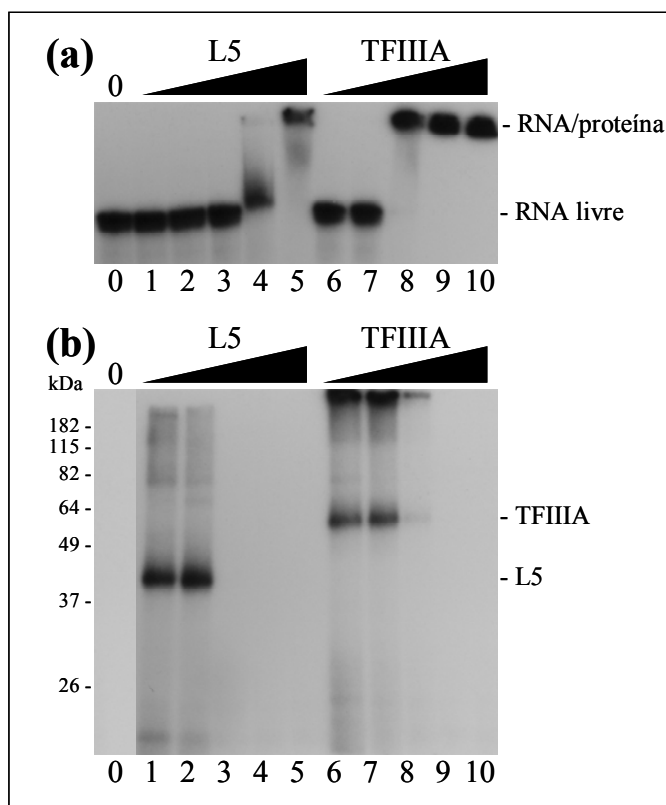


Figura 3 – União *in vitro* do RNA de polaridade (+) do PSTVd às proteínas recombinantes L5 e TFIIIA de *Arabidopsis*. (A) Ensaio de retardo (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA). O RNA marcado do PSTVd, utilizado como sonda (a uma concentração de 0,2 nM), foi misturado com concentrações crescentes das proteínas L5 ou TFIIIA e separados em PAGE (não-desnaturante). (B) Análise de união via entrecruzamento com luz UV (*UV cross-linking label transfer assay*). A mesma sonda marcada (PSTVd+) foi misturada com concentrações crescentes das proteínas L5 e TFIIIA, e então submetidos a radiação com UV, digestão com RNase e SDS-PAGE. Linhas 0, ausência de proteína. Linhas 1 a 5 e 6 a 10, adição de 0,04, 0,02, 0,1, 0,5 e 2,5 μM de L5 e TFIIIA, respectivamente. As posições do complexo RNA/proteína e da sonda livre estão indicados à direita do quadro (A). As posições e as massas moleculares (em kDa) dos marcadores, e das proteínas marcadas L5 e TFIIIA, estão indicadas à esquerda e à direita do quadro (B), respectivamente

### 5.3.3 Análises de competição *in vitro* revelam que as proteínas L5 e TFIIIA de *Arabidopsis* apresentam afinidade similar pelo PSTVd e 5S RNA

Para estudar a afinidade de união das proteínas L5 e TFIIIA de *Arabidopsis* ao PSTVd (+), uma série de experimentos de competição foi realizada com ensaios de retardo em gel (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) utilizando como sonda o rRNA 5S de *Arabidopsis*, uma molécula com a qual L5 e TFIIIA interagem em condições fisiológicas. As misturas incluíram o rRNA 5S de *Arabidopsis* (120 nt) com uma pequena porção do vetor, e as proteínas

L5 e TFIIA, nas concentrações de 1,25  $\mu\text{M}$  e 0,25  $\mu\text{M}$  respectivamente, resultando no completo retardo da sonda na ausência de competidores (Fig. 4A e B, linhas 10). A incorporação dos competidores não marcados, o 5S rRNA (idêntico à sonda), o RNA linear de polaridade (+) do PSTVd (de seqüência exata com 359 nt) e o RNA linear do ASBVd de polaridade (+) (de seqüência exata com 247 nt), mostrou que o PSTVd e o 5S rRNA apresentavam comportamento similar (Fig. 4C e D): ambos RNAs foram bons competidores, com uma menor fração da sonda permanecendo unida à L5 (Fig. 4A, linhas 3 e 6) e TFIIA (Fig. 4B, linhas 3 e 6) a um excesso molar de 500 vezes. Entretanto, o ASBVd (+), que apresenta uma estrutura secundária similar àquela do PSTVd (+), foi um fraco competidor (Fig. 4C e D) pois com os mesmos excessos molares quantidades significativas de sonda ainda permaneciam unidas à L5 (Fig. 4A, linha 9) e, particularmente, à proteína TFIIA (Fig. 4B, linha 9).

#### 5.4 Discussão

Os viróides não codificam proteínas próprias e, portanto, dependem de fatores da célula hospedeira para sua replicação e movimento, porém pouco se conhece dessas interações: (i) Primeiramente, experimentos com inibidores das RNAs polimerases indicaram que a síntese das moléculas de ambas polaridades do PSTVd, e muito provavelmente de outros viróides nucleares (família *Pospiviroidae*), é catalisada por uma RNA polimerase II (nuclear) dependente de DNA (FLORES; SEMANCIK, 1982; MÜHLBACH; SÄNGER, 1979; SCHINDLER; MÜHLBACH, 1992) – resultados com anticorpo monoclonal contra um domínio conservado da subunidade maior da RNA polimerase II também reforçam estes resultados (WARRILOW; SYMONS, 1999) – enquanto que a síntese das fitas do ASBVd é catalisada por uma RNA polimerase cloroplástica codificada no núcleo (NAVARRO et al., 2000). (ii) Uma segunda abordagem envolveu a seleção de candidatos a fatores do hospedeiro que se unem a viróides por meio de seleção via entrecruzamento com luz UV diretamente em folhas de abacateiro (*in vivo*) infectados pelo ASBVd. Com isso, foi possível isolar e caracterizar duas proteínas de cloroplastos (PARBP33 e PARBP35) associadas com o ASBVd, sendo que a primeira delas comporta-se como uma chaperona e facilita a auto-clivagem pelas ribozimas *in vitro* dos RNAs diméricos do ASBVd (DARÒS; FLORES, 2002). (iii) Uma terceira aproximação envolveu uma proteína de floema de pepino (PP2) que interage *in vitro* (GÓMEZ; PALLÁS, 2000; OWENS et al., 2001) e *in vivo*



(GÓMEZ; PALLÁS, 2004) com o *Hop stunt viroid* (família *Pospiviroidae*), possivelmente auxiliando o movimento a longas distâncias deste viróide na planta. (iv) Caracterizou-se também uma proteína de tomateiro que se une ao PSTVd. Esta proteína, que foi denominada *viroid RNA-binding protein* (Virp1), apresenta um sinal de localização nuclear e interage com o PSTVd *in vitro* e *in vivo*, com uma possível implicação no movimento do viróide para o núcleo (MARTÍNEZ DE ALBA et al., 2003). (v) Finalmente, o PSTVd tem sido isolado em complexos com histonas e outras proteínas (WOLFF et al., 1985), e em uma seleção *in vitro* para proteínas que se unem a viróides identificou-se um inibidor de cathepsina D (WERNER et al., 1983). A complexidade do ciclo infeccioso dos viróides indica que muitas outras interações destes patógenos com fatores da célula hospedeira ainda devem ser identificados.

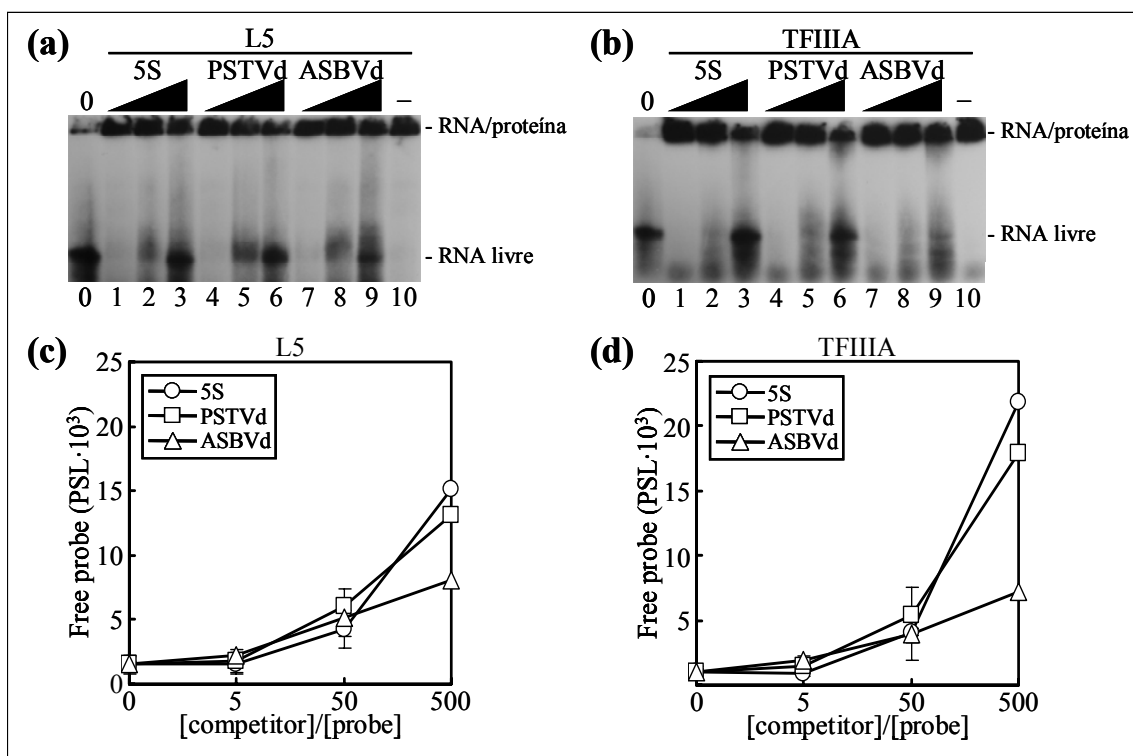


Figura 4 – Efeitos dos três competidores sobre a união *in vitro* do rRNA 5S às proteínas recombinantes L5 e TFIIIA de *Arabidopsis* determinados por ensaios de retardo em gel (*electrophoretic mobility shift assays*, EMSA). (A e B) Autoradiogramas representativos das uniões de L5 (1,25  $\mu$ M) e TFIIIA (0,25  $\mu$ M) ao rRNA 5S marcado com  $^{32}$ P e utilizado como sonda (0,1 nM), respectivamente. Linhas 0, ausência de proteína. Linhas 1 a 9, ensaios na presença de 5, 50 e 500 de excesso molar dos competidores não marcados rRNA 5S de *Arabidopsis* (1 a 3), PSTVd (+) (4 a 6) e ASBVd (+) (7 a 9). Linhas 10, ausência de competidores. (C e D) Representação gráfica da sonda livre (valores em unidades de fotoestímulo luminescente – PSL) *versus* a relação molar do competidor/sonda para L5 e TFIIIA, respectivamente. Os valores apresentados nos gráficos representam a média de três experimentos independentes com o desvio padrão apresentado em barras

Portanto, em vista dos poucos trabalhos que abordam a interação de viróides com fatores do hospedeiro e visando à busca por proteínas do hospedeiro que possam interagir com o PSTVd, procurou-se estudar o motivo de estrutura terciária loop E em função deste motivo: (i) ser conservado no PSTVd e em outros membros do gênero *Pospiviroid* (FLORES et al., 2005), e (ii) estar envolvido em replicação (BAUMSTARK et al., 1997), especificidade do hospedeiro (WASSENEGGER et al., 1996) e patogênese (QI; DING, 2003b). Por meio de irradiação com UV de folhas de tomateiro infectado pelo PSTVd, confirmou-se que o loop E não só existe *in vitro* (BRANCH et al., 1985; GAST et al., 1996) mas também *in vivo*, demonstrando que este motivo deve apresentar importante relevância fisiológica. Assim, foram utilizadas duas proteínas, ribossomal L5 e TFIIA, as quais apresentam sítios de união ao rRNA 5S de eucariontes, incluindo o motivo loop E e outras regiões da molécula (DINITTO; HUBER, 2003; BOGENHAGEN; SANDS, 1992) que também apresentaram afinidade específica pelo PSTVd (+). Resultados com dois ensaios de união *in vitro* distintos demonstraram que estas duas proteínas de *Arabidopsis* unem-se ao PSTVd (+) com a mesma afinidade que se unem *in vivo* ao seu bem conhecido e caracterizado substrato natural, o rRNA 5S (MATHIEU et al., 2003), enquanto que a afinidade pelo ASBVd (+), um viróide cloroplástico que não apresenta o loop E, foi significativamente menor. Apesar de *Arabidopsis* não ser hospedeira do PSTVd, um estudo recente mostrou que esta planta-modelo apresenta a maquinaria necessária para a replicação de algumas espécies representativas da família *Pospiviroidae*, sendo, portanto, um valioso sistema experimental para o estudo das interações viróide-hospedeiro (DARÒS; FLORES, 2004).

As proteínas L5 e TFIIA devem atuar em diferentes etapas do ciclo infeccioso do PSTVd. L5 está envolvida no transporte núcleo-citoplasmático do rRNA 5S (GUDDAT et al., 1990), e poderia da mesma forma facilitar a exportação de novas moléculas de polaridade (+) do PSTVd sintetizadas para células vizinhas. Além disso, como a proteína L5 de *Arabidopsis* se une ao rRNA 5S e se acumula no nucléolo, embora também esteja presente no citoplasma (MATHIEU et al., 2003), a união de L5 às moléculas de polaridade (+) do PSTVd poderia mediar a passagem seletiva para o nucléolo (QI; DING, 2003a). Por outro lado, TFIIA é um fator de transcrição da RNA polimerase III que é requerido especificamente para a transcrição de genes do rDNA 5S, e está envolvido em uma rede de interações envolvendo a síntese e o acúmulo de rRNA 5S e síntese e acúmulo de proteínas ribossomais (PITTMAN et al., 1999). O TFIIA de *Arabidopsis* pode se unir ao rRNA 5S de *Arabidopsis*, e também ao seu gene (DNA) podendo se concentrar em vários

pontos do núcleo incluindo o nucléolo (MATHIEU et al., 2003). A capacidade desta proteína se unir tanto a DNA como a RNA, faz o TFIIIA um importante candidato ao envolvimento com aspectos da replicação dos viróides nucleares, pelo fato destes viróides necessitarem, muito provavelmente, de proteínas com essas propriedades para serem aceitos como moldes pelas RNAs polimerases, que em condições normais, transcrevem RNAs a partir de moldes de DNA. O TFIIIA poderia atuar como uma ponte entre o RNA do viróide (molde) e a RNA polimerase, isso até mesmo com as evidências disponíveis que indicam que esta enzima seja a RNA polimerase II. Estudos complementares são necessários para confirmar que as interações entre as proteínas L5 e TFIIIA com o PSTVd (+), demonstradas aqui *in vitro* também existem *in vivo*.

## Referências

- BAUMSTARK, T.; SCHRÖDER, A.R.W.; RIESNER, D. Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. **EMBO Journal**, Oxford, v.16, p.599-610, 1997.
- BOGENHAGEN, D.F.; SANDS, M.S. Binding of TFIIIA to derivatives of 5S RNA containing sequence substitutions or deletions defines a minimal TFIIIA binding site. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, p.2639-2645, 1992.
- BRANCH, A.D.; BENENFELD, B.J.; ROBERTSON, H.D. Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of local tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5S RNA. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington DC, v.82, p.6590-6594, 1985.
- DARÒS, J.A.; FLORES, R. A chloroplast protein binds a viroid RNA *in vivo* and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. **EMBO Journal**, Oxford, v.21, p.749-759, 2002.
- DARÒS, J.A.; FLORES, R. Arabidopsis thaliana has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington DC, v.101, p.6792-6797, 2004.
- DIENER, T.O. Potato spindle tuber viroid VIII. Correlation of infectivity with a UV-absorbing component and thermal denaturation properties of the RNA. **Virology**, Duluth, v.50, p.606-609, 1972.
- DIENER, T.O. Discovering viroids - a personal perspective. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.1, p. 75-80, 2003.
- DINITTO, J.P.; HUBER, P.W. Mutual induced fit binding of Xenopus ribosomal protein L5 to 5S rRNA. **Journal of Molecular Biology**, New York, v.330, p.979-992, 2003.

- FLORES, R.; SEMANCIK, J.S. Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington DC, v.79, p.6285-6288, 1982.
- FLORES, R.; DARÒS, J.A.; HERNÁNDEZ, C. The Avsunviroidae family: viroids containing hammerhead ribozymes. **Advances in Virus Research**, Orlando, v.55, p.271-323, 2000.
- FLORES, R.; HERNÁNDEZ, C.; MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; DARÒS, J.A.; DI SERIO F. Viroids and viroid-host interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p. 117-139, 2005.
- GAST, F.U.; KEMPE, D.; SPIEKER, R.L.; SÄNGER, H.L. Secondary structure probing of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and sequence comparison with other small pathogenic RNA replicons provides evidence for central non-canonical base-pairs, large A-rich loops, and a terminal branch. **Journal of Molecular Biology**, New York, v.262, p.652-670, 1996.
- GÓMEZ, G.; PALLÁS, V. Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.14, p.910-913, 2001.
- GÓMEZ, G.; PALLÁS, V. A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with hop stunt viroid RNA. **Journal of Virology**, Washington DC, v.78, p.10104-10110, 2004.
- GROSS H.J.; DOMDEY, H.; LOSSOW, C.; JANK, P.; RABA, M.; ALBERTY, H.; SÄNGER, H.L. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. **Nature**, London, v.273, p.203-208, 1978.
- GUDDAT, U.; BAKKEN, A.H.; PIELER, T. Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in *Xenopus* oocytes. **Cell**, Cambridge, v.60, p.619-628, 1990.
- LANE, D.; PRENTKI, P.; CHANDLER, M. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. **Microbiology Reviews**, Washington DC, v.56, p.509-528, 1992.
- MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; SAGESSER, R.; TABLER, M.; TSAGRIS, M. A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA in vitro and in vivo. **Journal of Virology**, Washington DC, v.77, p.9685-9694, 2003.
- MATHIEU, O.; YUKAWA, Y.; PRIETO, J.L.; VAILLANT, I.; SUGIURA, M.; TOURMENTE, S. Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from *Arabidopsis thaliana*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.31, p.2424-2433, 2003.
- MÜHLBACH, H.P.; SÄNGER, H.L. Viroid replication is inhibited by  $\alpha$ -amanitin. **Nature**, London, v.278, p.185-188, 1979.

- NAVARRO, J.A.; VERA, A.; FLORES, R. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. **Virology**, Duluth, v.268, p.218-225, 2000.
- OWENS, R.A.; BLACKBURN, M.; DING, B. Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.14, p.905-909, 2001.
- PELHAM, H.; BROWN, D. A specific transcription factor that can bind to either the 5S RNA gene or 5S RNA. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington DC, v.77, p.4170-4174, 1980.
- PITTMAN, R.H.; ANDREWS, M.T.; SETZER, D.R. A feedback loop coupling 5S rRNA synthesis to accumulation of a ribosomal protein. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.274, p.33198-33201, 1999.
- QI, Y.; DING, B. Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. **Plant Cell**, Rockville, v.15, p.2566-2577, 2003a.
- QI, Y.; DING, B. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. **Plant Cell**, Rockville, v.15, p.1360-1374, 2003b.
- SCHINDLER, I.M.; MÜHLBACH, H.P. Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: A reevaluation. **Plant Science**, Limerick, v.84, p.221-229, 1992.
- STEITZ, J.A.; BERG, C.; HENDRICK, J.P.; LA BRANCHE-CHABOT, H.; METSPALU, A.; RINKE, J.; YARIO, T. A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. **Journal of Cell Biology**, New York, v.106, p.545-556, 1988.
- SYMONS, R.H. Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.9, p.6527-6537, 1981.
- TABLER, M.; TSAGRIS, M. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.9, p.339-348, 2004.
- THEUNISSEN, O.; RUDT, F.; GUDDAT, U.; MENTZEL, H.; PIELER, T. RNA and DNA binding zinc fingers in *Xenopus* TFIIIA. **Cell**, Cambridge, v.71, p.679-690, 1992.
- WALKER, J.; DE MELO NETO, O.; STANDART, N. Gel retardation and UV-crosslinking assays to detect specific RNA-protein interactions in the 5' or 3' UTRs of translationally regulated mRNAs. **Methods in Molecular Biology**, New York, v.77, p.365-378, 1998.
- WARRILOW, D.; SYMONS, R.H. Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato in vivo. **Archives of Virology**, Vienna, v.144, p.2367-2375, 1999.

WASSENEGGER, M.; SPIEKER, R.L.; THALMEIR, S.; GAST, F.U.; RIEDEL, L.; SÄNGER H.L. A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. **Virology**, Duluth, v.226, p.191-197, 1996.

WERNER, R.; GUITTON, M.C.; MÜHLBACH, H.P. Nucleotide sequence of a cathepsin D inhibitor protein from tomato. **Plant Physiology**, Bethesda, v.103, p.1473, 1993.

WOLFF, P.; GILZ, R.; SCHUMACHER, J.; RIESNER, D. Complexes of viroids with histones and other proteins. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.13, p.355-367, 1985.