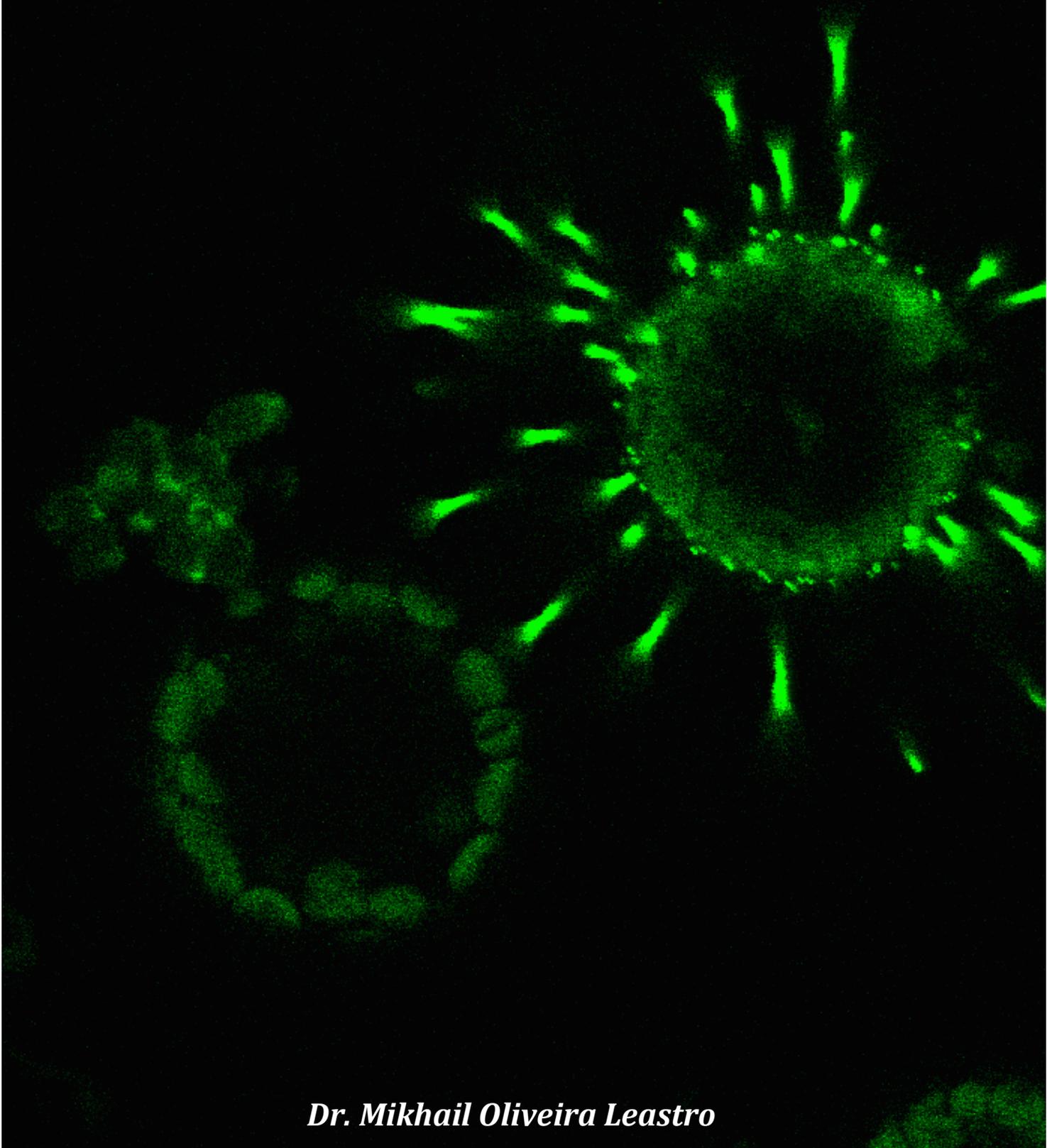
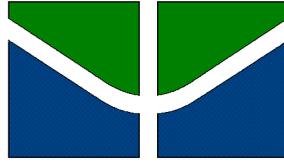


*Estudo Funcional da Proteína de
Movimento (NSm) de Distintos
Tospovirus.*



Dr. Mikhail Oliveira Leastro



Estudo Funcional da Proteína de Movimento (*NSm*) de
distintos *Tospovirus*.

Mikhail Oliveira Leastro

Brasília, 2015.

Tese de Doutorado realizada em conjunto com o Departamento de Biologia Celular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB), sob orientação do Dr. Renato de Oliveira Resende (UnB) e Co-Orientação do Dr. Jesús Angel Sánchez-Navarro (IBMCP). Tendo apoio Institucional do Governo Federal, Brasil e da União Européia, Espanha.

Dr. Renato de Oliveira Resende
Universidade de Brasília (UnB)

Dr. Enrique Moriones Alonso
La Mayora (ES)

Dr. Tatsuya Nagata
Universidade de Brasília (UnB)

Dr. Elliot Watanabe Kitajima
Professor emérito (UnB) e “Servidor Voluntário” (ESALQ)

Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Universidade de Brasília (UnB)

Orientação:

**Dr. Renato de Oliveira Resende.
Departamento de Biologia Celular,
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Molecular, Universidade de Brasília (UnB)**

Co-Orientação:

**Dr. Jesús Angel Sánchez-Navarro.
Instituto Biología Molecular y Celular de
Plantas “Primo Yúfera, Valencia, España
(IBMCP-CISC)**

“Dedico esta tese com grande modéstia ao meu esforço, perspicácia e dedicação”.

Leastro, M.O. “Estudo Funcional da Proteína de Movimento (NSm) de Distintos *Tospovirus*”.

Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília (UnB).

Palavras chave: Movimento viral célula a célula, Movimento viral Sistêmico, Proteína NSm, Gênero *Tospovirus*, Espectro de Hospedeiro, Associação dímica, heterodímica, Infecção mista.

CONTEÚDO

	Páginas:
Sumário	viii
Capítulo I	1
Introdução Geral.	
Capítulo II	29
Análise funcional de distintas proteínas de movimento (NSm) de tospovírus revelam comportamentos diferenciais em relação ao movimento viral.	
Capítulo III	58
A proteína de movimento (NSm) associa-se periféricamente à membrana celular e interage com as proteínas do nucleocapsídeo (N) e outras proteínas NSm de distintos tospovírus.	
Capítulo IV	85
Possível associação da proteína de movimento (NSm) dos tospovírus com cloroplasto.	
Capítulo V	99
Estudo dos determinantes de avirulência (<i>avr</i>) da proteína de movimento NSm de distintas espécies de tospovírus.	
Conclusão Geral	117
Agradecimentos	122

SUMÁRIO

Vírus de planta desenvolveram uma classe de proteínas responsáveis por garantir a infecção e disseminação viral. Estudos vêm demonstrando que essa classe de proteínas de movimento (MPs), interage com o plasmodesma (PD), aumentando o seu limite de exclusão (LEP), possibilitando a passagem dos vírus. Várias estratégias são utilizadas para o estudo de movimento viral. Alguns sistemas baseiam-se na utilização de clones infecciosos que possibilitam a inserção de genes heterólogos de MPs. Para o estudo do movimento célula à célula e sistêmico utilizamos o vetor viral *Alfalfa mosaic virus* (AMV). O sistema consiste na utilização de transgênicos P12 em combinação com transcritos do RNA 3 adaptados para a inserção de genes heterólogos. Com base neste sistema, demonstramos que a proteína de movimento NSm, pode ter relação com a limitação ou amplitude no espectro de infecção viral devido às diferenças significativas observadas no movimento célula à célula e sistêmico de tospovírus que apresentam características moleculares e biológicas distintas (Capítulo II). Concluímos que a movimentação das espécies do gênero tospovírus é dependente da formação de vírions baseado no contexto AMV de infecção e movimentação (Capítulo II). Também concluímos que as MPs de 4 espécies de tospovírus estudadas, são eficientes na formação de túbulos. Em ensaios de truncamento das MPs observamos que para o BeNMV, o extremo C-terminal não é essencial para o movimento, a partir da identificação do limite de aminoácidos que poderiam ser deletados da MP sem inibição do movimento célula à célula. Contrastantemente, as MPs dos vírus CSNV, TCSV e TSWV demonstraram a necessidade da integridade da proteína para garantia do movimento (Capítulo II).

Com a utilização das metodologias de “biomolecular fluorescence complementation” (BiFC) e tratamentos químicos com Na₂CO₃ e Ureia, a partir das MPs, sugerimos que as NSm se associam a membrana de forma periférica. baseado em predições de hidrofobicidade e orientação topológicas (BiFC topology) sugerimos o modelo de interação da NSm com membrana celular, onde a região central hidrofóbica está mergulhada na periferia das membranas lipídicas e os extremos C e N-terminal livres apontados ao citoplasma (Capítulo III). Finalmente, com a metodologia de BiFC de interação, a partir de ensaios de dímeros, heterodímeros, intra-associação e inter-associação de homólogos e heterólogos de MP e NP (nucleoproteína) observamos que: i) todas NSm e N são eficientes na formação de

dímeros ii) as NSm interagem com a sua N cognata e iii) nós observamos interação entre NSm, N e NSm-N entre espécies distintas de tospovírus. Estes resultados podem facilitar uma melhor interpretação das interações de proteína viral com especial ênfase na compreensão das questões de infecção mista.

Além do uso de transgênicos na expressão de proteínas heterólogas para geração de resistência, abordagens através do uso de resistência natural também vem sendo exploradas contra espécies do gênero *Tospovirus*. O presente estudo avaliou o envolvimento de 4 NSm de distintos tospovírus com a resposta de resistência (reação de hipersensibilidade e necrose) mediada pelo gene Sw5-b inserido em plantas de *Nicotiana benthamiana*. Substituições dos aminoácidos de posição C118Y e T120N da proteína NSm, caracterizados como cruciais para resistência foram realizados. BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV NSm wt fusionadas a HA (Hemagglutinin), em processo de agroinfiltração, foram desafiadas contra plantas de *N. benthamiana* transformadas com gene Sw5-b. Observamos a possível quebra de resistência a partir da NSm do BeNMV, onde não observou-se reação necrótica. Plantas infiltradas com as demais NSm reagiram com resposta necrótica (Capítulo IV). Novo ensaio com vetores contendo as NSm com modificação dos aminoácidos C118 por Y e T120 por N foi desenvolvido. Baseado no resultado do ensaio anterior, as MPs que continham os aminoácidos essenciais para ruptura da resistência, foram modificadas por aminoácidos que não garantem a ruptura e o contrário foi feito para aquelas MPs que não ultrapassaram a resistência. Com base nessa abordagem observamos que CSNV, TCSV e TSWV NSm superaram a resistência sem a formação de necrose foliar, resultado que difere do observado com as mesmas MPs sem mutação, e intrigantemente, a BeNMV NSm aparentemente também superou a resistência sem a formação de lesões locais e necrose foliar após a modificação dos aminoácidos, dado contrastante. No contexto de infecção viral utilizando o sistema AMV, não obtivemos resultados satisfatórios de manutenção ou ruptura da resistência. (Capítulo V).

No gênero *Tospovirus*, pouco se sabe sobre o sítio de replicação ou sobre envolvimento de organelas celulares com o processo de infecção. Existem apenas evidências de expressão isolada das proteínas virais co-localizando com filamentos de Actina e miosina, Membrana, ER e Complexo de Golgi. No presente estudo, com auxílio de metodologia de BiFC, além de ensaio com expressão heteróloga da NSm no contexto de infecção do vírus *Potato virus X* (PVX), visualizamos a associação da

Sumário

NSm de tospovírus com cloroplastos. Hipotetizamos o possível envolvimento dessa organela com processo de infecção dos tospovírus (Capítulo IV).

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Gênero *Tospovirus*, aspectos gerais.

O gênero *Tospovirus* pertence à família *Bunyaviridae*. Seu nome tem derivação baseado na primeira espécie caracterizada do gênero, o vírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Levando em consideração a estrutura e organização genômica, o gênero foi incorporado à família *Bunyaviridae* ([Fauquet and Fargette, 2005](#)). Por um período longo, o gênero foi classificado como monotípico, por não haver a caracterização de outra espécie viral, somente em 1991 foi identificado o vírus *Impatiens necrosis spot virus* (INSV), ([Law et al., 1991](#)) proposto como uma segunda espécie do gênero. Na última revisão publicada ([Pappu et al., 2009](#)), observa-se um número crescente de tospovírus caracterizados, totalizando dezenove espécies, oito das quais são aceitas como espécies confirmadas pelo “International Committee on Taxonomy of Virus” (ICTV), enquanto, as demais são consideradas espécies tentativas (Tabela 1, [Fauquet and Fargette, 2005](#)). Esses números devem ser atualizados em um período curto pelo ICTV aumentando o número de espécies oficialmente aceitas pelo Comitê (Richard Kormelink, comunicação pessoal).

Tabela 1: Espécies de tospovírus caracterizadas e sua incidência no globo ([Pappu et al., 2009](#)).

Africa	Asia	Australasia	Europe	North America	South America ^a
GRSV	CaCV	CaCV	CSNV	INSV	CSNV
INSV	CSNV	INSV	INSV	IYSV	GRSV
IYSV	CCSV	IYSV	IYSV	MSMV	INSV
TSWV	GBNV ^b	TSWV	PoRSV	TSWV	IYSV
	INSV		TSWV		PCFV
	IYSV				TCSV
	MYSV				TSWV
	PBNV ^b				ZLCV
	PSMV				
	PYSV				
	TSWV				
	TYRV ^b				
	TZSV				
	WBNV				
	WSMoV				

Acrônimo viral: CaCV, Capsicum chlorosis virus; CCSV, Calla lily chlorotic spot virus; CSNV, Chrysanthemum stem necrosis virus; GRSV, *Groundnut ringspot virus*; GBNV, *Groundnut bud necrosis virus*; INSV, *Impatiens necrotic spot virus*; IYSV, *Iris yellow spot virus*; MSMV, Melon severe mosaic virus; MYSV, Melon yellowspot virus; PCFV, Peanut chlorotic fanspot virus; PoRSV, Polygonum ringspot virus; PSMV, Physalis silver mottle virus; PYSV, *Peanut yellow spot virus*; TCSV, *Tomato chlorotic spot virus*; TSWV, *Tomato spotted wilt virus*; TYFRV, Tomato yellowfruit ring virus; TZSV, Tomato zonate spot virus;

WBNV, *Watermelon bud necrosis virus*; WSMV, *Watermelon silver mottle virus*; ZLCV, *Zucchini lethal chlorosis virus*. “a” Incluído América Central e Caribe. “b” TFYRV, *Tomato fruit yellow ring virus*, é considerado como sendo um isolado de *Tomato yellow ring virus* (TYRV). GBNV é também referido como PBNV, *Peanut bud necrosis virus*.

Novos tospovírus vem sendo descobertos através de estudos de caracterização biológica e molecular. Recentemente, ocorreu o relato de algumas novas espécies. Duas em destaque, o *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV) e o *Soybean vein necrosis associated virus* (SVNaV). São espécies com características bastante peculiares, apresentando uma identidade genômica significativamente distinta dos demais vírus do gênero, característica essa que permitiu o agrupamento desses dois vírus em um novo clado na filogenia dos tospovírus ([de Oliveira et al., 2012](#)).

Para a classificação de novas espécies, alguns critérios são levados em consideração: estrutura e organização genômica, eficiência de transmissão por espécie de tripes vetor, espectro de plantas hospedeiras, delimitação geográfica. No entanto, o principal critério utilizado é a identidade da sequência de aminoácidos da proteína do nucleocapsídeo (N) ([de Avila et al., 1993](#); [German et al., 1992](#); [Mumford et al., 1996](#); [Pappu et al., 2009](#); [Qiu and Moyer, 1999](#); [Tsompana M 2008](#)). Recentemente, foi proposta a utilização da proteína L, devido a sua alta conservação, como fator adicional aos critérios de classificação das espécies do gênero ([Bertran et al., 2011](#)). As glicoproteínas Gc e Gn, a proteína supressora (NSs) e a proteína de movimento (NSm), também foram cogitadas como fator adicional do critério de classificação, pois todas refletem de forma similar e consistente a organização evolutiva dos tospovírus ([Hallwass et al., 2012](#); [Nagata et al., 2007](#); [Silva et al., 2001](#)).

O gênero *Tospovirus* é o único da família *Bunyaviridae* que inclui espécies de vírus capazes de infectar plantas. Seu genoma consiste de três segmentos de RNA de fita simples denominados de S RNA (small), M RNA (medium) e L RNA (large) que contêm cinco “open reading frames” (ORFs) que codificam cinco proteínas estruturais e não-estruturais (Figura 1). Tanto o M RNA quanto o S RNA possuem duas ORFs em orientação ambisenso, separados por uma região intergênica (IRG). A ORF da fita viral no sentido senso do M RNA codifica uma proteína não-estrutural (NSm) envolvida no movimento celular viral à curta distância (célula à célula) e sistêmico ([Pappu et al., 2009](#)). Recentemente essa proteína foi identificada como sendo o determinante de avirulência do gene de resistência a tospovírus Sw-5 em tomate ([Hallwass et al., 2014a](#); [Peiro et al., 2014](#)). Já a ORF da fita viral

complementar codifica o precursor das glicoproteínas Gn e Gc, que estão localizadas na membrana da partícula viral e que são importantes para a transmissão por tripes de modo circulativo e propagativo. A ORF da fita viral senso do S RNA codifica a proteína não-estrutural NSs identificada como supressor de silenciamento gênico (Takeda et al., 2002) e a ORF da fita complementar codifica a proteína N que forma o nucleocapsídeo viral. O segmento L tem a polaridade completamente negativa e contém uma ORF na fita viral complementar que codifica para uma RNA polimerase RNA-dependente (de Haan et al., 1991). Esta proteína está envolvida em várias atividades enzimáticas como a de transcriptase, nuclease e replicase (Chapman et al., 2003; van Knippenberg et al., 2002).

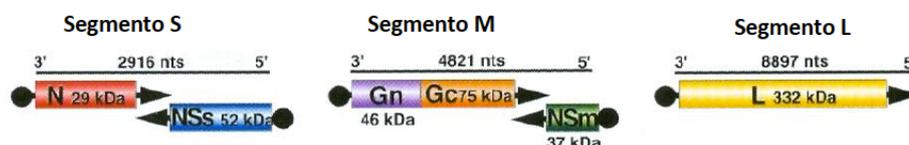


Figura 1: Organização dos segmentos genômicos de tospovírus. Linhas escuras acompanhadas 3' e 5' representam as sequências genômicas do vírus. Os mRNAs são demonstrados abaixo, • representa o início 5' de cada ORF. O produto gênico com seu tamanho (kDa) é representado pelos retângulos sólido (modificado de Elliott, 1997).

Os tospovírus foram tentativamente divididos em dois grandes grupos: o Grupo Americano e o Grupo Euroasiático (Silva et al., 2001), com base no alinhamento múltiplo dos aminoácidos da proteína N e NSm, observando a homologia presente nas sequências. Recentemente, a análise de filogenia baseada na identidade de aminoácidos de todas as ORFs das espécies do gênero (Figura 2), demonstrou a existência de três grupos distintos: Grupo Americano, Grupo Euroasiático e o clado composto pelo BeNMV e SVMaV, denominado de Segundo Grupo Americano (de Oliveira et al., 2012). Uma distribuição homogênea em uma análise evolutiva de todas as proteínas isoladamente (Figura 3), demonstrou que todas as proteínas refletem a evolução do gênero, por apresentarem uma organização filogenética similar.

Um dos principais fatores envolvidos na ampla disseminação dos tospovírus no mundo é o seu vetor os tripes. Até o presente, 10 espécies diferentes de tripes são conhecidas como transmissoras de tospovírus (Tabela 2, (Pappu et al., 2009). Cinco destas espécies também são encontradas no Brasil, entre elas: *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella schultzei*, *Frankliniella zucchini*, *Thrips tabaci* e *Thrips palmi* (Nagata et al., 1999).

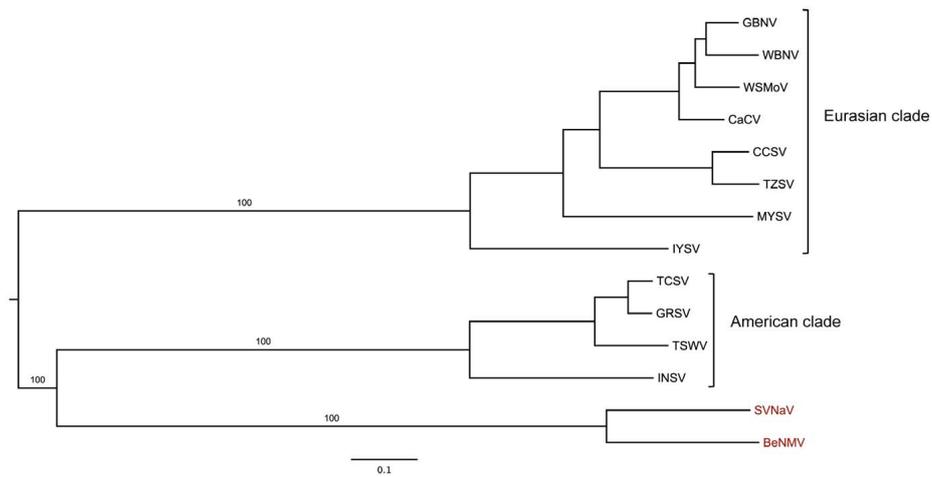


Figura 2: Relação filogenética de espécies de tospovírus inferida usando um concatenado dataset (N, NSs, NSm, glicoproteína e RdRp). (Fonte: [de Oliveira et al., 2012](#)).

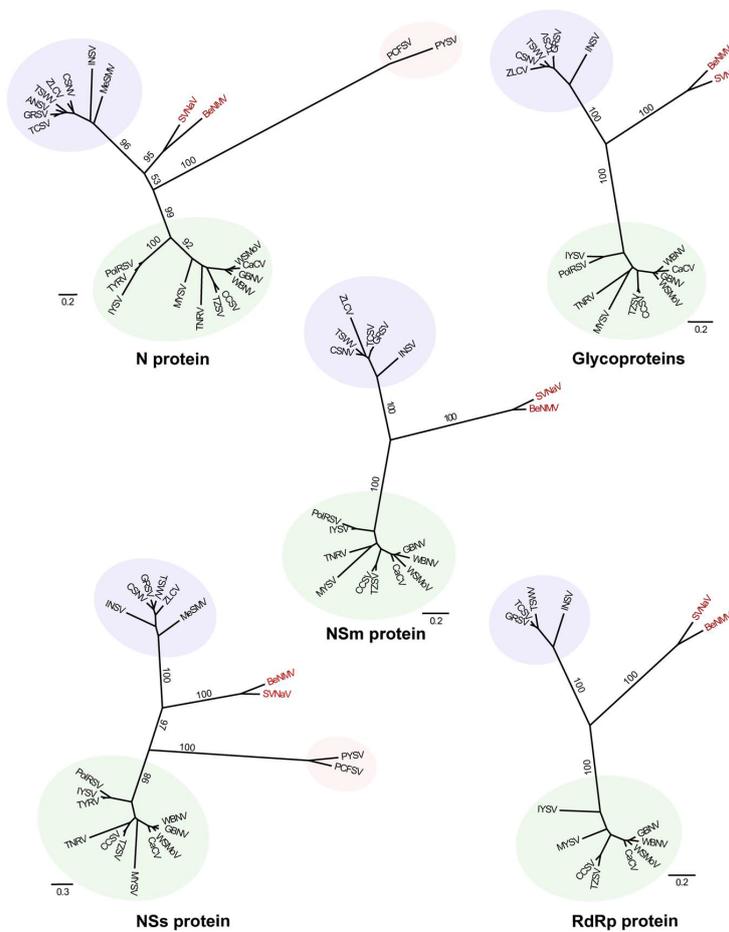


Figura 3: Relação filogenética de espécies de tospovírus inferida usando (N, NSs, NSm, glicoproteína e RdRp). (Fonte: [de Oliveira et al., 2012](#)).

A relação vírus-vetor é de modo persistente, circulativo-propagativo (LA, 2001; Ullman DE, 2002; Whitfield et al., 2005). Para ser transmissível, o vírus deve ser adquirido no primeiro e no segundo estágios larvais, nessas etapas, os vírus se multiplicam e sobrevivem até a fase adulta do vetor, possibilitando com que a transmissão seja concluída (Ullman DE, 2002; Whitfield et al., 2005). Os tripses adultos que adquirem o vírus, são considerados epidemiologicamente inativos, uma vez que não são capazes de transmitir o vírus.

Tabela 2: Espécies de *Tospovirus* e seus respectivos tripses vetores (Fonte: Pappu et al., 2009).

Virus	Thrips vector(s) ^a
Capsicum chlorosis virus	<i>Ceratothripoides claratris</i> , <i>Thrips palmi</i>
Calla lily chlorotic spot virus	<i>T. palmi</i>
Chrysanthemum stem necrosis virus	<i>Frankliniella occidentalis</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>F. gemina</i>
Groundnut ringspot virus	<i>F. occidentalis</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>F. intonosa</i>
<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	<i>F. occidentalis</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>F. intonosa</i>
<i>Iris yellow spot virus</i>	<i>T. tabaci</i>
Melon yellow spot virus	<i>T. palmi</i>
Groundnut bud necrosis virus	<i>T. palmi</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>Scirtothrips dorsalis</i>
Peanut chlorotic fanspot virus	<i>S. dorsalis</i>
Peanut yellow spot virus	<i>S. dorsalis</i>
Tomato chlorotic spot virus	<i>F. occidentalis</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>F. intonosa</i>
Tomato spotted wilt virus	<i>F. cephalica</i> , <i>F. occidentalis</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>F. intonosa</i> , <i>F. bispinosa</i> , <i>F. fusca</i> , <i>T. setosus</i> , <i>T. tabaci</i>
Tomato yellow fruit ring virus	<i>T. tabaci</i>
Watermelon bud necrosis virus	<i>T. palmi</i>
Watermelon silver mottle virus	<i>T. palmi</i>
Zucchini lethal chlorosis virus	<i>F. zucchini</i>

***Tospovirus*: Espectro de Infecção.**

As espécies virais do gênero *Tospovirus* estão entre os vírus que causam maiores perdas econômicas em importantes culturas comercializadas mundialmente. O grupo tem uma ampla gama de espécies de plantas hospedeiras economicamente importantes, além, de infectarem também espécies vegetais de menor relevância econômica. O TSWV é conhecido por infectar mais de 900 espécies agrupadas em 90 famílias de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (Pappu et al., 2009). O INSV infecta cerca de 300 espécies em 85 famílias diferentes de monocotiledôneas e dicotiledôneas. Outros como o CaCV tem um limitado espectro de plantas hospedeiras (Persley, 2006b) e alguns, como o ZLCV, demonstram ter um tipo de adaptação à infecção de cucurbitáceas (Bezerra et al., 1999; Resende, 1996). O BeNMV infecta basicamente *Phaseolus vulgaris* cv. Santana (a sua hospedeira natural) e outras poucas espécies de solanáceas, demonstrando ter uma limitação significativa no espectro de plantas hospedeiras. (de Oliveira et al., 2012).

Incidência de tospovírus no mundo.

África

No âmbito mundial, há relatos de tospovírus em todos continentes, na África, TSWV foi primeiramente relatado infectando tabaco em 1905, porém, as características da infecção, somente foram descritas por ([Moore, 1933.](#)). Com o decorrer dos anos, houve relatos em muitas plantas de valor agrícola como tomate, pimenta e batata ([Rybicki and Pietersen, 1999;](#) [Sivprasad, 2008;](#) [Thompson, 1996;](#) [Uys, 1996](#)). No continente africano, a diversidade de espécie de tospovírus é aparentemente baixa, com a identificação de apenas quatro espécies: TSWV, GRSV, IYSV e INSV (Tabela 1), no entanto, o baixo número de espécies caracterizadas nessa área parece ser reflexo de um pequeno número de virologistas atuando no âmbito da virologia vegetal ([Pappu et al., 2009](#)).

Ásia

Na Ásia estão identificadas 15 espécies de tospovírus infectando diferentes variedades de plantas (Tabela 1, [Pappu et al., 2009](#)). O TSWV foi identificado causando perdas consideráveis em tomate, pimentão, alface, repolho, cucurbitáceas e soja ([Anfoka, 2006;](#) [Gera, 2000;](#) [Golnaraghi, 2001;](#) [Massumi, 2007;](#) [Massumi, 2009](#)). No ano 2000, foi observado um surto do IYSV em Israel infectando cebola ([Kritzman and B., 2000;](#) [Kritzman, 2001](#)) e o TYRV foi identificado infectando tomate, batata, soja e plantas ornamentais, demonstrando ser um vírus em potencial para a infecção de muitas hospedeiras, se destacando na infecção de plantas de importância econômica ([Golnaraghi and Sh., 2008;](#) [Hassani-Mehraban et al., 2005;](#) [Rasoulpour, 2007;](#) [Winter, 2006](#)). Na Ásia, o GBNV é o tospovírus de maior importância, dado à sua ampla gama de hospedeiras, sendo um vírus devastador em culturas de grande relevância agroeconômica como batata, amendoim, tomate e soja em países como a China, Irã, Nepal, Sri Lank e Tailândia ([Reddy and Vijaylakshmi, 1995](#)). Na Índia, estimou-se perdas de 70- 90% da produção de amendoim ([Singh, 1995](#)) causadas por essa espécie. Outro tospovírus de importância é o WBNV, causador de perdas de até 100% da produção de cucurbitáceas na Índia ([Jain, 2007;](#) [Mandal, 2003;](#) [Singh, 1996](#)). Há relatos mais recentes de infecção por tospovírus na Ásia, como por exemplo, o CSNV no Japão ([Matsuura, 2007](#)) e PYSV, PCFV, WSMoV infectando principalmente produtos hortícolas.

Europa

TSWV e INSV são os tospovírus melhor estabelecidos e mais difundidos no continente europeu (EPPO, 2004; Kazinczi, 2007; Mumford et al., 1996). Na região oeste da Europa, o TSWV diminuiu a sua importância, devido ao controle do vetor com a utilização generalizada de inseticidas, o mesmo, não foi observado na Europa oriental, pois não houve tal controle (Jones, 2005). Outros fatores que contribuíram para o declínio do vírus na Europa ocidental foi a mudança da forma de cultivo e a utilização de culturas especializadas (resistência genética), porém alguns surtos ocorreram na década de 80 (Peters, 1996). O INSV, transmitido por *F. occidentalis*, foi relatado pela primeira vez na Europa em 1991 (Peters, 1996) e desde então, tem sido encontrado em mais de 12 países europeus (Lebas, 2007). Perdas devido à infecção do INSV na Europa ocorrem principalmente em áreas de cultivo protegido com diversos tipos de culturas de plantas ornamentais, tais como begônia, impatiens e lisianthus. As perdas mais drásticas são em flores de corte e plantas em vaso, e ocorrem mesmo em sistemas de cultivo protegido, demonstrando, que tanto o vírus, como o vetor, podem persistir ao longo do ano (Blockley, 2001; Verhoeven, 1995). Uma nova espécie de tospovírus, Polygonum ringspot virus (PoRSV) isolado trigo, foi relatado recentemente na Itália (Ciuffo et al., 2008).

América do Norte

Na América do Norte são observados três tospovírus de relevância TSWV, IYSV e INSV (Tabela 1) (Law et al., 1991; Paliwal, 1974). TSWV foi identificado causando perdas significativas em abacaxi no Havaí em 1926 (Kucharek, 2000). O vírus não apresentava sintomas sistêmicos na planta, mas mesmo assim, a perda econômica foi relevante, provavelmente pela rápida disseminação devido ao vetor *T. tabacci* que apresentava alta incidência na região. Ao longo de décadas, estudos tem demonstrado que culturas como tomate, alface, amendoim, pimenta e tabaco apresentam perdas significativas pela infecção do TSWV (Cho, 1989.; Culbreath, 1991; Haliwell, 1974). Perdas anuais devido a surtos do TSWV em amendoim foram estimados em mais de 100,000,000 dólares apenas no estado da Geórgia EUA (Pearce, 2005). O IYSV tem sido um grande motivo de preocupação nos campos de cultivo de plantas ornamentais, as principais espécies atacadas são begônia, crisantemum e impatiens (Daughtrey et al., 1997). Devido ao controle do vetor, houve uma redução da perda, porém recentemente foi observado a devastação de campos de

cebola por sua infecção ([Gent et al., 2006](#)). No México e Canadá existem vários relatos da infecção destes três tospovírus, onde é bem estabelecida a presença dos vírus e dos seus vetores ([Allen, 1983](#); [Allen, 1986](#); [Broadbent, 1987](#); [Matteoni, 1988](#); [Paliwal, 1974](#)).

América do Sul

Na América do Sul, TSWV e IYSV estão bem estabelecidos ([Gracia, 1999](#); [Jones, 2005](#); [Maluf, 1991](#)). Na América Central também é identificada a presença desses vírus ([EPPO, 2004](#); [Lebas, 2007](#)). TSWV é observado infectando e causando perdas significativas na produção de tomate, alface e pimentão no Brasil, Argentina e Chile. ([Rosales, 2007](#)). IYSV causa perdas significativas na produção de cebola no Chile e Peru ([Mullis SW, 2004](#); [Rosales et al., 2005](#)). Depois da Ásia, a América do Sul é a região com maior diversidade de espécies de tospovírus no mundo (Tabela 1).

Brasil

No Brasil há relatos de tospovírus infectando uma ampla gama de hospedeiras, desde o ano de 1940, a partir de estudos do Dr. Álvaro Santos Costa. O TSWV detém grande relevância considerando a capacidade de causar perdas econômicas em plantações, principalmente de tomate e pimentão. Além do TSWV, existem várias outras espécies que apresentam impacto na perda de produção agrícola no país, como, ZLCV parasitando cucurbitáceas, GRSV tomate e pimentão, TCSV em tomate, alface e pimentão, CSNV em culturas ornamentais e o IYSV, atacando principalmente plantações de cebola. O vírus TSWV, apresenta relatos no estado de Pernambuco desde 1986 causando prejuízos na cultura de alface, pimentão e tomate, os primeiros surtos desse vírus no Submédio do Vale do São Francisco ocorreram em 1995 nas culturas de pimentão e tomate, onde foi estimada a perda de produção de 30% em tomateiro. Nos anos que se seguiram, as perdas nessas culturas foram bastante significativas. No período de 1995 a 1997, levantamentos de tospovírus realizados em tomateiro e pimentão em 56 áreas do Submédio do Vale do São Francisco, indicaram que *Groundnut ringspot virus* é a espécie predominante nestas culturas, tendo sido detectada em 76,2% das 202 amostras de pimentão analisadas no período e em 67,0% das 630 amostras de tomate. Atualmente, a incidência de tospovírus nestas culturas tem sido estimada em até 100%, em algumas áreas, principalmente na cultura do pimentão ([Giampan, 2007](#)).

Perdas de até 100% foram relatadas na produção de alface ([Moraes, 1986](#)), 96.3% na produção comercial de tomate ([Fajardo, 1997](#)) e de 49 a 69% de perdas de pimentão ([Cupertino, 1974](#)) pela infecção de TSWV. As outras espécies virais dentro do gênero, também demonstram relevantes danos à agricultura brasileira. ZLCV, espécie identificada apenas no Brasil, causa danos consideráveis nas produções de cucurbitáceas nos estados de São Paulo e Tocantins, atacando principalmente melão e melancia ([Resende, 1996](#); [Rezende, 1997](#)). Em uma análise global, o GRSV, em termos de incidência, é o tospovírus mais encontrado no Brasil, infectando principalmente solanáceas e leguminosas ([Pio-Ribeiro, 2000](#)) e causando grandes perdas a essas culturas de valor nutricional e econômico para o país.

Sintomatologia.

Em condições naturais os tospovírus são transmitidos por várias espécies de tripses ([Pappu et al., 2009](#)). No entanto, os tospovírus podem também ser transmitidos de forma mecânica com diferentes graus de eficiência dependendo da espécie viral e da planta hospedeira. Não há evidências de transmissão via sementes, apesar de ser possível detectar tospovírus na casca da semente de amendoim, porém, não no embrião ([Pappu et al., 2009](#)). Na natureza, a principal fonte de disseminação é o seu vetor e o homem, fator que pode está ligado com o sua alta dispersão em nível global.

Em relação aos efeitos causados nas plantas hospedeiras, os sintomas apresentados pela infecção dos tospovírus são variados, podendo ser observadas lesões necróticas em partes da folha e pecíolo, clorose de folhas, nanismos da planta, entre outros ([Pappu et al., 2009](#)). No entanto, existem sintomas mais típicos, como aqueles observados nas folhas que apresentam anéis necróticos geralmente sinuosos e evidentes com intercalação de uma cor amarela mais fraca com o fundo verde mais expressivo e o curvamento foliar em plantas de tomate (Figura 4). Nos frutos, apresentam manchas arredondadas de cor verde amarelada intercalada com o fundo vermelho do fruto maduro (Figura 4) ([Pappu et al., 2009](#)).



Figura 4: Sintomas de anéis necróticos em folhas e frutos dado pela infecção do *Tomato spotted wilt virus* em tomate e amendoim (Fonte: [Pappu et al., 2009](#)).

A severidade dos sintomas causados por tospovírus em diferentes hospedeiros parece estar relacionada a capacidade das espécies de se replicarem nos tecidos infectados, a eficiência da proteína NSs em suprimir o mecanismos de silenciamento gênico e a movimentação eficiente a curta e longa distância do vírus mediada pela proteína NSm. Além disso, a proteína de movimento NSm é também apontada como um fator importante na determinação da capacidade de interação específica com a planta hospedeira (espectro de hospedeiros) das diferentes espécies de tospovírus.

Movimento Viral em planta.

Vírus de plantas geralmente apresentam genoma pequeno em comparação ao que é observado nos vírus que infectam célula animal. As ORFs que compõem o genoma variam de 3 a 15, dependendo do gênero viral. Os vírus devem realizar com êxito a infecção na planta utilizando uma quantidade pequena de informação genética, por conseguinte, qualquer gene viral apresentado após anos de seleção evolutiva acaba por ter, pelo menos, uma função essencial e provavelmente são multifuncionais.

Entre as ORFs no genoma de vírus de planta, há uma classe de proteínas responsáveis por garantir o movimento viral, as Proteínas de Movimento (MP). Essas proteínas estão entre as responsáveis por garantir a infecção e disseminação viral na hospedeira. Distintamente das células animais, células vegetais apresentam parede celular, uma barreira que deve ser ultrapassada para o desenvolvimento da infecção viral, e as MPs são as grandes responsáveis por ultrapassar essa barreira.

Estudos de genética e biologia molecular vem demonstrando que essa classe de proteínas (MPs), interagem com o plasmodesma (PD), aumentando o seu limite de exclusão (LEP), possibilitando a passagem dos vírus ([Wolf et al., 1989](#)). As MPs podem ser divididas em duas grandes categorias de acordo com o grau de mudanças estruturais que induzem nos plasmodesmas, quando a passagem viral é através da partícula viral completa ou sob a forma de complexo de ácido nucléico associado a proteína de movimento ([Benitez-Alfonso et al., 2010](#); [Niehl and Heinlein, 2011](#); [Scholthof, 2005](#)). Existem dois exemplos de maquinaria de movimento viral bastante exploradas. Para a espécie *Tobacco mosaic virus* (TMV), o movimento é garantido pela associação da MP com RNA viral, passando pelo PD, no entanto, sem causar

alterações visuais óbvias do PD. No entanto, no caso dos vírus *Cowpea mosaic virus* (CPMV) ou *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), ocorre uma reestruturação drástica do PD, por aparente remoção dos desmotúbulos, passagem do retículo endoplasmático (RE), levando a uma expansão do poro para permitir a passagem de vírions com diâmetro de até 50 nm (Figura 5). Geralmente esses vírus formam túbulos que são polímeros da proteína de movimento facilitando a passagem viral. ([Benitez-Alfonso et al., 2010](#); [Niehl and Heinlein, 2011](#); [Tilsner et al., 2011](#); [Ueki et al., 2011](#)).

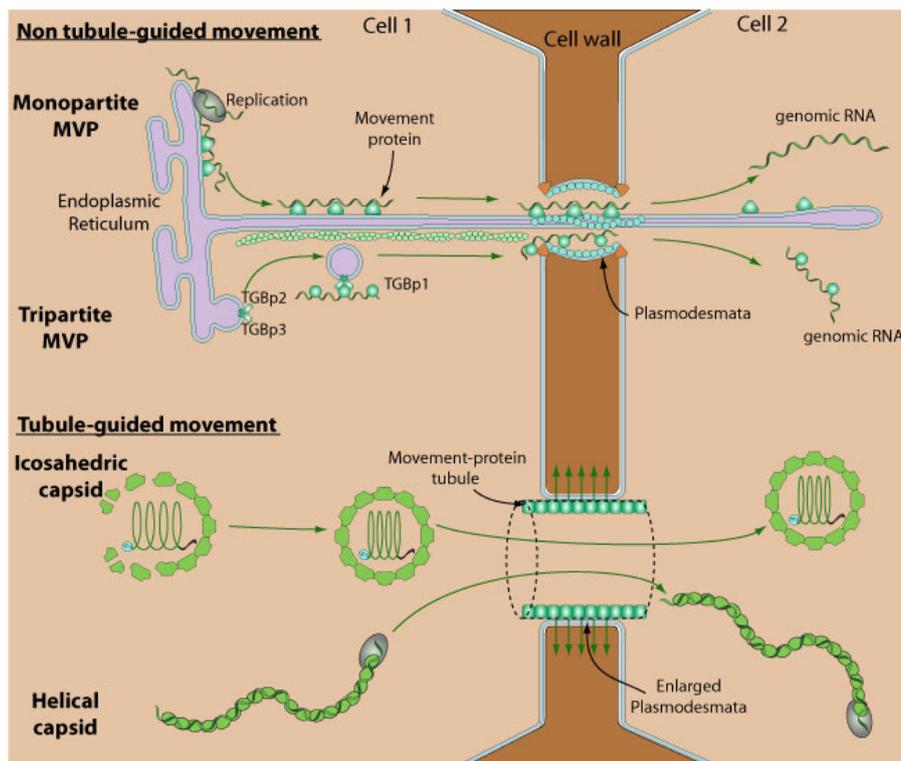


Figura 5: Non tubule-guided movement: Movimento é mediado pela associação básica da proteína de movimento (MP) com o material genético viral acompanhando o fluxo de retículo endoplasmático (RE) pelo plasmodesma, após a replicação do material genético no retículo endoplasmático. Ocorre passagem viral sem modificações expressivas do plasmodesma. **Tubule-guided movement:** Os túbulos são formados pela proteína de movimento (MP), a partir da modificação estrutural dos plasmodesmas. As partículas virais formadas pela associação da proteína capsial (CP) com o RNA viral (vRNA) passam através dos túbulos de forma específica, devido à interação entre a proteína capsial e a proteína de movimento. Neste caso ocorrem modificações expressivas do plasmodesma. (Fonte: [Viralzone expazy](#))

Movimento intracelular e intercelular de célula à célula.

A maioria dos primeiros trabalhos sobre movimento viral intracelular, centrou-se na possível associação da MP com microtúbulos ([Heinlein et al., 1995](#); [McCartney et al., 2005](#); [Padgett et al., 1996](#)). Foi observado como a MP do TMV se liga fortemente aos microtúbulos e tem domínios característicos de tubulina ([Boyko et](#)

[al., 2000](#)). No entanto, estudos nos quais fizeram a ruptura dos microtúbulos, utilização de tratamentos químicos que impossibilitavam a sua polimerização e também o silenciamento de genes da tubulina, não resultaram em efeito negativo na propagação do TMV ([Gillespie et al., 2002](#); [Kawakami et al., 2004](#)).

Uma série de estudos recentes vem demonstrando a influência de microfilamentos de actina no movimento intracelular de alguns vírus. Por exemplo, observou-se que complexos de replicação viral (VRCs) formados em células infectadas pelo TMV, possivelmente associados com microfilamentos, garantiram o tráfego ao longo dos microfilamentos ([Liu et al., 2005](#)). Os VRCs, também foram observados ao longo da periferia celular, sugerindo que esses complexos se movem ao longo dos microfilamentos para a deposição de componentes virais nos PDs, garantindo assim, o início do transporte intercelular ([Kawakami, 2004](#)). Além VRCs do TMV, para o vírus *Turnip mosaic virus* e CaMV, foi demonstrado que ambos os complexos de replicação estão envolvidos no tráfego ao longo dos microfilamentos ([Harries et al., 2009a](#)).

Além da actina, trabalhos recentes buscam explorar a significância da miosina no movimento intracelular. Em um estudo de modificação de domínios de subunidades da miosina necessários para o movimento, sequências específicas foram deletadas e causando a inibição da associação de proteínas essenciais para o movimento viral no PD ([Avisar et al., 2008](#)). Outro estudo, abrangeu o silenciamento de miosinas de *N. benthamiana*, através do silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), e a consequência disso para o movimento de diversos tipos de vírus. Observou-se que, dependendo do vírus, o silenciamento de uma classe de miosinas impossibilitava o movimento, no entanto, para outros vírus, nenhuma inibição no movimento foi verificada ([Harries et al., 2009b](#)).

Ensaio de localização subcelular também demonstraram possíveis sítios na célula envolvidos com o movimento como, por exemplo, o retículo endoplasmático, citoesqueleto, cloroplastos, membrana citoplasmática ([Heinlein et al., 1998b](#); [Kawakami et al., 2004](#)). Embora já tenha bastante informação sobre fatores celulares envolvidos no tráfego viral dentro da célula, ainda não é possível traçar uma rota comum, pois dependendo do gênero viral e até mesmo da espécie viral, o comportamento no movimento é diferente. No entanto, com o desenvolvimento de metodologias de análise *in vivo*, de associação da proteína viral com proteínas do

hospedeiro, ensaios de sub-localização celular, entre outros, a elucidação das principais rotas de transporte viral em plantas vem sendo esclarecidas.

No movimento intercelular, a principal barreira a ser ultrapassada pelo vírus é o PD. Ainda há pouca informação de como as MPs agem para aumentar o limite de exclusão dessas estruturas. Trabalhos com a MP do TMV relataram inicialmente a funcionalidade da MP no aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas ([Wolf et al., 1989](#)), seguindo, posteriormente, com a descoberta de várias outras MPs envolvidas com essa função ([Lucas, 2006](#)). Atualmente existem vários modelos que sugerem como as MPs atuam no aumento do limite de exclusão dos PDs. Um modelo bem aceito é de que os filamentos de actina desempenham um papel importante no controle dos PDs ([Ding et al., 1992](#)) e como já foi observado, que a MPs de alguns vírus apresentam uma forte ligação com filamentos de actina, possivelmente *in vivo*, há interação das MPs com esses filamentos regulando a permeabilidade dos PDs ([Su et al., 2010](#)). Um outro fator além do citoesqueleto, é a deposição de calose como um outro fator de regulação do LEP. Vários trabalhos observaram que um aumento na concentração de calose nos PDs diminui o LEP ([Radford and White, 1998](#); [Radford and White, 2001](#); [Sivaguru et al., 2000](#)). Estudo, onde uma glucanase, capaz de clivar a calose, foi expressa no genoma do TMV, observou-se um aumento considerável do movimento viral ([Bucher et al., 2001](#)).

Em relação aos tospovírus, ensaio a partir da utilização da metodologia de “Yeast-two-hybrid”, permitiu a identificação da At-4/1, uma proteína do plasmodesma de arábida que interage com a MP do TSWV formando túbulos e garantindo o movimento intercelular ([Paape et al., 2006](#)). Outro conjunto de proteínas chamadas de PDLPs (“Plasmodesmata Located Proteins”) também foram observadas associadas com MPs nos plasmodesmas formando túbulos e possibilitando o movimento célula a célula ([Amari et al., 2010](#)).

Uma questão pendente é a compreensão mais minuciosa da associação de proteínas virais à proteínas dos hospedeiros. O estudo dessa questão abre portas para novas investigações e para o entendimento mais claro de como o vírus se movimenta no hospedeiro e em uma abordagem mais detalhada, de como os PDs se relacionam com o movimento célula à célula. Considerando o número de espécies virais já descritas, muito ainda é necessário ser feito para a elucidação dessa etapa das infecções virais em plantas.

Movimento sistêmico.

Os vírus se movimentam de forma sistêmica na planta através dos vasos vasculares, principalmente pelo floema e em alguns casos pelo xilema. No entanto, em contraste com a gama de informações que já foi explorada no movimento intracelular e intercelular, pouco se sabe a respeito do movimento sistêmico. Há uma limitação no entendimento de fatores virais associados a fatores do hospedeiro no processo de movimento via vasos vasculares. No entanto, estudos recentes tem lançado luz sobre alguns fatores que são críticos para o movimento a longa distância.

Estudos demonstraram que uma pectinametiltransferase é essencial para o movimento célula a célula do TMV ([Chen et al., 2000](#)). A supressão dessa enzima em plantas de tabaco demonstrou um retardo no movimento sistêmico ([Chen and Citovsky, 2003](#)). Interação do Triple-gene-block (TGB) com o núcleo e com microfilamentos, mostrou-se essencial para o movimento sistêmico ([Wright et al., 2010](#)). A proteína 1a do CMV é um componente da replicase viral, não é apenas essencial para a replicação viral, mas também para o movimento sistêmico a partir de associação dessa proteína com fatores do hospedeiro como a Tco11 metiltransferase. A super expressão desta proteína aumentou consideravelmente o movimento sistêmico ([Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003](#)). Os proteossomas também tem influência no movimento sistêmico, e isso foi demonstrado em ensaio com VIGS (“Virus-Induced Gene Silencing”) que permitiram a identificação de uma subunidade RPN9 do proteossoma 26s envolvido com o movimento sistêmico ([Jin et al., 2006](#)).

Os estudos no movimento sistêmico tem focado principalmente na identificação de fatores do hospedeiro que facilitam o movimento, no entanto, é igualmente importante, compreender como atuam os reguladores que atuam limitando o movimento viral. Em geral, os sistemas de defesa do hospedeiro desempenham um papel na restrição sistêmica do movimento. Exemplos incluem mecanismos de defesa mediados pelo hospedeiro como o silenciamento gênico ([Cao et al., 2010](#)), via do ácido salicílico ([Alamillo et al., 2006](#)) e do etileno ([Love et al., 2007](#)). Um desafio futuro é elucidar a associação de fatores positivos e negativos no controle da propagação viral no hospedeiro.

Movimento em tospovírus.

O movimento nas espécies do gênero *Tospovirus* é mediado pela proteína não estrutural NSm, a qual tem envolvimento com o movimento célula à célula e o

movimento a longa distância na planta hospedeira. O seu funcionamento ocorre, pela formação de túbulos na superfície do protoplastos ([Storms et al., 1995](#); [Waigmann, 1994](#)), associação com a proteína do nucleocapsídeo, além do envolvimento com o aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas ([Wolf et al., 1989](#)), (Figura 4). A NSm do TSWV parece exercer função no vetor, uma vez que a sua identificação, através de microscopia e imunocitoquímica em células de *F. occidentalis*, demonstrou que sua expressão também ocorre no inseto vetor ([Nagata et al., 1999](#)).

Um dos primeiros trabalhos de caracterização das proteínas de movimento de tospovírus que buscou o entendimento de domínios, regiões conservadas e diversidade, foi feito por [Silva et al., \(2001\)](#). As proteínas de movimento dos vírus GRSV, TCSV, ZLCV, CSNV e IYSV, foram caracterizadas com a observação de motivos conservados como o "D-motif", motivo este da superfamília 30K de proteínas de movimento viral, além, de um outro motivo conservado A2 de fosfolipase. A superfamília 30K corresponde a um grupo de proteínas de movimento viral que tem como membro tipo a MP do *Tabacco mosaic virus* (TMV). A família agrega 18 gêneros diferentes, onde cada um expressa uma MP única com uma massa molecular de aproximadamente 30 kDa ([Peiro et al., 2014](#)). Predições comparativas da estrutura secundária revela uma estrutura comum variável flanqueada nos domínios N e C-terminal das proteínas, os quais consistem de series de β -elementos flanqueados por um α -hélice em cada extremo da proteína ([Melcher, U., 2000](#)).

Estudos mais recentes demonstraram domínios da proteína NSm do TSWV responsáveis pela formação de túbulos, movimento e sintomatologia. Três grupos de aminoácidos D (154), EYKK (205-208) e EEEEE (284-288) foram relacionados ao movimento a longa distância e formação de túbulos em plantas de tabaco. O grupo EEEEE (284-288) demonstrou ser essencial para o movimento a longa distância, D (154) foi essencial para formação de túbulos e movimento célula à célula e a região I (57) - N (100) foi identificada como determinante de necrose foliar em plantas de tabaco ([Li et al., 2009](#)).

Além da função básica de movimento, a NSm também tem relação com outros processos da infecção viral. Mais recentemente, a NSm foi identificada como o determinante de avirulência, ([Hallwass et al., 2014b](#); [Peiro et al., 2014](#)). Substituição do aminoácido C por Y na posição C118Y ou T120N na NSm do TSWV, conferiu a quebra de resistência do gene Sw5, demonstrando, também, sua participação no ruptura da resistência ([Lopez C, 2011](#); [Peiro et al., 2014](#)).

Em espécies virais de outros gêneros que infectam planta, observa-se a influência da proteína de movimento com a replicação. No Gênero *Potyvirus* e *Potexvirus*, há formação de vesículas que são sítios de replicação viral (VCRs), derivadas do retículo endoplasmático (RE) (Schaad et al., 1997). Nos *Potexvirus*, as vesículas são induzidas pela proteína de movimento ancorando fatores de replicação viral (Verchot-Lubicz and Goldstein, 2010). Outro caso de associação da MP com fatores de replicação foi observado no TMV, onde a MP expressada isoladamente, localizou-se formando agregados no RE, PD, microtúbulos e citoplasma. Em células infectadas, os agregados da MP do TMV continham a repliacase e RNA, indicando sua acumulação nos VCRs (Heinlein et al., 1998a; Kawakami et al., 2004). Os VCRs também foram localizados na abertura dos plasmodesmas, sugerindo que a replicação está ligada a circulação viral (Kawakami et al., 2004; Szécsi et al., 1999). Ainda há dúvidas de como a MP interage com os VCRs, uma vez que os estudos demonstraram que a interação não é diretamente com a replicase (Hirashima and Watanabe, 2003), mas sim, com o RNA viral, demonstrando o envolvimento da MP no processo (Más, 1999).

Pouco ou nada se sabe da influência da NSm no processo de replicação dos tospovírus. Em ensaios de interação NSm com RNA, Soellick et al. (2000) identificaram a real associação da proteína de movimento com RNA, porém parece ser uma associação que não está ligada diretamente com o movimento viral, uma vez que há mais evidências de que os tospovírus se movimentam pela associação da NSm com a proteína do nucleocapsídeo garantindo a movimentação da partícula viral. Portanto, não parece ser uma movimentação viral a partir da associação da proteína de movimento com RNA viral, como observado com os *Potyvirus*. No entanto, a interação da NSm com RNA na replicação e movimentação viral, não pode ser descartada. Existem evidências que, em espécies de outros gêneros virais, esse tipo de associação está envolvida com processos de replicação e movimentação viral.

Existe uma carência no estudo do gênero *Tospovirus*, em relação aos fatores do hospedeiro que se associam com fatores virais, garantindo o desenvolvimento da infecção. No presente estudo, buscou-se explorar as relações e interações intra e interespecíficas de proteínas de movimento de diferentes espécies de tospovírus e possíveis associações com fatores do hospedeiro mediando o movimento viral e/ou a capacidade de infectar distintas plantas determinando o espectro de hospedeiros.

Engenharia Genética para o Estudo do Movimento Viral em Plantas: Sistema *Alfalfa mosaic virus* (AMV).

Atualmente vários sistemas são utilizados para o estudo de movimento viral. Um sistema bastante eficiente e explorado no presente estudo, baseia-se na utilização de clones infecciosos que possibilitam a inserção de genes heterólogos de distintos gêneros de vírus que infectam plantas, possibilitando o estudo de movimento célula à célula e movimento sistêmico. O Sistema tem como vetor viral, o vírus *Alfalfa mosaic virus* (AMV), este vírus pertence a família *Bromoviridae*, que contém os gêneros *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Oleavirus*, *Alfamovirus* e *Ilarvirus*. O seu genoma consiste de ssRNA tripartido onde, RNA1 e RNA2 codificam proteínas da replicase viral 1a e 2a (Nassuth, 1983) respectivamente (ou P1 e P2, utilizando a terminologia do *Alfamovirus*) (Hayes and Buck, 1990; Horikoshi et al., 1987; Quadt et al., 1988). O RNA 3 codifica a proteína de movimento (MP) e a proteína da capa (CP), qual é traduzida de um RNA subgenômico (RNA 4) (Figura 6).

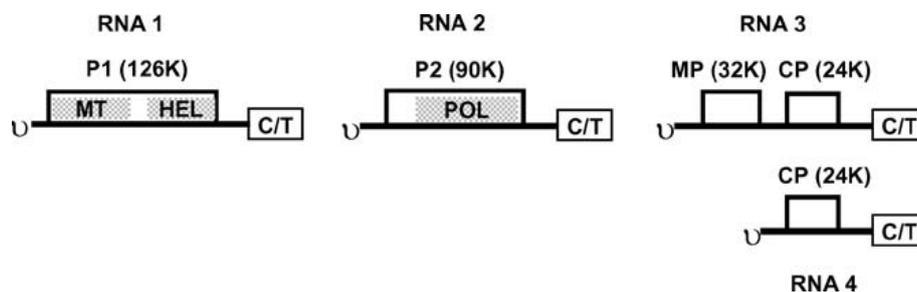


Figura 6: Estrutura genômica do AMV. Metiltransferase-like (MT), helicase-like (HEL) e polimerase-like (POL) domínios estão sombreadas. A caixa C / T representa a sequência 3' do RNA que podem ser dobrados em uma estrutura de ligação com CP ou um RNAt. A estrutura cap do extremo 5' é representado pelo símbolo v. (Fonte: revisão de Bol, 2005).

Para o estudo de movimento e/ou estudo do ciclo de replicação do vírus, foi feito a construção de plantas de tabacos, transformadas com cópias dos 4 RNAs em diferentes plantas ou da combinação de diferentes RNAs na mesma planta (RNA1 com RNA2, RNA1 com RNA3), (Peter E. M. Taschner, 1991). O cassete utilizado para construção dos transgênicos consistia da fusão do promotor 35S do CaMV com os 4 genes do AMV. Dentre as combinações, a construção chamada de P12 (que consiste na combinação do RNA1 + RNA2 ou P1+P2 na mesma planta), após a infecção com o RNA3, observou-se replicação em níveis normais do RNA 3, sugerindo que a P1 e P2 estavam ativas no transgênico (Peter E. M. Taschner, 1991).

Dentre os RNAs do AMV, o RNA3 é o RNA utilizado para inserção de genes heterólogos, focando aspectos no estudo de movimento viral. Várias estratégias foram exploradas para a utilização desse RNA como vetor de expressão do gene GFP em plantas de tabaco expressando a P1 e P2 viral. A inserção de um subgenômico promotor (sgp)-GFP, entre o gene da CP e a região 3'UTR interferiram com acumulação do RNA em protoplastos, indicando que as sequências necessárias para replicação foram interrompidas. Quando o GFP foi fundido com o N terminal da MP e da CP, os RNAs quiméricos acumularam em protoplasto, no entanto, o movimento célula a célula foi bloqueado. A inserção de um cassete sgp-GFP imediatamente após o gene da CP causou resposta de hipersensibilidade no hospedeiro, embora, a inserção do mesmo cassete depois do gene da MP, não afetou a formação de sintomas, gerou acumulação de RNA na folha inoculada, mas não nas folhas sistêmicas de plantas P12 e de *N. benthamiana* não transgênica ([Sanchez-Navarro et al., 2001](#)).

Com o sistema de plantas P12 e vetor RNA 3 AMV, muitos aspectos do movimento celular foram explorados, além de aspectos que envolvem peculiaridades das proteínas de movimento de espécies virais de distintos gêneros. Aspectos envolvidos com o entendimento da forma como se movimentam vírus de diferentes gêneros que infectam plantas, foi explorado através da inserção da MP heteróloga no RNA 3 do AMV e posterior inoculação em plantas P12. Observou-se que as espécies *Prunus necrotic ringspot virus*, *Brome mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus* e *Cowpea mosaic virus*, eficientemente garantiram a movimentação célula a célula, porém, somente quando os 44 aminoácidos da MP do AMV fusionado ao extremo 3' das MPs heterólogas estavam presentes. Com a MP do vírus, *Tobacco mosaic virus*, a movimentação célula a célula foi eficiente, tanto com a extensão ou sem a extensão do A44 da MP do AMV ([Fajardo et al., 2013](#)). Quando foi feita a substituição da CP Wt por uma CP defectiva nas construções RNA3 contendo as proteínas heterólogas de movimento do *Brome mosaic virus*, *Cowpea mosaic virus* e *Tobacco mosaic virus*, observou-se a manutenção do movimento, em todas as construções analisadas, demonstrando dessa forma, que não há necessidade da formação de vírions para a movimentação viral. Nesse contexto, somente a associação da MP com o RNA viral garantiria a movimentação do AMV com base nas MPs testadas ([Sanchez-Navarro et al., 2006](#)).

Na presente tese, a utilização do sistema AMV para a avaliação do movimento viral baseado na utilização das MPs de distintas espécies de tospovírus, geraram

resultados interessantes para o entendimento das interações de tospovírus e plantas hospedeiras. As diferenças encontradas entre as proteínas NSm estudadas parecem refletir as características biológicas contrastantes entre os tospovírus estudados.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alamillo, J.M., Saenz, P., and Garcia, J.A. (2006). Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J* 48:217-227.
- Allen, T.C., McMorran, J.P., Locatelli, E.A., . (1983). Isolation of tomato spotted wilt virus from *Hydrangea* and four weed species. *Plant Dis.* 67, 429–431. *Plant Dis.* 67:429–431.
- Allen, W.R., Broadbent, A.B., . (1986). Transmission of tomato spotted wilt virus in Ontario greenhouses by *Frankliniella occidentalis*. *Can. J. Plant Pathol.* 8:33–38.
- Amari, K., Boutant, E., Hofmann, C., Schmitt-Keichinger, C., Fernandez-Calvino, L., Didier, P., Lerich, A., Mutterer, J., Thomas, C.L., Heinlein, M., et al. (2010). A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS pathogens* 6:e1001119.
- Anfoka, G.H., Abhary, M., Stevens, M.R.,. (2006). Occurrence of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Jordan. *EPPO Bull.* 36,:517-522.
- Avisar, D., Prokhnevsky, A.I., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and Dolja, V.V. (2008). Myosin XI-K Is required for rapid trafficking of Golgi stacks, peroxisomes, and mitochondria in leaf cells of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol* 146:1098-1108.
- Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C., and Maule, A.J. (2010). Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 23:1403-1412.
- Bertran, A.G., Oliveira, A.S., Nagata, T., and Resende, R.O. (2011). Molecular characterization of the RNA-dependent RNA polymerase from groundnut ringspot virus (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). *Archives of virology* 156:1425-1429.
- Bezerra, I.C., de, O.R.R., Pozzer, L., Nagata, T., Kormelink, R., and De Avila, A.C. (1999). Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology* 89:823-830.
- Blockley, A.L., Mumford, R.A.,. (2001). Identification and isolation of *Impatiens necrotic spot virus* from prickly pear cactus (*Opuntia microdasys*). *Plant Pathol.* 50.
- Bol, J.F. (2005). Replication of alfamo- and ilarviruses: role of the coat protein. *Annu Rev Phytopathol* 43:39-62.
- Boyko, V., Ferralli, J., Ashby, J., Schellenbaum, P., and Heinlein, M. (2000). Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA. *Nature cell biology* 2:826-832.
- Broadbent, A.B., Allen, W.R., Footitt, R.G., . (1987). The association of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) with greenhouse crops and the tomato spotted wilt virus in Ontario. *Can. Entomol.* 119: 501–503.
- Bucher, G.L., Tarina, C., Heinlein, M., Di Serio, F., Meins, F., Jr., and Iglesias, V.A. (2001). Local expression of enzymatically active class I beta-1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *Plant J* 28:361-369.
- Cao, M., Ye, X., Willie, K., Lin, J., Zhang, X., Redinbaugh, M.G., Simon, A.E., Morris, T.J., and Qu, F. (2010). The capsid protein of Turnip crinkle virus overcomes two separate defense barriers to facilitate systemic movement of the virus in *Arabidopsis*. *Journal of virology* 84:7793-7802.

- Chapman, E.J., Hilson, P., and German, T.L. (2003). Association of L protein and in vitro tomato spotted wilt virus RNA-dependent RNA polymerase activity. *Intervirology* 46:177-181.
- Chen, M.H., and Citovsky, V. (2003). Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *Plant J* 35:386-392.
- Chen, M.H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A.K., and Citovsky, V. (2000). Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J* 19:913-920.
- Cho, J.J.M., R.F.L. German, T.L. Hartmann, R.W. Yudin, L.S. Gonsalves, D. Provvienti, R. (1989.). A multidisciplinary approach to management of tomato spotted wilt virus in Hawaii. *Plant Dis.* 73: 375–383.
- Ciuffo, M., Tavella, L., Pacifico, D., Masenga, V., and Turina, M. (2008). A member of a new Tospovirus species isolated in Italy from wild buckwheat (*Polygonum convolvulus*). *Archives of virology* 153:2059-2068.
- Culbreath, A.K., Csinos, A.S., Bertrand, P.F., Demski, J.W., (1991). Tomato spotted wilt virus epidemic in flue-cured tobacco in Georgia. *Plant Dis.* 75:483–485.
- Cupertino, F.P.C., C.L. Kitajima, E.W. Matos, J.K.A. Araujo, M.T. (1974). *Virus de cucurbitacea no Distrito Federal.* *Fitopatologia Brasileira, Brasília.* 9:51.
- Daughtrey, W.C., Gill, M.W., Pritts, I.M., Douglas, J.F., Kneiss, J.J., and Andrews, L.S. (1997). Neurotoxicological evaluation of methyl tertiary-butyl ether in rats. *Journal of applied toxicology : JAT* 17 Suppl 1:S57-64.
- de Avila, A.C., de Haan, P., Kormelink, R., Resende Rde, O., Goldbach, R.W., and Peters, D. (1993). Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *The Journal of general virology* 74 (Pt 2):153-159.
- de Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., van Poelwijk, F., Peters, D., and Goldbach, R. (1991). Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *The Journal of general virology* 72 (Pt 9):2207-2216.
- de Oliveira, A.S., Melo, F.L., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., Kitajima, E.W., and Resende, R.O. (2012). Characterization of bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the Genus Tospovirus. *PloS one* 7:e38634.
- Ding, B., Haudenschild, J.S., Hull, R.J., Wolf, S., Beachy, R.N., and Lucas, W.J. (1992). Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *The Plant cell* 4:915-928.
- Elliott, R.M. (1997). Emerging viruses: the Bunyaviridae. In: *Mol. Med.* . 572–577.
- EPPO. (2004). Data sheets on quarantine pests: Tomato spotted wilt tospovirus. Data sheets on quarantine pests (revision of original 1997c data sheet).
- Fajardo, T.V., Peiro, A., Pallas, V., and Sanchez-Navarro, J. (2013). Systemic transport of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family. *The Journal of general virology* 94:677-681.
- Fajardo, T.V.M.L., C.A, Silva, W.L.C, de Ávila, A.C. (1997). Dispersão da doença e redução da produção em tomateiro industrial infectado por tospovirus no Distrito Federal *Fitopatologia Brasileira, Brasília.* 23:413-418.
- Fauquet, C.M., and Fargette, D. (2005). International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology journal* 2:64.
- Gent, D.H., du Toit, L.J., Fichtner, S.F., Krishna Mohan, S., Pappu, H.R., and Schwartz, H.F. (2006). Iris yellow spot virus: an emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Dis.* 90:1468–1480.
- Gera, A., Kritzman, A., Cohen, J., Raccah, B., Antignus, Y., (2000). Tospoviruses infecting vegetable crops in Israel. *EPPO Bull.* 30:298-292.
- German, T.L., Ullman, D.E., and Moyer, J.W. (1992). Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annu Rev Phytopathol* 30:315-348.
- Giampan, J.S.R., J. (2007). Zucchini lethal chlorosis virus: detecção, acaliação de danos em abobrinha de moita e reação de espécies de curcubitácea. *Divisão de biblioteca e documentação.* ESALQ/USP.

- Gillespie, T., Boevink, P., Haupt, S., Roberts, A.G., Toth, R., Valentine, T., Chapman, S., and Oparka, K.J. (2002). Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. *The Plant cell* 14:1207-1222.
- Golnaraghi, A.R., Pourrahim, R., Ahoonmanesh, A., Zamani-Zadeh, H.R., Farzadfar, and Sh. (2008). Detection and characterization of a distinct isolate of Tomato yellow fruit ring virus from potato. *Plant Dis.* 92:1280–1287.
- Golnaraghi, A.R., Shahraneen, N., Pourrahim, R., Ghorbani, Sh., Farzadfar, Sh., . (2001). First report of Tomato spotted wilt virus on soybean in Iran. *Plant Dis.* :1290.
- Gracia, O., de Borbon, C.M., Granval de Millan, N., Cuesta, G.V., . (1999). Occurrence of different tospoviruses in vegetable crops in Argentina. *J. Phytopathol.* 147:223–227.
- Haliwell, R.S.P., G. (1974). Spotted wilt of peanut in Texas. *Plant Dis. Rep.* 58:23–25.
- Hallwass, M., de Oliveira, A.S., de Campos Dianese, E., Lohuis, D., Boiteux, L.S., Inoue-Nagata, A.K., Resende, R.O., and Kormelink, R. (2014a). The Tomato spotted wilt virus cell-to-cell movement protein (NS) triggers a hypersensitive response in Sw-5-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional Sw-5b resistance gene copy. *Mol Plant Pathol.*
- Hallwass, M., de Oliveira, A.S., Dianese, E.D., Lohuis, D., Boiteux, L.S., Inoue-Nagata, A.K., Resende, R.O., and Kormelink, R. (2014b). The Tomato spotted wilt virus cell-to-cell movement protein (NSm) triggers a hypersensitive response in Sw-5 containing resistant tomato lines and *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional Sw-5b resistance gene copy. *Mol Plant Pathol.*
- Hallwass, M., Leastro, M.O., Lima, M.F., Inoue-Nagata, A.K., and Resende, R.O. (2012). Sequence determination and analysis of the NSs genes of two tospoviruses. *Archives of virology* 157:591-596.
- Harries, P.A., Park, J.W., Sasaki, N., Ballard, K.D., Maule, A.J., and Nelson, R.S. (2009a). Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:17594-17599.
- Harries, P.A., Schoelz, J.E., and Nelson, R.S. (2009b). Covering common ground: F-actin-dependent transport of plant viral protein inclusions reveals a novel mechanism for movement utilized by unrelated viral proteins. *Plant signaling & behavior* 4:454-456.
- Hassani-Mehraban, A., Saaijer, J., Peters, D., Goldbach, R., and Kormelink, R. (2005). A new tomato-infecting tospovirus from iran. *Phytopathology* 95:852-858.
- Hayes, R.J., and Buck, K.W. (1990). Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63:363-368.
- Heinlein, M., Epel, B.L., Padgett, H.S., and Beachy, R.N. (1995). Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* 270:1983-1985.
- Heinlein, M., Padgett, H.S., Gens, J.S., Pickard, B.G., Casper, S.J., Epel, B.L., and Beachy, R.N. (1998a). Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *The Plant cell* 10:1107-1120.
- Heinlein, M., Wood, M.R., Thiel, T., and Beachy, R.N. (1998b). Targeting and modification of prokaryotic cell-cell junctions by tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *Plant J* 14:345-351.
- Hirashima, K., and Watanabe, Y. (2003). RNA helicase domain of tobamovirus replicase executes cell-to-cell movement possibly through collaboration with its nonconserved region. *Journal of virology* 77:12357-12362.
- Horikoshi, M., Nakayama, M., Yamaoka, N., Furusawa, I., and Shishiyama, J. (1987). Brome mosaic virus coat protein inhibits viral RNA synthesis in vitro. *Virology* 158:15-19.
- Jain, R.K., Bag, S., Umamaheswaran, K., Mandal, B.,. (2007). Natural infection by tospovirus of cucurbitaceous and fabaceous vegetable crops in India. *J. Phytopathol.* 155:22–25.

- Jin, H., Li, S., and Villegas, A., Jr. (2006). Down-regulation of the 26S proteasome subunit RPN9 inhibits viral systemic transport and alters plant vascular development. *Plant Physiol* 142:651-661.
- Jones, D.R. (2005). Plant viruses transmitted by thrips. *Eur. J. Plant Pathol.* 113:119-157.
- Kawakami, S. (2004). [Radiological reporting system developed with FileMaker-Pro: cooperation with HIS, RIS, and PACS]. *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai zasshi. Nippon acta radiologica* 64:114-120.
- Kawakami, S., Watanabe, Y., and Beachy, R.N. (2004). Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:6291-6296.
- Kazinczi, G., Horváth, J., Takács, A., . (2007). Tospoviruses on ornamentals. . *Plant Viruses* 1:142-162.
- Kritzman, A., Beckelman, H., Alexandrov, S., Cohen, J., Lampel, M., Zeidan, M., Raccach, and B., G., A., . (2000). Lisianthus leaf necrosis: a new disease of lisianthus caused by Iris yellow spot virus. *Plant Dis.* 84:1185-1189.
- Kritzman, A., Lampel, M., Raccach, B., Gera, A., . (2001). Distribution and transmission of Iris yellow spot virus. . *Plant Dis.* 85:838-842.
- Kucharek, T., Brown, L., Johnson, F., Funderburk, J., . (2000). Tomato Spotted Wilt Virus of Agronomic, Vegetable, and Ornamental Crops. . *Plant Pathology* 914.
- LA, M. (2001). So many thrips-so few tospovirus. In: Marullo R, Mound LA, editors. *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera.* pp 17-18.
- Law, M.D., Speck, J., and Moyer, J.W. (1991). Nucleotide sequence of the 3' non-coding region and N gene of the S RNA of a serologically distinct tospovirus. *The Journal of general virology* 72 (Pt 10):2597-2601.
- Lebas, B.S.M., Ochoa-Corona, F.M. (2007). Impatiens necrotic spot virus. In: Rao, G.P., Bragard, C., Lebas, B.S.M. (Eds.), *Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses. Grain Crops and Ornamentals.* Stadium Press LLC, Texas, 4:221-243.
- Li, W., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E., and Adkins, S. (2009). Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* 390:110-121.
- Liu, J.Z., Blancaflor, E.B., and Nelson, R.S. (2005). The tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiol* 138:1853-1865.
- Lopez C, A.J., Galipienso L, Soler S, Nuez F., (2011). Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 92:210-215.
- Love, A.J., Laval, V., Geri, C., Laird, J., Tomos, A.D., Hooks, M.A., and Milner, J.J. (2007). Components of Arabidopsis defense- and ethylene-signaling pathways regulate susceptibility to Cauliflower mosaic virus by restricting long-distance movement. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 20:659-670.
- Lucas, W.J. (2006). Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344:169-184.
- Maluf, W.R., Toma-Brahini, M., Corte, R.D., . (1991). Progress in breeding tomatoes for resistance to tomato spotted wilt. *Braz. J. Genet.* 14: 509-525.
- Mandal, B., Jain, R.K., Chaudhary, V., Varma, A.,. (2003). First report of natural infection of *Luffa acutangula* by Watermelon bud necrosis virus in India. . *Plant Dis.* 87:598.
- Mandal, B., Nath, K., and Das, D. (2006). Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology letters* 28:831-835.
- Más, P., and Beachy, R.N. (1999). Replication of Tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus move-ment in intracellular distribution of viral RNA. *J. CellBiol.* 147:945-958.

- Massumi, H., Samei, A., Hosseini Pour, A., Shaabani, M., Rahimian, H., (2007). Occurrence, distribution, and relative incidence of seven viruses infecting greenhouse-grown cucurbits in Iran. *Plant Dis.* 91:159–163.
- Massumi, H., Shaabani, M., Hosseini Pour, A., Heydarnejad, J., Rahimian, H., (2009). Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant Dis.* 93:67–72.
- Matsuura, S., Kubota, K., Okuda, M., (2007). First report of Chrysanthemum stem necrosis virus on chrysanthemums in Japan. *Plant Dis.* 91:468.
- Matteoni, J.A., Allen, W.R., Broadbent, A.B., (1988). Host range and symptoms of tomato spotted wilt virus. In: Ali, A.D. (Ed.), *Proceedings of the Fourth Conference on Insect Disease Management on Ornamentals*. Kansas City, MO, 84–93.
- McCartney, A.W., Greenwood, J.S., Fabian, M.R., White, K.A., and Mullen, R.T. (2005). Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *The Plant cell* 17:3513-3531.
- Melcher U. 2000. The ‘30K’ superfamily of viral movement proteins. *J. Gen. Virol.* 81:257–266
- Moore, E.S. (1933). The Kromnek or Kat River Disease of Tobacco and Tomato in the East Province (South Africa). *Dept. Agric., Union of South Africa, Sci. Bull.* 123:5-28.
- Moraes, G.J.W., L.J. Costa, A.S. (1986). Suto de vira-cabeça na cultura de alface em Pernambuco. *Horticultura Brasileira* 6:24-25.
- Mullis SW, L.J.D., Gitaitis RD, Sherwood JL, Csinos AC. (2004). First report of *Vidalia* onion (*Allium cepa*) naturally infected with Tomato spotted wilt virus and Iris yellow spot virus (family Bunyaviridae, genus Tospovirus) in Georgia. In: *Plant Disease*. 1285.
- Mumford, R.A., Barker, I., and Wood, K.R. (1996). An improved method for the detection of Tospoviruses using the polymerase chain reaction. *Journal of virological methods* 57:109-115.
- Nagata, T., Carvalho, K.R., Sodre Rde, A., Dutra, L.S., Oliveira, P.A., Noronha, E.F., Lovato, F.A., Resende Rde, O., De Avila, A.C., and Inoue-Nagata, A.K. (2007). The glycoprotein gene of Chrysanthemum stem necrosis virus and Zucchini lethal chlorosis virus and molecular relationship with other tospoviruses. *Virus genes* 35:785-793.
- Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., Smid, H.M., Goldbach, R., and Peters, D. (1999). Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt tospovirus. *The Journal of general virology* 80 (Pt 2):507-515.
- Nassuth, A., and Bol, J. F. (1983). Altered balance of the synthesis of plus- and minus-strand RNAs induced by RNA 1 and 2 of alfalfa mosaic virus in the absence of RNA3. *Virology* 124: 75585.
- Niehl, A., and Heinlein, M. (2011). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248:75-99.
- Paape, M., Solovyev, A.G., Erokhina, T.N., Minina, E.A., Schepetilnikov, M.V., Lesemann, D.E., Schiemann, J., Morozov, S.Y., and Kellmann, J.W. (2006). At-4/1, an interactor of the Tomato spotted wilt virus movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 19:874-883.
- Padgett, H.S., Epel, B.L., Kahn, T.W., Heinlein, M., Watanabe, Y., and Beachy, R.N. (1996). Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J* 10:1079-1088.
- Paliwal, Y.C. (1974). Some properties and thrips transmission of tomato spotted wilt virus in Canada. *Can. J. Bot.* 52: 1177–1182.
- Palukaitis, P., and Garcia-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Advances in virus research* 62:241-323.
- Pappu, H.R., Jones, R.A., and Jain, R.K. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus research* 141:219-236.

- Pearce, M. (2005). 2004 Georgia Plant Disease Loss Estimates. University Georgia Cooperative Extension Service.
- Peiro, A., Canizares, M.C., Rubio, L., Lopez, C., Moriones, E., Aramburu, J., and Sanchez-Navarro, J. (2014). The movement protein (NSm) of Tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the tomato Sw-5 gene-based resistance. *Mol Plant Pathol.*
- Persley, D.M., Thomas, J.E., Sharman, M. (2006a). Tospoviruses—an Australian perspective. *Australas. Plant Pathology* 35:161–180.
- Peter E. M. Taschner, A.C.V.D.K., Lyda Neeleman, And John F. Bol. (1991). Replication of an incomplete Alfalfa Mosaic Virus Genome in Plants Transformed with Viral Replicase Genes. *Virology* 181:445-450.
- Peters, D., Wijkamp, I., van de Wetering, F., Goldbach, R., (1996). Vector relations in the transmission and epidemiology of tospoviruses. *Acta Hort.* 431:29–43.
- Pio-Ribeiro. (2000). Erradicação de vírus em germoplasma de amendoim baseada na indexação sorológicas de sementes e análise de campos de multiplicação. *Fitopatologia Brasileira, Brasília.* 25:42-48.
- Qiu, W., and Moyer, J.W. (1999). Tomato Spotted Wilt Tospovirus Adapts to the TSWV N Gene-Derived Resistance by Genome Reassortment. *Phytopathology* 89:575-582.
- Qiu, W.P., Geske, S.M., Hickey, C.M., and Moyer, J.W. (1998). Tomato spotted wilt Tospovirus genome reassortment and genome segment-specific adaptation. *Virology* 244:186-194.
- Quadt, R., Verbeek, H.J., and Jaspars, E.M. (1988). Involvement of a nonstructural protein in the RNA synthesis of brome mosaic virus. *Virology* 165:256-261.
- Radford, J.E., and White, R.G. (1998). Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. *Plant J* 14:743-750.
- Radford, J.E., and White, R.G. (2001). Effects of tissue-preparation-induced callose synthesis on estimates of plasmodesma size exclusion limits. *Protoplasma* 216:47-55.
- Rasoulpour, R., Izadpanah, K., (2007). Characterisation of cineraria strain of Tomato yellow ring virus from Iran. *Australas. Plant Pathol.* 36:286–294.
- Reddy, D.V.R., Buiel, A.A.M., Satyanarayana, T., Dwivedi, S.L., Reddy, A.S., Ratna, A.S., and Vijaylakshmi, K., Ranga Rao, G.V., Naidu, R.A., Wightman, J.A., (1995). Peanut bud necrosis virus disease: an overview. I. Proceedings of a Meeting. March 20, 1995, ICRISAT Asia Centre, 3-7.
- Resende, R.O.P., L.; Nagata, T.; Bezerra, I.C.; Lima, M.I.; Kitajima, E.W.; De Ávila, A.C. (1996). New Tospoviruses Found in Brazil. Proceedings of the International Symposium on Tospovirus and Thrips of Floral and Vegetable Crops. *Acta Hortica* 431:78-89.
- Rezende, J.A.M. (1997). Incidence biological and serological characteristics of a Tospovirus in experimental fields of zucchini in São Paulo state, Brazil. *Fitopatologia Brasileira, Brasília.* V.22, n.1, p.92-95.
- Roggero, E., Perez, A., Tamae-Kakazu, M., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Wietzerbin, J., Serra, E., Revelli, S., and Bottasso, O. (2002). Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clinical and experimental immunology* 128:421-428.
- Rosales, M., Pappu, H.R., Arayam, C., Aljaro, A., (2007). Characterization of Tomato spotted wilt virus (Tospovirus, Bunyaviridae) from lettuce (*Lactuca sativa*) in Chile. *Phytopathology* 97:S101.
- Rosales, M.J., Cordon, G.P., Moreno, M.S., and Sanchez, C.M. (2005). Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta tropica* 95:74-78.
- Rybicki, E.P., and Pietersen, G. (1999). Plant virus disease problems in the developing world. *Advances in virus research* 53:127-175.
- Sanchez-Navarro, J., Miglino, R., Ragozzino, A., and Bol, J.F. (2001). Engineering of alfalfa mosaic virus RNA 3 into an expression vector. *Archives of virology* 146:923-939.
- Sanchez-Navarro, J.A., Carmen Herranz, M., and Pallas, V. (2006). Cell-to-cell movement of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of Ilar-, bromo-,

- cucumo-, tobamo- and comoviruses and does not require virion formation. *Virology* 346:66-73.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E., and Carrington, J.C. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* 16:4049-4059.
- Scholthof, H.B. (2005). Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends in plant science* 10:376-382.
- Silva, M.S., Martins, C.R., Bezerra, I.C., Nagata, T., de Avila, A.C., and Resende, R.O. (2001). Sequence diversity of NS(M) movement protein of tospoviruses. *Archives of virology* 146:1267-1281.
- Singh, A.B., Srivatava, S.K., . (1995). Status and control strategy of peanut bud necrosis disease in Uttar Pradesh. In: Buiel, A.A.M., Parevliet, J.E., Lenne, J.M. (Eds.), *Recent Studies on Peanut Bud Necrosis Disease: . Proceedings of a Meeting. March 20, 1995, ICRISAT Asia Center, India; Patancheru, Andhra Pradesh, India. International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics:pp. 65–68.*
- Singh, S.J., Krishnareddy, M., . (1996). Watermelon bud necrosis: a new tospovirus disease. *Acta Hort.* 431:68–77.
- Sivaguru, M., Fujiwara, T., Samaj, J., Baluska, F., Yang, Z., Osawa, H., Maeda, T., Mori, T., Volkman, D., and Matsumoto, H. (2000). Aluminum-induced 1-->3-beta-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiol* 124:991-1006.
- Sivprasad, B.J., Gubba, A. (2008). Isolation and molecular characterization of Tomato spotted wilt virus (TSWV) isolates occurring in South Africa. *Afr. J. Agric. Res.* 3:428-434.
- Storms, M.M., Kormelink, R., Peters, D., Van Lent, J.W., and Goldbach, R.W. (1995). The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214:485-493.
- Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., Miao, L., Wang, X.C., and Yuan, M. (2010). Cucumber mosaic virus movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. *The Plant cell* 22:1373-1387.
- Szécsi, J., Ding, X.S., Lim, C.O., Bendahmane, M., Cho, M.J., and Nelson, R.S., and Beachy, R.N (1999). Development of Tobacco mosaic virus infection sites in *Nicotiana benthamiana*. *Mol.Plant Microbe Interact.* 2:143–152.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., and Okuno, T. (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Lett* 532:75-79.
- Thompson, G.J.v.Z., J. J. B. (1996). Control of tomato spotted wilt virus in tomatoes in South Africa. In *Tospoviruses and Thrips of Floral and Vegetable Crops. Acta Horticulturae Vol. 431:pp. 379–384.*
- Tilsner, J., Amari, K., and Torrance, L. (2011). Plasmodesmata viewed as specialised membrane adhesion sites. *Protoplasma* 248:39-60.
- Tsompana M , M.J. (2008). Tospoviruses. In, Mahy, BWJ, Van Regenmortel, 442 MHV. *Encyclopedia of Virology 3rd edition. Elsevier Ltd, Oxford, UK:157-161*
- Ueki, S., Lacroix, B., and Citovsky, V. (2011). Protein membrane overlay assay: a protocol to test interaction between soluble and insoluble proteins in vitro. *Journal of visualized experiments : JoVE.*
- Ullman DE, M.R., Campbell LR, Whitfield AE, Sherwood JL. (2002). Thrips as vectors of tospoviruses. . *Advances in Botanical Research* 36::113–140.
- Uys, M.D.R., Thompson, A.H., Holz, G. (1996). Diseases associated with tomato in the main tomato-growing regions of South Africa. *J. S. Afr. Soc Hort. Sci.* 6:78–80.
- van Knippenberg, I., Goldbach, R., and Kormelink, R. (2002). Purified tomato spotted wilt virus particles support both genome replication and transcription in vitro. *Virology* 303:278-286.
- Verchot-Lubicz, J., and Goldstein, R.E. (2010). Cytoplasmic streaming enables the distribution of molecules and vesicles in large plant cells. *Protoplasma* 240:99-107.

- Verhoeven, J.T.J., Roenhorst, J.W., (1995). Tomato spotted wilt virus and Impatiens necrotic spot virus in the Netherlands: past and future. . *Gewasbescherming* 26.
- Wagmann, E., Lucas, W.J., Citovsky, V., Zambryski, P., . (1994). Direct functional assay for Tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. . *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91 :1433–1437.
- Whitfield, A.E., Ullman, D.E., and German, T.L. (2005). Tospovirus-thrips interactions. *Annu Rev Phytopathol* 43:459-489.
- Winter, S., Shahraeen, N., Koerbler, M., Lesemann, D.E. (2006). Characterization of tomato fruit yellowring virus: a new Tospovirus species infecting tomato in Iran. *Plant Pathol.* 55:287.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N., and Lucas, W.J. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246:377-379.
- Wright, K.M., Cowan, G.H., Lukhovitskaya, N.I., Tilsner, J., Roberts, A.G., Savenkov, E.I., and Torrance, L. (2010). The N-terminal domain of PMTV TGB1 movement protein is required for nucleolar localization, microtubule association, and long-distance movement. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* 23:1486-1497.

PREMISSAS DA TESE

Na virologia vegetal moderna, atualmente tem-se dado ênfase ao estudo de aspectos que envolvem variantes de virulência, patogenicidade, sintomatologia, quebra de resistência, vetor e sua especificidade de transmissão, além da tentativa da construção de transgênicos expressando proteínas viriais e clones com a possibilidade de manipulação de genes heterólogos ([Mandal et al., 2006](#); [Persley, 2006a](#); [Qiu et al., 1998](#); [Roggero et al., 2002](#); [Whitfield et al., 2005](#)). No entanto, ainda é marcante a carência de informações em relação aos aspectos que envolvem fatores virais que se associam com fatores do hospedeiro e como isso reflete a multi-funcionalidade das proteínas virais e seu impacto na biologia dos vírus vegetais.

Devido as dimensões reduzidas do genoma viral, é bastante simplório imaginar que a proteína de movimento viral esteja apenas envolvida com o movimento ou que a supressora de silenciamento esteja envolvida somente com a supressão genica, e assim subsequentemente para as demais proteínas virais. Publicações recentes demonstram a multifuncionalidade dessas proteínas, e que por exemplo, a proteína de movimento de tospovírus tem envolvimento com a sintomatologia e atua como determinante de avirulência ([Hallwass et al., 2014a](#); [Li et al., 2009](#); [Peiro et al., 2014](#)), descartando, a ideia inicial, de que a NSm somente se associaria com os plasmodesmas formando túbulos e garantindo a movimentação viral célula a célula. Levando em conta essa abordagem, o presente trabalho, visou o estudo mais detalhado *in vivo* das interações da proteína de movimento de distintos tospovírus, e seu possível papel na determinação da amplitude e/ou restrição do espectro de plantas hospedeiras.

Partindo-se do questionamento, “por que certos vírus do gênero infectam distintas famílias botânicas, enquanto outros apresentam limitação na infecção” procurou-se evidências do envolvimento da NSm nesse processo biológico.

No presente trabalho, foi explorado a possível atuação da proteína de movimento na limitação ou amplitude da infecção das espécies do gênero *Tospovirus*, através do estudo do movimento célula à célula e sistêmico (Capítulo II). Também se estudou as associações dímera e heterodímera entre classes diferentes de proteínas de algumas espécies biologicamente diferentes do gênero *Tospovirus* (Capítulo III), o envolvimento de distintas NSm como fator de avirulência em genótipos contendo o gene de resistência Sw-5 (Capítulo V), e por fim, a associação da NSm de distintos

tospovírus com fatores do hospedeiro (Capítulo III e IV).

CAPÍTULO II

Análise funcional de proteínas de movimento (NSm) de distintas espécies de tospovírus revelam comportamentos diferenciais em relação ao movimento viral.

Vírus de plantas desenvolveram uma classe de proteínas responsáveis por garantir a infecção e disseminação viral. As MPs podem ser divididas em duas grandes categorias com base no grau de mudanças estruturais que induzem nos plasmodemas. Para os tospovírus, foi demonstrado que o movimento viral requer formação de túbulos mediada pela proteína não estrutural (NSm) codificada pelo RNA M. Embora, seja esperado que este mecanismo possa ser conservado entre as 28 espécies de tospovírus relatados até o presente dentro do gênero, a comparação entre elas revela diferenças significativas nas sequências de aminoácidos das proteínas. No aspecto biológico, também são observadas diferenças significativas, entre as espécies de tospovírus, em relação a gama de hospedeiros. Especula-se que a eficiência de infecção e a especificidade com o hospedeiro possam ser influenciados pela proteína de movimento. Desse modo, o comportamento diferencial das espécies em relação ao espectro de hospedeiros pode refletir as diferenças na sequência de aminoácidos e eficiências das distintas NSm virais. Algumas espécies de tospovírus apresentam um espectro restrito de infecção, como exemplo, o Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), enquanto outras como o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Chrysanthemum stem necrotic virus* (CSNV) revelam um amplo espectro de infecção com adaptação a diversas famílias botânicas. Devido à sua função principal, as proteínas NSm são frequentemente apontadas como potenciais determinantes da especificidade de hospedeiros e / ou adaptação ao hospedeiro. Nesse estudo foi avaliada a eficiência das MPs de quatro tospovírus no movimento célula à célula e no movimento sistêmico, a partir de um sistema heterólogo de expressão baseado no vírus *Alfalfa mosaic virus* (AMV). Essa estratégia permite a intercambialidade funcional de proteínas virais (MPs) pertencentes à "família 30K". Neste trabalho, as diferenças na eficiência do movimento célula à célula e sistêmico foram estudados com base nos tamanhos médios das áreas infectadas mediadas pelas MPs testadas. Também observamos em todas as MPs testadas, a ausência do movimento viral, mediante a utilização da construção mutante CP 206 (coat protein

do AMV) que origina a formação de mutantes defectivos na formação da partícula viral. Esses resultados indicaram a incapacidade das MPs dos tospovírus para transportar outros complexos virais diferentes de vírions no contexto de movimento do AMV. Também demonstramos que as MPs de quatro tospovírus foram similarmente eficientes na formação de túbulos. Deleção do C-terminal da MP do BeNMV (vírus com espectro restrito de infecção) demonstrou que parte desse extremo não é essencial para movimentação, no entanto, para os demais tospovírus (que apresentam espectro amplo de infecção) o extremo C-terminal completo é essencial para a ocorrência do movimento viral. Esses resultados confirmaram diferentes características e comportamentos observados na movimentação viral durante a infecção dos tospovírus.

INTRODUÇÃO

Vírus de planta desenvolveram uma classe de proteínas responsáveis por garantir a infecção e disseminação viral (Niehl and Heinlein, 2011; Wolf et al., 1989). Estudos de genética e biologia molecular vêm demonstrando que essa classe de proteínas de movimento (MPs), interage com o plasmodesma (PD), aumentando o seu limite de exclusão (LEP), possibilitando a passagem dos vírus (Wolf et al., 1989). As MPs podem ser divididas em duas grandes categorias com base no grau de mudanças estruturais que induzem nos plasmodesmas (Benitez-Alfonso et al., 2010; Niehl and Heinlein, 2011; Scholthof, 2005; Taliansky et al., 2008; Tilsner et al., 2011; Ueki and Citovsky, 2011). Existem dois exemplos de maquinaria de movimento bastante explorados, a do *Tobacco mosaic virus* (TMV), onde o movimento é garantido pela associação da MP com RNA viral, passando pelo PD, no entanto, sem causar alterações visuais óbvias do PD (Melcher, 2000). O outro exemplo é o que ocorre com o *Cowpea mosaic virus* (CPMV) e com *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), no qual ocorre uma reestruturação drástica do PD, por aparente remoção dos desmotúbulos, passagem do Retículo Endoplasmático (RE), levando a uma expansão do poro. Geralmente esses vírus formam túbulos que são polímeros de proteína de movimento auxiliando a passagem viral. (Benitez-Alfonso et al., 2010; Niehl and Heinlein, 2011; Taliansky et al., 2008; Tilsner et al., 2011; Ueki and Citovsky, 2011).

Várias estratégias são utilizadas para o estudo de movimento viral. Alguns sistemas baseiam-se na utilização de clones infecciosos que possibilitam a inserção de genes heterólogos de MP de distintos gêneros de vírus que infectam plantas (Lacorte et al., 2010; Sanchez-Navarro et al., 2001). O Sistema abordado no presente estudo, para os ensaios de movimento célula à célula e movimento sistêmico, a partir da inserção de proteínas heterólogas de movimento de distintos tospovírus, tem como vetor viral, o vírus *Alfalfa mosaic virus* (AMV). Este vírus pertence à família *Bromoviridae*, na qual contém os gêneros *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Oleavirus*, *Alfamovirus* e *Ilarvirus*. O seu genoma consiste de ssRNA tripartido onde, RNA1 e RNA2 codificam proteínas da replicase viral 1a e 2a (Nassuth, 1983), respectivamente ou P1 e P2, utilizando a terminologia do *Alfamovirus* (Hayes and Buck, 1990; Horikoshi et al., 1987; Quadt et al., 1988). O RNA 3 codifica a proteína de movimento (MP) e a proteína da capa (CP), que é traduzida de um RNA subgenômico (RNA 4). Para os estudos de movimento e ou estudos do ciclo de replicação viral,

para o dado sistema, utiliza-se plantas de *N. tabacum* P12 que consistem na combinação do RNA1 + RNA2 ou P1+P2 inseridos no genoma da planta ([Peter E. M. Taschner, 1991](#); [van Dun et al., 1988](#)). O RNA3 é o RNA utilizado para inserção de genes heterólogos. Várias estratégias foram exploradas para a utilização desse RNA como vetor de expressão do gene GFP em plantas de tabaco expressando a P1 e P2 viral. Nesse sistema há ainda a necessidade da fusão, no RNA3 quimérico do AMV, de 44 aminoácidos da MP do AMV (A44) no extremo C-terminal das proteínas heterólogas. Os 44 aminoácidos terminais são responsáveis por interagir com a CP cognata auxiliando a movimentação viral ([Sanchez-Navarro and Bol, 2001](#); [Sanchez-Navarro et al., 2006](#)).

Com o sistema de plantas P12 e vetor RNA 3 AMV, muitos aspectos do movimento celular foram explorados, além de aspectos que envolvem especificidades das proteínas de movimento de espécies virais de distintos gêneros ([Aparicio et al., 2006](#); [Fajardo et al., 2013](#); [Sanchez-Navarro et al., 2006](#)).

Tospovírus causam severas perdas em diversas culturas de importância econômica no mundo ([Adkins, 2000](#); [Pappu et al., 2009](#)). Eles compreendem o único gênero da família *Bunyaviridae* onde há espécies que infectam planta, e apesar de todo o trabalho realizado em todo o mundo, o gênero *Tospovirus* ainda é o menos compreendido da família. A falta de um sistema de genética reversa, que está disponível para outros vírus de plantas, tem dificultado a investigação da maquinaria de infecção dos tospovírus, assim como, a compreensão das funções e das interações das proteínas virais durante o processo de infecção. Para os tospovírus, demonstrou-se que o movimento viral requer a formação de túbulos mediado pela NSm (proteínas de movimento não-estrutural), proteína codificada pelo M RNA e claramente envolvida com o movimento viral célula à célula e sistêmico ([Pappu et al., 2009](#)). Embora se espera que este mecanismo seja conservado entre as 28 espécies do gênero tospovírus até então relatadas ([Adkins, 2000](#); [Pappu et al., 2009](#)), comparações entre espécies dentro do gênero, apresentam diferenças significativas nas sequências de aminoácidos das proteínas virais, além de diferenças em suas características biológicas, tais como gama de hospedeiro do vírus.

Algumas espécies do gênero apresentam limitação no espectro infecção de plantas hospedeiras, como por exemplo, o vírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), em contraste, outros tospovírus, tal como o vírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) infectam várias famílias botânicas

distintas ([Bezerra et al., 1999](#); [de Oliveira et al., 2012](#); [Lebas, 2007](#); [Pappu et al., 2009](#); [Persley, 2006](#); [Resende, 1996](#)). Devido essas características peculiares a cada espécie, a proteína NSm de tospovírus pode ser designada como potencial determinante de especificidade e adaptação ao hospedeiro, no entanto, ainda não existem evidências biológicas e moleculares disponíveis para dar suporte a essa hipótese. Levando em consideração esse aspecto, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar o papel e a eficiência da MP de quatro distintas espécies de tospovírus no movimento célula à célula e movimento sistêmico através do uso do sistema de expressão do *Alfalfa mosaic virus*. Para tanto, foi avaliado a eficiência das MPs dos vírus BeNMV, TCSV, TSWV e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), os quais filogeneticamente estão inseridos no mesmo clado Americano, mas comparativamente demonstram diferenças biológicas significativas entre si.

Nossos resultados confirmam as diferentes características e comportamentos entre as proteínas de movimento das quatro espécies testadas. Sugere-se que a proteína NSm desempenhe um papel importante na determinação do espectro de infecção viral de plantas hospedeiras com base nas diferenças significativas observadas no movimento célula à célula e nos padrões de movimento sistêmico entre as NSm dos tospovírus, além de distintos comportamentos da sua funcionalidade mediante truncamentos (deleções) das NSm estudadas. Essas diferenças podem revelar uma distinta evolução e / ou adaptação das espécies de tospovírus quanto à sua capacidade e adaptabilidade para se mover entre diferentes hospedeiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Manipulação do DNA.

O plasmídeo pUC18 foi modificado para inserção de uma construção infecciosa do cDNA3 AMV, que permitia a expressão (ensaio movimento célula à célula) ou não (ensaio de movimento sistêmico) da proteína GFP (Green fluorescent protein). Essa construção possibilitou também a inserção da CP 206 mutante, originando os cassetes funcionais pUC18-GFP-MP:A44-CP, pUC18-MP:A44:GFP-CP, pUC18-GFP-MP:A44-CP206 e pUC18-MP:A44-CP. ([Sanchez-Navarro and Bol, 2001](#); [Tenllado and Bol, 2000](#)). Sítios de *NcoI* e *NheI* foram adicionados para inserção das ORFs gênicas das proteínas de movimento (Tabela 1). As MPs dos vírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV, foram amplificadas a partir dos vetores pGEMT-Easy ([de](#)

([Oliveira et al., 2012](#); [Silva et al., 2001](#)) com primers contendo sítios enzimáticos de cortes específicos (Tabela 1 e Figura 1). No caso da MP do *Alfalfa mosaic virus* (AMV), todas as construções do cDNA AMV 3 foram desenvolvidas previamente ([Sanchez-Navarro and Bol, 2001](#)).

Tabela 1: Primers utilizados para amplificação das proteínas de movimento (MPs) de tospovírus baseado no sistema quimérico de expressão AMV RNA3.

Vector and Construct	Restriction sites	Primers sequence (5'-3')	Insert Size (pb)
Cell to Cell Movement			
pUC18-GFP-BeNMV:A44-CP	PciI NheI	SP/ BeNMV NSm 5'-AAACATGTCGAAGCTGTTGTCAAAGATCA-3' ASP/ BeNMV NSm 5'-AAAA GCTAGC TGTCATGAGTTTCAAAGGAGGGAAA-3'	954pb
pUC18-GFP-CSNV:A44-CP	BspHI NheI	SP/CSNV NSm 5'-AA TCATGA TGACACTCTTTGGTAACAAGG-3' ASP/CSNV NSm 5'-AAAA GCTAGC CACCTCATCAATAAAAGAAAGTTTA-3'	912pb
pUC18-GFP-TCSV:A44-CP	PciI NheI	SP/TCSV NSm 5'-AA ACATGT TGACATTTTCGGCAGCAAGA-3' ASP/TCSV NSm 5'-AAAA GCTAGC TATCTCGTCCACAACGAAAGTTTA-3'	912pb
pUC18-GFP-TSWV:A44-CP	PciI NheI	SP/ TSWV NSm 5'-AA ACATGT TGACTCTTTTCGGTAACAAGAGGC-3' ASP/ TSWV NSm 5'-AAAA GCTAGC TATTTTCATCAAAGGATAACTGAGC-3'	909pb
Tubule Formation			
pUC18-BeNMV:A44:GFP-CP	PciI NheI	SP/ BeNMV NSm 5'-AAACATGTCGAAGCTGTTGTCAAAGATCA-3' ASP/ BeNMV NSm 5'-AAAA GCTAGC TGTCATGAGTTTCAAAGGAGGGAAA-3'	954pb
pUC18-CSNV:A44:GFP-CP	BspHI NheI	SP/CSNV NSm 5'-AA TCATGA TGACACTCTTTGGTAACAAGG-3' ASP/CSNV NSm 5'-AAAA GCTAGC CACCTCATCAATAAAAGAAAGTTTA-3'	912pb
pUC18-TCSV:A44:GFP-CP	PciI NheI	SP/TCSV NSm 5'-AA ACATGT TGACATTTTCGGCAGCAAGA-3' ASP/TCSV NSm 5'-AAAA GCTAGC TATCTCGTCCACAACGAAAGTTTA-3'	912pb
pUC18-TSWV:A44:GFP-CP	PciI NheI	SP/ TSWV NSm 5'-AA ACATGT TGACTCTTTTCGGTAACAAGAGGC-3' ASP/ TSWV NSm 5'-AAAA GCTAGC TATTTTCATCAAAGGATAACTGAGC-3'	909pb
Systemic Movement			
pUC18-BeNMV:A44-CP	PciI NheI	SP/ BeNMV NSm 5'-AAACATGTCGAAGCTGTTGTCAAAGATCA-3' ASP/ BeNMV NSm 5'-AAAA GCTAGC TGTCATGAGTTTCAAAGGAGGGAAA-3'	954pb
pUC18-CSNV:A44-CP	BspHI NheI	SP/CSNV NSm 5'-AA TCATGA TGACACTCTTTGGTAACAAGG-3' ASP/CSNV NSm 5'-AAAA GCTAGC CACCTCATCAATAAAAGAAAGTTTA-3'	912pb
pUC18-TCSV:A44-CP	PciI NheI	SP/TCSV NSm 5'-AA ACATGT TGACATTTTCGGCAGCAAGA-3' ASP/TCSV NSm 5'-AAAA GCTAGC TATCTCGTCCACAACGAAAGTTTA-3'	912pb
pUC18-TSWV:A44-CP	PciI NheI	SP/ TSWV NSm 5'-AA ACATGT TGACTCTTTTCGGTAACAAGAGGC-3' ASP/ TSWV NSm 5'-AAAA GCTAGC TATTTTCATCAAAGGATAACTGAGC-3'	909pb
CP 206 Mutant			
pUC18-GFP-BeNMV:A44-CP206	PciI NheI	*Published	954pb
pUC18-GFP-CSNV:A44-CP206	BspHI NheI	*Published	912pb
pUC18-GFP-TCSV:A44-CP206	PciI NheI	*Published	912pb
pUC18-GFP-TSWV:A44-CP206	PciI NheI	*Published	909pb
MP Truncated			
pUC18-GFP-BeNMV295:A44-CP	PciI NheI	SP/ BeNMV 295 NSm 5'-AAACATGTCGAAGCTGTTGTCAAAGATCA-3' ASP/ BeNMV 295 NSm 5'-AAAA GCTAGC TATTGCAGCCTGCTCTAGA-3'	885pb
pUC18-GFP-BeNMV300:A44-CP	PciI NheI	SP/ BeNMV 300 NSm 5'-AAACATGTCGAAGCTGTTGTCAAAGATCA-3' ASP/ BeNMV 300 NSm 5'-AAAA GCTAGC TCATTCTCTCATCTATTGCAGC-3'	900pb
pUC18-GFP-CSNV298:A44-CP	BspHI NheI	SP/CSNV 298 NSm 5'-AA TCATGA TGACACTCTTTGGTAACAAGG-3' ASP/CSNV 298 NSm 5'-AAAA GCTAGC AGAAAGTTTAGCAATGTTCTCAGA-3'	894pb
pUC18-GFP-TCSV298:A44-CP	PciI NheI	SP/TCSV 298 NSm 5'-AA ACATGT TGACATTTTCGGCAGCAAGA-3' ASP/TCSV 298 NSm 5'-AAAA GCTAGC CGAAAGTTTAGCAATGTTATCACA-3'	894pb
pUC18-GFP-TSWV298:A44-CP	PciI NheI	SP/ TSWV 298 NSm 5'-AA ACATGT TGACTCTTTTCGGTAACAAGAGGC-3' ASP/ TSWV 298 NSm 5'-AAAA GCTAGC GGATAACTGAGCAACTGT-3'	894pb
pUC18-BeNMV295:A44-CP	PciI NheI	SP/ BeNMV 295 NSm 5'-AAACATGTCGAAGCTGTTGTCAAAGATCA-3' ASP/ BeNMV 295 NSm 5'-AAAA GCTAGC TATTGCAGCCTGCTCTAGA-3'	885pb
pUC18-BeNMV300:A44-CP	PciI NheI	SP/ BeNMV 300 NSm 5'-AAACATGTCGAAGCTGTTGTCAAAGATCA-3' ASP/ BeNMV 300 NSm 5'-AAAA GCTAGC TATTCTCTCATCTATTGCAGC-3'	900pb

Construtos quiméricos AMV RNA 3 em vetor pUC18 com a presença de GFP, sem GFP, GFP fusionado a proteína de movimento e presença da CP mutante estão demonstrados baseado nos ensaios desenvolvidos: **Cell to cell movement**, **Tubule formation**, **Systemic movement**, **CP 206 mutant** e **MP truncated**. NSm dos vírus Bean necrotic mosaic virus, *Chrysanthemum stem necrosis virus*, *Tomato chlorotic spot virus*, *Tomato spotted wilt virus* wt e NSm truncadas (BeNMV 295, BeNMV 300, CSNV 298, TCSV 298 and TSWV 298) estão demonstradas. SP: senso primer, ASP: anti senso primer. PciI, BspHI e NheI correspondem aos sítios de restrição. Sequências em negrito e sublinhadas correspondem aos sítios de restrição adicionados por primers. Tamanho do produto amplificado é demonstrado em pares de base (pb). * corresponde ao primer publicado por ([Tenllado and Bol, 2000](#)).

Construções: movimento célula à célula e movimento sistêmico.

Para o ensaio de movimento célula à célula, as NSm dos vírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV foram clonados na construção quimérica RNA 3 AMV (pUC18-GFP-MP:A44-CP) previamente digeridas com as enzimas *NcoI/NheI* (ThermoScientific™) e os insertos ligados com os respectivos sítios (Tabela 1 e Figura 1). Para o ensaio de movimento sistêmico, as mesmas NSm foram clonadas na construção (pUC18-MP:A44-CP), também previamente digerida com *NcoI/NheI* (Figura 1).

Construções: CP 206.

Para as construções quiméricas pUC18-GFP-MP:A44-CP206, vetores contendo as NSm dos tospovírus em estudo (pUC18-GFP-BeNMV:A44-CP, pUC18-GFP-CSNV:A44-CP, pUC18-GFP-TCSV:A44-CP, pUC18-GFP-TSWV:A44-CP, pUC18-GFP-AMV:A44-CP), foram modificados para expressão da CP 206 mutante ([Tenllado and Bol, 2000](#)). A introdução da correspondente CP mutante foi realizada pela troca da CP wt por uma CP 206 mutante, através de sítios de clivagem *NheI/PstI*

Deleções das MPs.

As proteínas de movimento dos vírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV deletadas foram amplificadas com primers específicos contendo sítios de clivagem *PciI*, *BspHI* e *NheI*, como especificado na Tabela 1. As NSm foram truncadas inicialmente, a partir do aminoácido 273. A região inicial de truncamento foi escolhida baseada no domínio ativo caracterizado para as proteínas de movimento da família *Bromoviridae* ([Carmen Herranz et al., 2005](#); [Herranz and Pallas, 2004](#); [Schoumacher et al., 1994](#); [Vaquero et al., 1997](#)). As deleções de 3 em 3 aminoácidos se estenderam do aminoácido 273 até o 300 para a NSm do vírus BeNMV e 286 até 298 para as NSm dos vírus CSNV, TCSV e TSWV. Após amplificação, fenolização e digestão ([Sambrook, 1989](#)), as MPs truncadas foram inseridas por ligação (T4 DNA ligase Invitrogen™) nas construções quiméricas do cDNA3 AMV (pUC18-MP:A44-CP e pUC18-MP:A44:GFP-CP), (Figura 1).

Construções para formação de túbulos.

As MPs dos tospovírus contendo os sítios *PciI*, *BspHI*, *NcoI* e *NheI* (Tabela 1, Figura 1), foram clonadas na construção pUC18-MP:A44:GFP-CP, previamente

digerida com *NcoI/NheI* (TermoScientific™). Este vetor permite a fusão da GFP com o extremo C-terminal das MPs. Com a finalidade de comparação da expressão mais eficiente, a GFP também foi clonada no N-terminal, usando a construção (pUC18-GFP:MP:CP-A44) ([Sanchez-Navarro and Bol, 2001](#)).

Inoculação de plantas P12 e transfecção de protoplastos.

Plasmídeos contendo as MPs tipo selvagem BeNMV wt, CSNV wt, TCSV wt e TSWV wt e os mutantes truncados BeNMV 295, BeNMV 300, CSNV 298, TCSV 298 e TSWV 298, foram linearizados com *PstI* e transcritos com T7 RNA polymerase (Takara™). Plantas P12 foram crescidas e inoculadas com transcritos quiméricos de RNA, como previamente descrito por ([Taschner et al., 1991](#)). A mensuração do diâmetro do focil de infecção foi realizado usando o programa ImageJ 1.46r, National Institute of Health, USA. O avanço da infecção foi calculado com base na média obtida de um total de aproximadamente 40 focos avaliados, a partir de cada construção inoculada. As imagens foram obtidas com auxílio de lupa Leica M165C model, dois e três dias pós a inoculação (dpi.).

Os protoplastos foram extraídos, a partir de plantas de *Nicotiana tabaccum* transgênicas que produzem a RNA polimerase viral mediante a expressão das proteínas P1 e P2 do AMV, P12 plantas ([van Dun et al., 1988](#)) e 2.5×10^5 protoplastos foram inoculados pelo método de polietilenoglicol ([Loesch-Fries et al., 1985](#)) com 20 µg da mistura de transcrição. Plantas P12 foram cultivadas e inoculadas com os transcritos de RNA, conforme descrito previamente ([Taschner et al., 1991](#)). A expressão da GFP em plantas foi analisada com microscópio Leica TCS SL confocal de varredura a laser (Leica), com excitação a 488 nm e emissão de 510-560 nm.

Tissue printing e Northern blot.

RNA total foi extraído de folhas de plantas P12, 15 dpi. e de protoplastos transfectados 24 h pós inoculação (hpi.), usando reagente Trizol (Invitrogen™), como descrito previamente por ([Sambrook, 1989](#)). Os RNAs foram aplicados em gel desnaturante de formaldeído, separados por eletroforese e transferidos para membrana de nylon positivamente carregada (Roche Mannheim, Germany). Valores de porcentagem da concentração relativa da infecção sistêmica foram obtidos com auxílio do programa ImageQuant TL Versão 8.1.0.0. Taxas de concentração do RNA 3 e RNA 4 das folhas inoculadas (I), sistêmica (S4) e sistêmica (S7), foram realizadas,

tendo como valor de referência, as bandas marcadas do controle AMV em uma análise individualizada e/ou agrupadas entre os tratamentos. Ex: Folhas inoculadas foram mensuradas com base no valor de referência do RNA AMV da folha inoculada (I), o mesmo para as folhas S4 e S7.

Para o “Tissue Printing”, foram feitas seções transversais do pecíolo das folhas inoculadas e sistêmicas de plantas P12. Dots foram feitos em membrana de nylon, a partir dos pecíolos seccionados, a membrana foi colocada a 65°C por 5 minutos até sua secagem. Os RNAs foram fixados em membrana com auxílio da UV (cross-linker -700 x100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$). A hibridização e a detecção foram conduzidas como descrito por [Pallas et al., \(1998\)](#), usando sonda complementar a região 3’UTR AMV.

A idade de crescimento da planta é indicada, a partir das folhas inoculadas (I), correspondendo as folhas da base da planta (I1 e I2), seguindo para as folhas do ápice, denominadas sistêmicas (S). Infecção sistêmica foi monitorada a partir das folhas S3 até a folha do ápice da planta, correspondente a S11

Western blot.

Proteínas totais foram extraídas de protoplastos inoculados com as construções quiméricas com GFP contendo as MPs: BeNMVwt, BeNMV295, BeNMV 300, CSNVwt, CSNV 298, TCSVwt, TCSV 298, TSWVwt e TSWV 298. A extração foi realizada como previamente descrito por [Berger, \(1987\)](#). Proteínas foram separadas por 12% SDS PAGE e transferidas para membranas de polyvinylidene difluoride, seguindo recomendações do fabricante (Amersham). As membranas foram bloqueadas em tampão TBS 1X (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, pH de 7.4.) contendo 5% de leite e incubadas por 1 hora. Posteriormente três lavagens foram feitas para retirar o excesso de leite da solução bloqueadora. As membranas foram novamente mergulhadas em tampão TBS 1X com 2,5 % de leite e contendo anticorpo anti-GFP (Sigma, diluição 1:10.000) e incubadas por 1h. Novas lavagens foram feitas, e por fim, foi adicionado o anticorpo secundário anti-mouse (SigmaTM, diluição 1:10.000). A detecção foi feita por quimioluminescência de acordo com as recomendações do fabricante (Amersham).

Ensaio de Bimolecular fluorescence complementation (BiFC).

Associação entre proteína do nucleocapsídeo (N) e proteína de movimento

NSm Wt/ou truncada foi realizado com a metodologia de BiFC ([Aparicio et al., 2006](#)). Para os ensaios de interação *in vivo*, o NtYFP e CtYFP foram fusionadas ao extremo C e N terminal das proteínas N e NSm. O indicado par de proteínas foram transientemente expressas em plantas de *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltração. Para tanto, culturas ($OD_{600}=0,4$) de *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58) transformadas com o correspondente vetor binário pMOG800, foram usadas para infiltração de plantas como descrito previamente por [Genovés et al., \(2011\)](#). As plantas foram mantidas a temperatura de 24°C/dia, 18°C/noite, com 16 h/dia e 8 h/noite correspondentes ao fotoperíodo. A reconstituição da fluorescência foi monitorada aos 4dpi. com auxílio do microscópio confocal TCS Leica ($\lambda_{exc} = 488$ nm; $\lambda_{em} = 500-550$ nm).

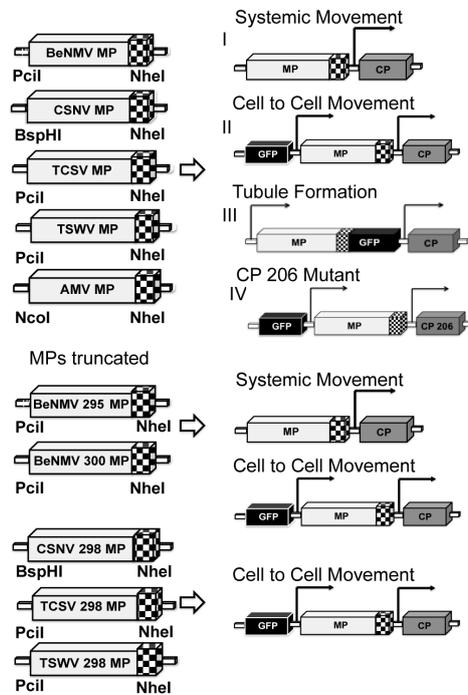


Figura 1: Representação esquemática da construção quimérica AMV RNA 3 para os ensaios de movimento célula a célula, movimento sistêmico, formação de túbulos e mutante CP 206. Box em preto representa a proteína GFP (Green fluorescent protein), box branco a MP (Movement Protein) e em cinza a CP (Coat Protein). Box quadriculado representa a adição de 44 aminoácidos da MP do AMV. *PciI*, *BspHI* e *NheI* representam sítios de restrição adicionados às respectivas MPs. Setas correspondem aos promotores independentes para MP e CP. I, II, III e IV correspondem às construções quiméricas pUC18-MP:A44-CP, pUC18-GFP-MP:A44-CP, pUC18-MP:A44:GFP-CP e pUC18-GFP-MP:A44-CP206, respectivamente. MPs wt dos vírus Bean necrotic mosaic virus, *Chrysanthemum stem necrosis virus*, *Tomato chlorotic spot virus*, *Tomato spotted wilt virus* e MPs truncadas (BeNMV 295, BeNMV 300, CSNV 298, TCSV 298 e TSWV 298) estão indicadas.

RESULTADOS

Possível influência de distintas NSm dos tospovírus com o espectro de infecção viral.

A fim de avaliar o envolvimento das NSm no movimento célula à célula e sistêmico, as NSm dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV foram clonadas nos vetores quiméricos RNA3 AMV como descrito nos Materiais e Métodos. Transcrições, *in vitro*, das construções foram feitas e plantas P12 transgênicas foram inoculadas com esses transcritos. No ensaio de movimento célula à célula (Figura 2A), observou-se claramente a formação de focais de infecção, demonstrando a funcionalidade das distintas MPs no sistema de movimento do AMV. Desses focais foram feitas medições das áreas de infecção a 2 e 3 dpi. A partir das médias obtidas, observou-se diferenças no comportamento do movimento célula à célula. Nas médias da primeira medição, foi observada uma pequena diferença na taxa de movimento entre as MPs virais, onde, a NSm do TSWV seguido do BeNMV, os quais apresentaram uma taxa de movimentação maior, atingindo aproximadamente a 5 μm de área média de focil (Figura 2A, Gráfico). A média de área de focil com base nas NSm dos vírus BeNMV e TSWV chegaram a aproximadamente 18 μm na segunda medição (3dpi.), demonstrando uma maior eficiência na infecção comparado com os demais tospovírus estudados e o controle AMV (Figura 2A).

Para avaliar a diferença na eficiência do movimento sistêmico, plantas P12 foram inoculadas com transcritos quiméricos do RNA3 AMV (pUC18-MP:A44-CP), (Figura 1), contendo as diferentes MPs dos tospovírus. Pecíolos seccionados (15 dpi.), das folhas inoculadas e sistêmicas foram pressionados em membrana de nylon e RNA foi extraído para quantificação relativa via Northern blot. (Figura 2B). No movimento sistêmico foi claramente observado uma alta eficiência do movimento viral nas construções contendo as MPs do TSWV e TCSV, similar àquela observada na construção AMV wt, com detecção de RNA infectado a partir das folhas inoculadas até a folha sistêmica S11 (Figura 2B, Tissue print). Nas construções contendo a MP do CSNV, foi observada uma menor eficiência em comparação ao TSWV e TCSV, mas não uma redução drástica como a observada para a construção contendo a MP do BeNMV, para o qual RNA infectado foi observado somente até a folha S5 (Figura 2B, Tissue print).

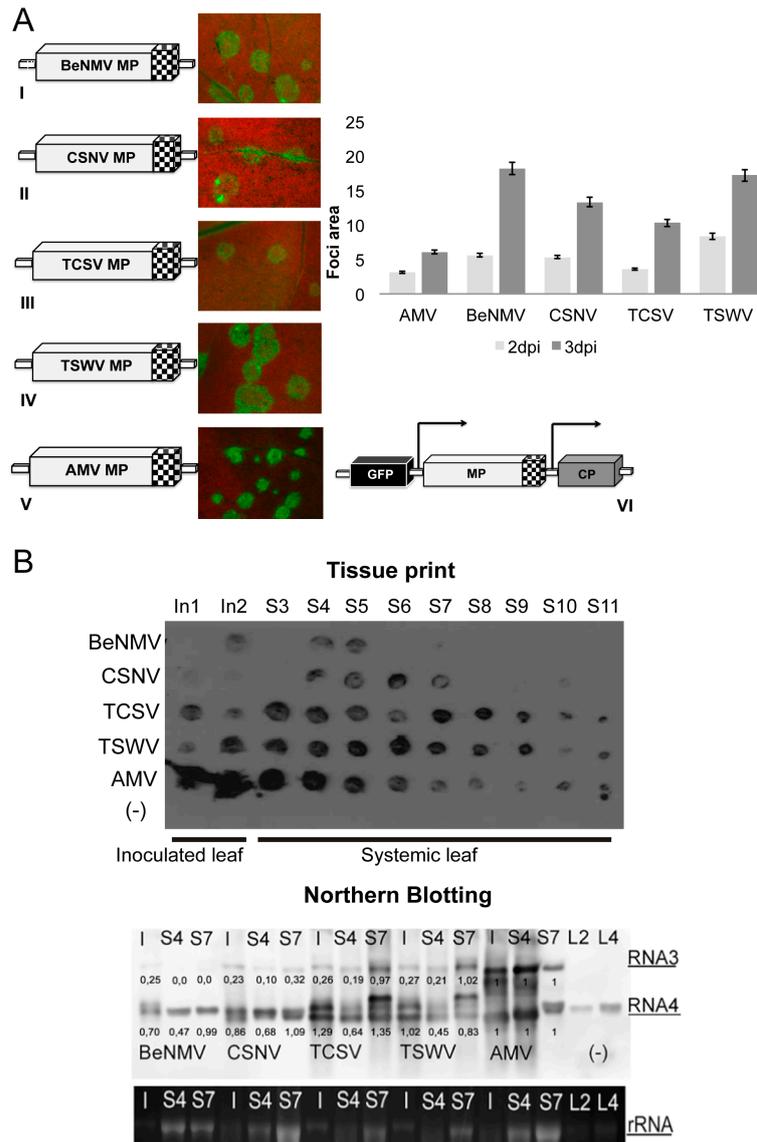


Figura 2: Análise do transporte célula à célula e sistêmico de híbridos AMV RNA 3 (*Alfalfa mosaic virus*) contendo proteínas de movimento (MPs) de diferentes espécies de tospovírus. MPs heterólogas são correspondentes aos vírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). MP do vírus *Alfalfa mosaic virus* (AMV) também está demonstrada. **A)** Esquema representativo da construção GFP-N^Sm:A44-CP (VI) derivado a partir da inserção das MPs BeNMV (I) CSNV (II) TCSV (III), TSWV (IV) e AMV (V). Imagens à direita, correspondem as figuras de focais de infecção observadas em folhas de plantas P12 inoculadas. Fluorescência foi monitorada com auxílio de lupa 2 e 3 dpi. Barra 200 µm. Gráfico apresenta a média da área de 40 focais independentes resultantes da inoculação de transcritos originários das construções em (A). Barras em cinza claro correspondem a medição de 2 dpi e barras em cinza escuro correspondem a medição a 3 dpi. Erro padrão representado, SD. Área de focais apresentado em µm. **B)** “Tissue printing” da secção transversal de pecíolos derivados de plantas P12 inoculadas com as construções AMV RNA 3 contendo as MPs dos tospovírus e wt AMV. (-) corresponde ao controle negativo. As duas folhas inoculadas (In1 e In2) e todas as sistêmicas avaliadas (S3 até S11) foram hibridizadas com sonda complementar a região 3’UTR do RNA3 do AMV, 15 dpi. Northern Blot de plantas P12 inoculadas com transcritos de RNA a partir de quiméricas construções de

AMV RNAs contendo as MPs dos tospovírus e AMV wt. O RNA foi hibridizado com sondas complementares à região 3'UTR do RNA3 AMV. A posição dos quiméricos RNA 3 e RNA 4 está indicada na margem direita. I, S4 e S7 representam RNA extraído das folhas: inoculadas, sistêmica 4 e sistêmica 7, respectivamente. L2 e L4 correspondem as folhas 2 e 4 de plantas não inoculadas (controle negativo). Números abaixo das bandas do RNA 3 e RNA 4 representam a quantificação relativa de bandas baseado no controle (AMV). O rRNA é apresentado e indica a quantidade relativa das amostras aplicadas no gel.

Para quantificação relativa da infecção do AMV com base nas construções contendo as MPs dos tospovírus e AMV wt, foi realizado um “Northern blot” a partir do RNA extraído de uma das folhas inoculadas (I) e das folhas sistêmicas (S4 e S7) (Figura 2B, Northern blot). Observou-se claramente a detecção da banda correspondente ao RNA3 em todas as folhas inoculadas (I) com valores de concentração relativa das bandas referentes ao controle AMV, de 25% para o BeNMV, 23% para CSNV, 26% para TCSV e 27 % para o TSWV, AMV representa 100 % (Figura 2B, Northern blot). No entanto, quando feita a avaliação das folhas sistêmicas (S4 a S7), não foi observado marcação do RNA 3 para o BeNMV (Figura 2B, Northern blot). Nas construções contendo as MPs do CSNV, TCSV, TSWV e do controle AMV, foi possível a visualização de bandas com concentrações relativas de 10% (CSNV), 19% (TCSV), 21% (TSWV) e 100% (AMV) para as folhas S4 e valores de 32% (CSNV), 97 % (TCSV), 102% (TSWV) e 100% (AMV) para as folhas S7 (Figura 2B, Northern blot). O RNA 4 que representa o RNA subgenômico da CP ([Pallas et al., 1998](#)) foi observada a marcação de banda em todas as amostras com taxa de concentração relativa variando de 45% até 135% (Figura 2B, Northern blot). As quantidades relativas das amostras aplicadas no gel (rRNAs) estão indicadas na Figura 2B.

Movimentação célula à célula do gênero *Tospovirus* é dependente da formação de vírions no contexto AMV de infecção.

Atualmente duas hipóteses de movimento viral são bastante discutidas, movimentação dependente da associação da proteína de movimento com RNA ou a partir da associação da MP com o nucleocapsídeo ([Benitez-Alfonso et al., 2010](#); [Niehl and Heinlein, 2011](#); [Scholthof, 2005](#); [Taliensky et al., 2008](#)). Para testar, *in vivo*, o tipo de maquinaria utilizada pelas MPs dos tospovírus para a movimentação viral, as NSm dos vírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV foram inseridas na construção quimérica RNA 3 AMV (pUC18-GFP-MP:A44-CP wt) e (pUC18-GFP-MP:A44-CP

206), (Figura 1). Inicialmente para testar a eficiência de infecção de células individuais com construtos CP 206, protoplastos foram inoculados e a infecção foi monitorada pela expressão de GFP (Figura 3A, Imagem de protoplastos). A análise via Northern blot confirmou a presença de RNA 3 e do subgenômico RNA 4, baseado no transcrito subgenômico da GFP (Figura 3A, Northern blot). As quantidades relativas das amostras aplicadas no gel (rRNAs) estão indicadas.

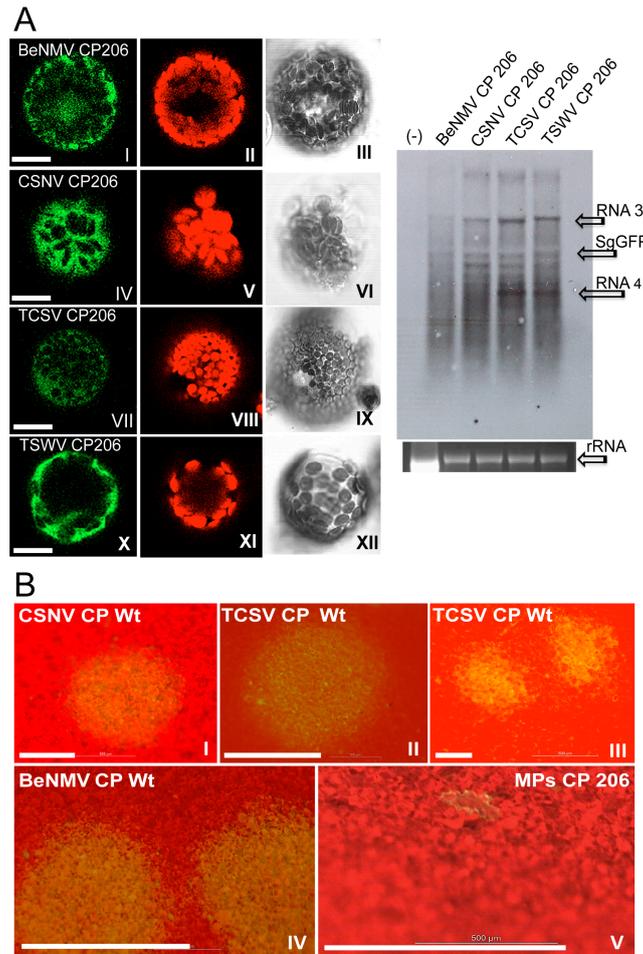


Figura 3: Análise de infecção e movimento célula à célula, a partir da construção pUC18-GFP-MP:A44-CP206 (Tenllado and Bol, 2000). **A)** Protoplastos de plantas P12 transgênicas transfetadas com a construção pUC18-GFP-MP:A44-CP206 contendo as MPs dos tospovírus Bean necrotic mosaic virus, *Chrysanthemum stem necrosis virus*, *Tomato chlorotic spot virus* e *Tomato spotted wilt virus*, 24 hpi. Painéis I, IV, VII e X correspondem a fluorescência de GFP difusa pela célula, painéis II, V, VIII e XI, correspondem a auto fluorescência de cloroplasto e III, VI, IX, e XII campo claro. Barras em branco estão demonstradas na porção inferior esquerda da figura, 50 μ m. A direita da figura é demonstrado Northern blot de protoplastos P12 transfetados com transcritos de RNA das construções quiméricas do AMV RNAs CP 206 contendo as MPs dos tospovírus. O RNA foi hibridizado com sondas complementares a região 3'UTR do RNA3 AMV. A posição dos quiméricos RNA 3, RNA 4 e subgenômico GFP estão indicados pela seta na margem direita. Os rRNAs indicam a equivalência relativa de amostras aplicadas em gel de agarose. **B)** Imagens de

foceis de infecção em folhas de planta P12 visualizadas a 2 dpi. I) Focil de infecção da construção pUC18-GFP-MPCSNV:A44 CP (CP wt), II) pUC18-GFP-MPTCSV:A44-CP (CP wt), III) pUC18-GFP-MPTSWV:A44-CP (CP wt), IV) pUC18-GFP-MPBeNMV:A44-CP (wt CP) e V) imagem individual representa infecção de uma única célula a partir das construções dos mutantes pUC18-GFP-MPBeNMV:A44-CP206, pUC18-GFP-MPCSNV:A44-CP206, pUC18-GFP-MPTCSV:A44-CP206, pUC18-GFP-MPTSWV:A44-CP206. Barras variam de 0.2 mm a 2 mm. Imagens obtidas com auxílio de lupa Leica M165C model.

Após confirmar a eficiência dos clones foi feita a transcrição *in vitro* e a inoculação de plantas P12 (Figura 3B) e avaliado a formação de focais em folhas de planta P12 a 3dpi. Em todas as construções que continham a CP Wt, observou-se claramente a formação de focais caracterizando a movimentação viral célula à célula (Figura 3B, painéis I, II, III e IV). No entanto, quando as MPs estavam clonadas nas construções contendo a CP 206 ([Sanchez-Navarro et al., 2001](#); [Tenllado and Bol, 2000](#)), apenas foi observada a infecção de células individuais (Figura 3B, frame V).

O extremo C-terminal da MP do BeNMV não é essencial para o movimento célula à célula.

BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV MPs foram clonadas na construção quimérica do RNA 3 AMV (pUC18-MP:A44:GFP-CP), (Figura 1). Transcrição do RNA 3 foi feita e protoplastos obtidos a partir de plantas transgênicas P12 foram inoculados. A formação de túbulos foi visualizada 24 hpi. em microscópio confocal, onde claramente observou-se túbulos em todas as MPs testadas (Figura 4). Este resultado forneceu a base biológica para ensaios subsequentes de análise de truncamento das MPs, no intuito de identificar motivos ativos envolvidos com movimentação e associação entre NSm e N (proteína do nucleocapsídeo) das distintas NSm dos tospovírus em estudo.

A fim de identificar domínios das NSm envolvidos com a movimentação viral, deleções sequenciais do extremo C-terminal das MPs dos tospovírus foram realizadas. A NSm do BeNMV foi utilizada como experimento piloto do ensaio devido a sua eficiência em gerar o movimento célula à célula (Figura 2A) e por ter apresentado uma maior quantidade de túbulos em protoplastos infectados (dados não apresentados).

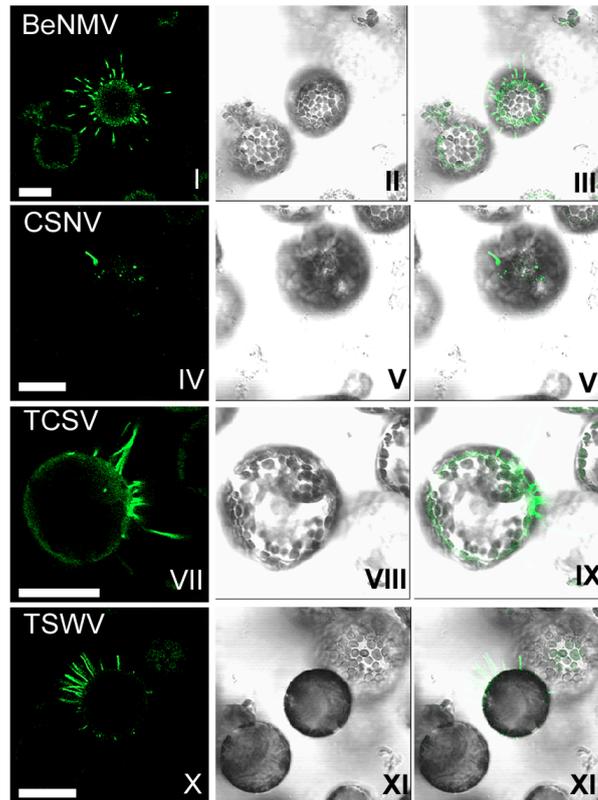


Figura 4: Análise de formação de túbulos induzidos por MPs de distintos tospovírus. Protoplastos obtidos de plantas transgênicas P12 (van Dun et al., 1988) transfetadas com construtos do RNA 3 contendo as MPs dos vírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Visualização em microscópio confocal, 24 hpi. I, IV, VII e X) Fluorescência de GFP fusionada ao C-terminal da proteína de movimento dos tospovírus. II, V, VIII e XI) campo claro. III, VI, IX e XII) sobreposição das imagens. Na parte inferior das imagens são indicadas as barras correspondente a 50 μm .

Os segmentos truncados das MPs iniciados a partir do aminoácido 273 até o 300 foram clonados nas construções (pUC18-GFP-MP:A44-CP) para avaliação do movimento célula à célula, com base na formação de focais. As deleções feitas com a remoção inicial de 45 e 42 aminoácidos do C-terminal da MP (BeNMV 273 e BeNMV 276, Figura 5A), impossibilitaram a movimentação viral apresentando apenas infecção de células individuais (dados não apresentados). Deleções subsequentes foram feitas até que se atingisse o limite de aminoácidos que pudessem ser removidos do C-terminal da NSm sem afetar o movimento viral (Figura 5A). A construção BeNMV 295 que corresponde a remoção de 23 aminoácidos da NSm (Figura 5A) impossibilitou a movimentação viral, similar ao resultado observado nas

deleções 273 e 276 com visualização apenas de células individuais infectadas (Figura 5B, painel I, Loupe Image).

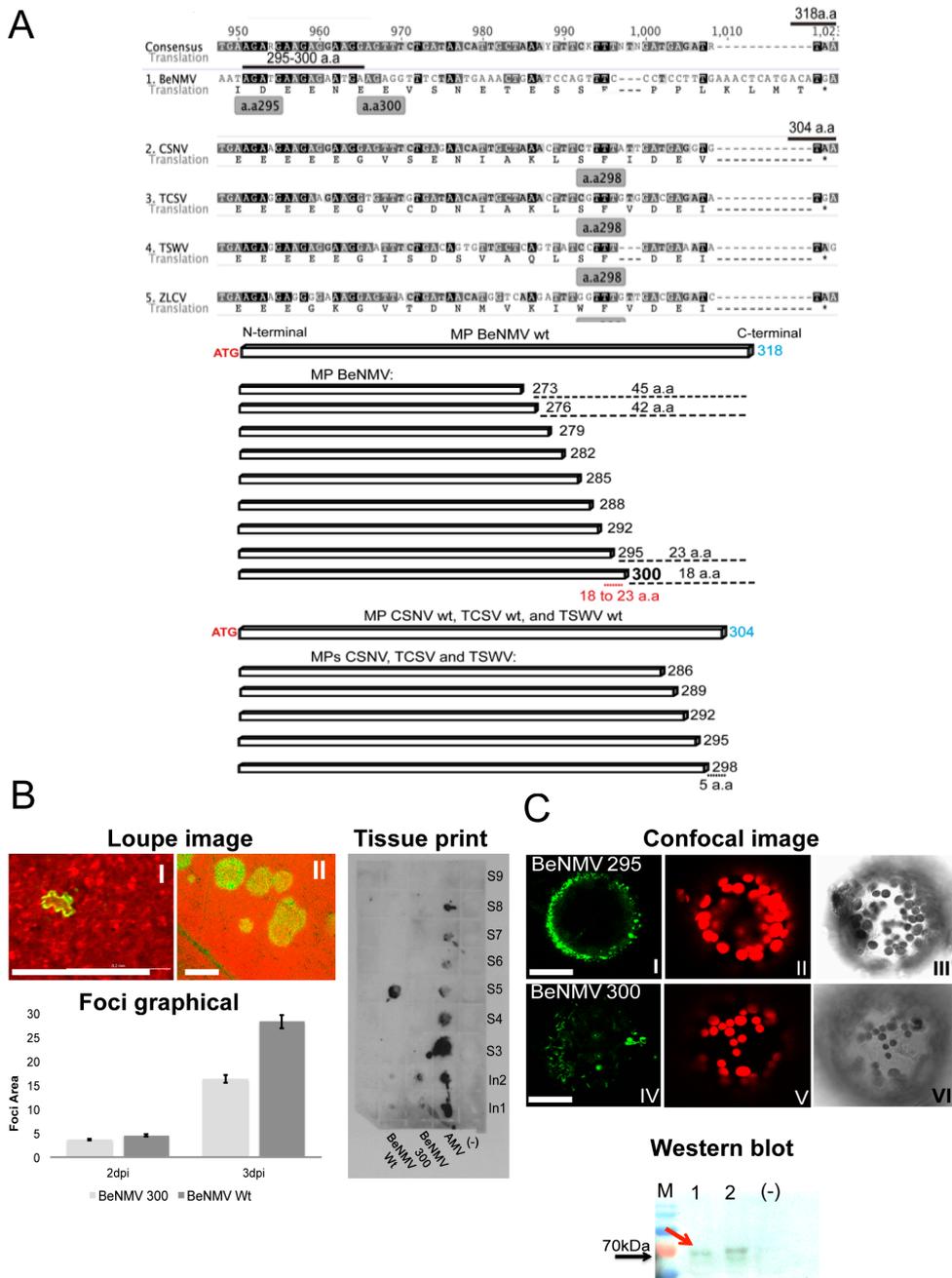


Figura 5. Análise de deleção do extremo C-terminal das MPs dos tospovírus. A) Alinhamento da proteína N^Sm de tospovírus do novo mundo, a qual revela regiões do extremo C-terminal truncado, além do esquema de deleções realizado. Alinhamento das proteínas dos vírus Bean necrotic mosaic virus (YP_006468901.1), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (AAK84656.1), *Tomato chlorotic spot virus* (AAK84655.1), *Tomato spotted wilt virus* (AEN94893.1) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (AAK84652.1) com auxílio do programa Geneious ® 7.0.3. Números acima da região consenso representam a base de nucleotídeos correspondentes da N^Sm. Acrônimos listados a esquerda da figura representam os nomes dos vírus seguidos à direita pelas bases de nucleotídeos e abaixo, os aminoácidos

traduzidos. Box cinza: a.a 295, a.a 298 e a.a 300 representam limites truncados de regiões evidenciadas por linhas pretas acompanhadas de letras e números 295-300 a.a. O 318 a.a corresponde ao códon de parada do vírus BeNMV e o 304 a.a para os vírus CSNV, TCSV, TSWV e ZLCV. Barras lineares em negro correspondem ao esquema da proteína NSm wt e truncada. **ATG** corresponde a metionina inicial e **304** e **318** aos códons de parada. Números 273, 276, 279, 282, 285, 288, 292, 295 e 300 correspondem a terminação da NSm do vírus BeNMV após truncamento. Números 286, 289, 292, 295, e 298 correspondem a terminação da NSm dos vírus CSNV, TCSV e TSWV após truncamentos. Linhas pontilhadas em preto representam os aminoácidos deletados a partir do extremo C-terminal das MPs (45 a.a, 42 a.a, 23 a.a, 18 a.a and 5 a.a). Linhas pontilhadas em vermelho representam os aminoácidos essenciais para a movimentação do vírus BeNMV (a partir do aminoácido **300** e englobando os demais aminoácidos da região entre **18 até 23**). **B**) Ensaio de movimento cél e sistêmico a partir de plantas P12 inoculadas com os transcritos das construções BeNMV 295, BeNMV 300, BeNMV wt e AMV. Imagem via lupa microscópio I) célula individual infectada com a construção pUC18-GFP-MPBeNMV295:A44-CP, barra 2 mm, II) focil de infecção obtido para a construção pUC18-GFP-MPBeNMV300:A44-CP, barra 0.2 mm. Gráfico representa média de área de aproximadamente 40 focéis independentes resultantes a partir de transcritos obtidos das construções pUC18-GFP-MPBeNMV300:A44-CP e pUC18-GFP-MPBeNMV:A44-CP. Colunas em cinza claro corresponde a medição 2dpi e colunas em cinza escuro 3dpi. Barra de erro representa o desvio padrão (SD). Área do focil está apresentada em μm . “Tissue printing” de secção transversal do pecíolo de plantas P12 inoculadas com construção do AMV RNA 3 contendo as MPs BeNMV wt, BeNMV 300 e AMV wt. As folhas inoculadas (In1 e In2) e as sistêmicas (S3 até S9) foram hibridizadas com sonda complementar a região 3 UTR do AMV RNA 3, 15 dpi. **C**) Análise de formação de tubo a partir da inoculação de transcritos pUC18-BeNMV 295:A44:GFP-CP e pUC18-BeNMV300:A44:GFP-CP. Protoplastos obtidos de planta transgênica P12 transfetados com as construções listadas acima. Visualização em microscópio confocal 24 hpi. Painéis I e IV) fluorescência de GFP fusionada a MP BeNMV 295 e BeNMV 300, sem formação de túbulos e com túbulos encurtados, respectivamente. Painéis II e V) Fluorescência de Cloroplasto. Painéis III e VI) campo claro. Barra **50 μm** . Western blot de protoplastos inoculados com as construções pUC18-BeNMV295:A44:GFP-CP e pUC18-BeNMV300:A44:GFP-CP. Setas em vermelho correspondem a banda de aproximadamente 60kDa resultante da fusão NSm-GFP. Marcação com anticorpo monoclonal anti-GFP. Marcador PageRuler™ prestained protein ladder (Thermo scientific™).

No entanto, com a construção BeNMV 300 (Figura 5A) que corresponde a remoção de 18 aminoácidos do extremo C-terminal, foi observado movimentação viral, a partir da visualização de focéis da infecção (Figura 5B, Painel II. Loupe image). Esses resultados demonstraram que os aminoácidos presentes na região entre 295 e 300 do extremo C-terminal da MPs do BeNMV, são essenciais para geração do movimento.

Para avaliar se a remoção de 18 aminoácidos do extremo C-terminal da MP do BeNMV reduziria a eficiência do movimento viral, um comparativo com a MP BeNMV Wt foi realizado, com medição de focéis de infecção 2 e 3 dpi. Foi observado que a deleção dos 18 aminoácidos terminais restringiu a movimentação (Figura 5B) apresentando uma redução na área de focéis formada a 3 dpi. O BeNMV Wt apresentou uma área de infecção de aproximadamente 30 μm , enquanto, o

BeNMV 300, apresentou uma área de aproximadamente 20 μm (Figura 5B, Foci graphical).

Uma redução no tamanho dos túbulos também foi observada, a partir da inoculação de protoplastos com a construção pUC18-BeNMV300:A44:GFP-CP (Figura 5C, frame IV, Confocal image) em comparação com a BeNMV wt (Figura 4). Protoplastos foram inoculados com a construção BeNMV 295 (pUC18-BeNMV295:A44:GFP-CP), onde pôde ser observada inibição completa na formação de túbulos (Figura 5C, painel I. Confocal image), demonstrando que os 5 aminoácidos adicionais na construção BeNMV 300 são essenciais para a movimentação. Western blot dos protoplastos inoculados com as construções BeNMV 295 e 300 confirmou o resultado da expressão da GFP associado às proteínas truncadas, no qual é observado a marcação de bandas referentes a MPs truncadas fusionadas a GFP (Figura C, Western blot).

Para avaliar se o movimento sistêmico também seria afetado, a construção BeNMV 300 (pUC18-BeNMV300:A44-CP) foi testada. Transcritos foram inoculados em folhas de *N. tabacum* P12. Tissue printing, a partir da secção transversal do pecíolo das folhas inoculadas e sistêmicas foi realizado 15 dpi. BeNMV 300, não garantiu a movimentação sistêmica, em contra partida, BeNMV Wt movimentou-se sistemicamente com a marcação da folha sistêmica S5 (Figura 5 B, Tissue print). Esses resultados demonstraram que para o movimento célula à célula, a remoção de 18 aminoácidos do extremo C-terminal da MP do BeNMV, não inibiu a movimentação viral a partir da utilização do sistema AMV (Figura 5B, painel II. Loupe image). No entanto, reduziu a eficiência no movimento célula à célula, provavelmente por uma redução no tamanho dos túbulos formados (Figura 5C, Painel IV) impossibilitando o movimento sistêmico.

As NSm dos vírus CSNV, TCSV e TSWV requerem a MP completa para o movimento célula à célula.

Alinhamento múltiplo de aminoácidos das MPs dos vírus BeNMV, CSNV, TCSV, TSWV e ZLCV foi feito com base na identificação do motivo 300 responsável por garantir a movimentação a partir da MP do vírus BeNMV (Figura 5A). Identificada a região homóloga entre a MP do BeNMV aminoácido 300 com a demais MPs, a partir dessa região, truncamentos foram feitos para todas as demais MPs correspondentes aos aminoácidos 286 e 289, representando a remoção de 18 e 15

aminoácidos do extremo C-terminal da MP dos vírus CSNV, TCSV e TSWV (Figura 5A). Apenas a infecção de células individuais foi observada nas plantas P12, 2 dpi. (dados não mostrados). Esse resultado indicou que para as MPs dos vírus CSNV, TCSV e TSWV, a região homóloga a MP do BeNMV não corresponde ao mesmo motivo envolvido na movimentação viral. Baseado nesse resultado, novos truncamentos foram feitos até o limite do aminoácido 298, restando apenas 5 aminoácidos para o final das MPs. Novas plantas P12 foram inoculadas com transcritos obtidos dessas construções e novamente observou-se apenas células individuais infectadas (Figura 6A).

Protoplastos obtidos de plantas P12 foram também inoculados com as construções CSNV 298 MP, TCSV 298 MP e TSWV 298 MP inseridas no vetor pUC18-MP:A44:GFP-CP e claramente observou-se a inibição na formação de túbulos (Figura 6B). O resultado demonstrou que para essas MPs a presença do extremo C-terminal completo é essencial para a movimentação viral.

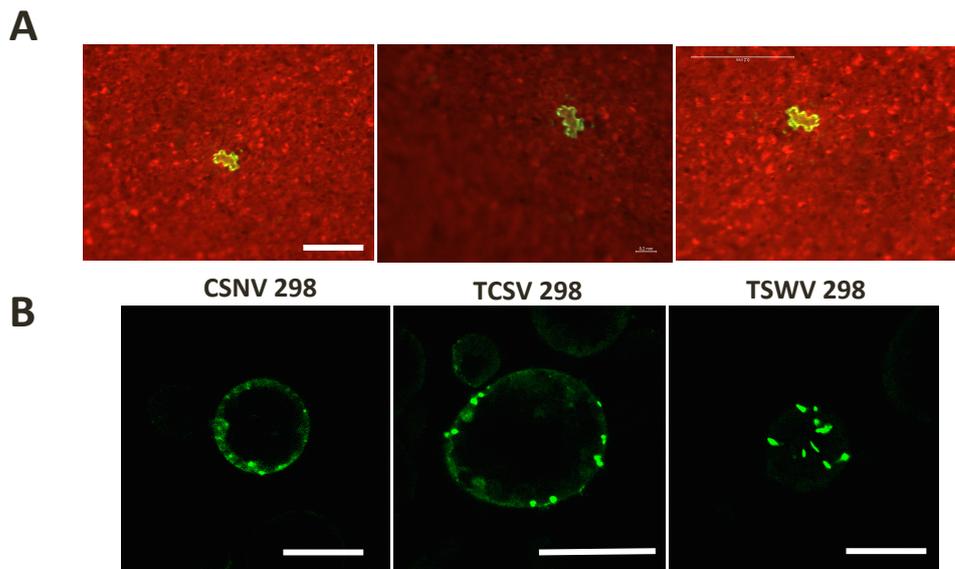


Figura 6. Ensaio de truncamento das proteínas de movimento (MPs) de tospovírus. A) Imagens da infecção de células individuais em folhas de planta P12 visualizadas a 2 dpi, a partir das construções AMV RNA3 expressando as NSm truncadas (298) do vírus *Chrysanthemum stem necrosis virus*, *Tomato chlorotic spot virus*, *Tomato spotted wilt virus*. Barra corresponde a 200 μ m **B)** Imagem de microscopia confocal de protoplastos transfetados com as construções CSNV, TCSV e TSWV 298 a 24 hpt. Barras correspondem a 50 μ m.

Influência do C-terminal da NSm na interação entre proteína NSm e a proteína N homóloga.

Estudos anteriores de MPs atribuídas à família 30K, apontaram para um comportamento conservado entre as proteínas de movimento, uma vez que para a maioria das MPs estudadas, o N-terminal se mostrou necessário para permitir o transporte viral, e que na porção C-terminal estão contidos os determinantes específicos de interação com a CP (capa protéica) (Aparicio et al., 2010; Codoner et al., 2006). Visando avaliar se a região C-terminal da NSm dos tospovírus é requerida para associação com proteína N, uma vez conhecendo-se que a ausência do C-terminal da MP do BeNMV ainda permite a movimentação viral (sessão anterior), foi realizado através de ensaios de BiFC, a análise da capacidade de interação da BeNMV

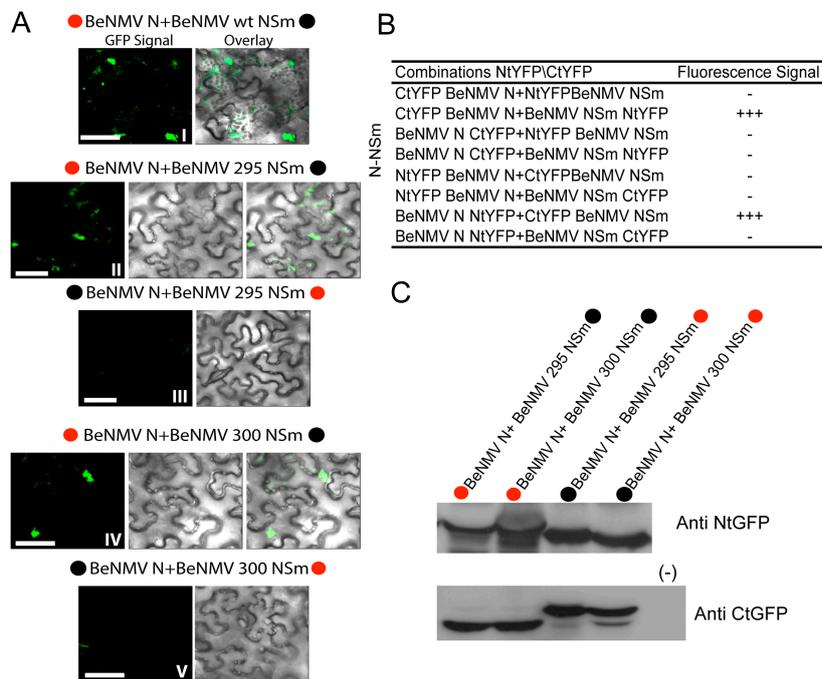


Figura 7. Ensaio BiFC de interação entre as proteínas NSm e N do BeNMV. A proteína N e/ou NSm carregando fragmentos do N-terminal (●) ou C terminal (●) da YFP fusionada ao seu N- (●/●-NSm; ●/●-NP) ou C-terminal (NSm-●/●; NP-●/●), foram co-expressas transientemente em folhas de *N.benthamiana* por agroinfiltração. A) Imagens de microscópio confocal correspondem às diferentes combinações de proteínas de fusão testadas para a BeNMV Nm (wt, 295 e 300) em interações com BeNMV N. B) Tabela sumariza análise de interação, onde os símbolos -, +, ++ e +++, correspondem a ausência, baixo, médio e alto sinais de fluorescência, respectivamente. A fluorescência foi monitorada a 4dpi, usando confocal Leica TCS LS. C) Western blot da associação demonstrada em A. Anticorpo, anti Ct e Nt GFP (SigmaTM) foram utilizados para marcação das proteínas.

NSm wt e truncada com a proteína do nucleocapsídeo (N) homóloga. Nesse ensaio de BiFC foram testadas todas as combinações possíveis entre as proteínas NSm e N do BeNMV para a escolha da associação que melhor resultaria na recuperação de

fluorescência ([Zamyatnin et al., 2006](#)). Para tanto, procedemos a fusão do NtYFP e CtYFP ao extremo C e N-terminal das proteínas NSm BeNMV wt, truncada e para a proteína N do BeNMV. Expressão transiente dos diferentes pares de fusão em distintas combinações foi obtido por agroinfiltração de folhas de *N.benthamiana*. Observamos reconstituição de fluorescência de duas das oito combinações testadas correspondentes aos pares de fusão CtYFP-N+NSm-NtYFP e N-NtYFP+CtYFP-NSm (Figura 7B). No ensaio usamos como controle positivo a interação entre BeNMV NSm wt + BeNMV N, onde foi observado sinal de fluorescência difundido por toda a célula (Figura 7A, Painel I). Recuperação de fluorescência também foi observada na associação Ct-BeNMVN + BeNMV295NSm-NtYFP e Ct-BeNMVN + BeNMV300NSm-NtYFP (Figure 7A, Painel II e IV). Ausência de fluorescência foi observada quando diferentes proteínas fusionadas foram expressas (Figura 7A, Painel III, IV e Figura 7B). Em todos os casos, a expressão da proteína correspondente de fusão foi confirmada por Western blot (Figura 7C). Estes resultados demonstram que para os tospovírus, a remoção de parte do C-terminal da proteína de movimento, ainda permite a associação de NSm com a proteína correspondente do nucleocapsídeo.

DISCUSSÃO

Estudos recentes têm demonstrado a influência da associação de proteínas virais com proteínas do hospedeiros na regulação da replicação viral, condicionando a uma modificação da taxa de virulência, e por conseguinte, adaptando o espectro de infecção viral, devido a especificidade dessas associações ([Bortz and Garcia-Sastre, 2011](#); [Bortz et al., 2011](#); [Gabriel et al., 2008](#); [Rolling et al., 2009](#); [Salomon et al., 2006](#)).

Neste trabalho foi comparado a habilidade em promover o movimento viral de quatro MPs de tospovírus que possuem características biológicas e moleculares distintas. Os resultados do movimento célula a célula e sistêmico obtidos a partir do sistema AMV, demonstraram que a NSm do BeNMV, embora este apresente uma gama de hospedeiros extremamente restrito ([de Oliveira et al., 2012](#)), promoveu um movimento célula a célula eficiente, no entanto, o movimento sistêmico foi significativamente reduzido em comparação com as outras MPs avaliadas de tospovírus que apresentam uma ampla gama de hospedeiros (TSWV e TCSV) ([Pappu et al., 2009](#)). Estas observações parecem indicar que as NSm de tospovírus poderiam estar envolvidas na determinação do espectro de hospedeiras do vírus, provavelmente

facilitando e/ou restringindo o movimento a longa distância. Prevemos que a capacidade ou não para infectar um hospedeiro provavelmente pode estar ligada a uma limitação no processo de movimento sistêmico, como observado para BeNMV. Função similar foi observada em estudos com a polimerase do vírus influenza, a qual tem envolvimento com proteínas específicas do hospedeiro regulando a virulência e o espectro de infecção ([Bortz and Garcia-Sastre, 2011](#); [Rolling et al., 2009](#)). A função das MPs dos tospovírus no movimento célula à célula e sistêmico foi confirmado por quantificação relativa de infecção através da detecção do AMV RNA 3 e 4, a partir do RNA total extraído de folhas inoculadas e folhas sistêmicas. Mais uma vez, foi demonstrado que BeNMV MP foi capaz de mover de forma eficiente o vírus AMV, em movimento a curta distância, no entanto, o movimento a longa distância foi limitado, corroborando os resultados obtidos por meio de análise de quimioluminescência. Futuros ensaios, incluindo uma ampla gama de hospedeiras são necessários para confirmar esta hipótese.

Duas hipóteses de movimento viral são propostas, associação MP-RNA e associação MP-CP ([Benitez-Alfonso et al., 2010](#); [Niehl and Heinlein, 2011](#); [Scholthof, 2005](#); [Taliensky et al., 2008](#)). Para o gênero *Tospovirus* é aceita a hipótese de túbulo guiado, sugerida por ([Storms et al., 1995](#)) e confirmada anos depois, a partir de ensaios de “pull down”, que demonstraram a real associação da proteína NSm com a proteína do nucleocapsídeo (N) ([Soellick et al., 2000](#)). No entanto, a confirmação, *in vivo* dessa associação não havia sido demonstrada até o presente estudo. Através da utilização de um construto contendo proteína da capa mutada (CP 206) que apresenta uma deleção de 14 aminoácidos que impossibilita a formação de vírions ([Tenllado and Bol, 2000](#)), e por conseguinte inibem o movimento viral. Foi demonstrado que a NSm dos tospovírus, no contexto do sistema do AMV, não é eficiente para promover o transporte viral na ausência de vírions. Este resultado contrasta com a movimentação viral mediada por MPs de outras espécies virais (*Cucumber mosaic virus, Cowpea mosaic virus and Tobacco mosaic virus*) não pertencentes a família viral do AMV, e que possibilitam a movimentação viral pela associação da MP com o RNA ([Sanchez-Navarro et al., 2006](#)). A não encapsidação viral e por conseguinte a inibição do movimento, permite especularmos que o movimento mediado pelas MPs em estudo é dependente da associação da MP com a CP. Dessa forma, os resultados reforçam, que o movimento dos tospovírus segue a

hipótese proposta para os vírus *Cowpea mosaic virus* (CPMV) e *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Para esses vírus, é proposto que o transporte viral, ocorre a partir da associação da MP com a proteína do nucleocapsídeo gerando uma reestruturação drástica do PD, por aparente remoção dos desmotúbulos e passagem do RE pelos plasmodesmas. Tal formação ocasiona a expansão dos poros, e permite a penetração dos túbulos de transporte que são polímeros de proteína de movimento que propiciam a passagem viral de uma célula a outra ([Taliensky et al., 2008](#); [Tilsner et al., 2011](#); [Ueki and Citovsky, 2011](#); [Zamyatnin et al., 2006](#)).

Também foram analisados os domínios das NSm envolvidos com a movimentação. Uma polimerização eficiente da NSm é necessária para a montagem de túbulos e promoção do movimento viral. Para o BeNMV, CSNV e TCSV, apesar de apresentarem diferenças significativas em aspectos biológicos e moleculares, suas NSm foram igualmente ativas na formação de túbulos. Tal característica indica a capacidade das MPs dos tospovírus em desenvolver túbulos, mesmo na ausência de outros componentes virais específicos. Esta observação corrobora os resultados encontrados para TSWV NSm ([Storms et al., 1995](#)). A presença de túbulos em todas as distintas NSm testadas, indica que a polimerização da NSm para a formação de túbulos é uma característica conservada dentro do gênero.

Estudos prévios demonstraram que a remoção de 54 aminoácidos do C-terminal da NSm do TSWV afetava o movimento, mas não completamente, pois, no processo de infecção, micro lesões foram observadas. No entanto, com a remoção de 107 aminoácidos, o movimento viral foi completamente abolido ([Lewandowski and Adkins, 2005](#)). No presente trabalho, usando quatro MPs distintas e um sistema mais refinado para a análise de movimento célula à célula, demonstramos a inibição do movimento através da remoção de apenas 5 aminoácidos, a partir do extremo C-terminal, para as espécies CSNV, TCSV e TSWV. Portanto, nossos resultados demonstram ser necessária a presença do C-terminal completo da MP para permitir o movimento viral. Esses resultados contrastam com aqueles apresentados por ([Lewandowski and Adkins, 2005](#)), que afirmam que o movimento viral, embora restrito, possa ainda existir mesmo após a remoção de 54 aminoácidos na porção C-terminal da proteína.

Para a MP do TSWV, são indicados os domínios envolvidos com formação de túbulos e movimento sistêmico como D154, EYKK 205-208, EEEEE 284-288 ([Li et](#)

[al., 2009](#)). Para a NSm do BeNMV, identificamos um domínio envolvido com a movimentação (aminoácido 300), no qual a remoção de 14 aminoácidos do C-terminal não aboliu o movimento, no entanto, houve uma restrição na eficiência do movimento célula à célula, possivelmente por uma redução no tamanho dos túbulos formados. Foi observada também uma inibição no movimento sistêmico, fato que era de certa forma esperado, uma vez que estudos preliminares sugeriam que quando há restrição no movimento célula à célula, o movimento sistêmico é comprometido (Sánchez-Navarro, J.A comunicação pessoal). Portanto, os dados gerados nesse trabalho, permitem concluir que para as NSm das espécies CSNV, TCSV e TSWV, o C-terminal é essencial para a movimentação, diferentemente do que é observado para outros gêneros virais, onde a deleção do extremo C-terminal não aboliu o movimento viral ([Aparicio et al., 2010](#); [Berna et al., 1991](#); [Carvalho et al., 2003](#); [Kim et al., 2004](#); [Nagano et al., 1997](#); [Takeda et al., 2004](#)). No caso do BeNMV, o C-terminal completo não é essencial para gerar movimento, curiosamente um resultado que contrasta o que foi observado com as demais NSm em estudo.

Para alguns gêneros virais, o C-terminal da MP é essencial para garantir o movimento mediante associação específica com a proteína da capa homóloga ([Aparicio et al., 2010](#); [Codoner et al., 2006](#)). Avaliamos para o gênero tospovírus uma não associação específica da região do extremo C-terminal com a proteína N com base na NSm do BeNMV, onde a remoção do C-terminal ainda possibilitou a movimentação (sessão resultados). Após a remoção do C-terminal da NSm, observamos a associação entre a NSm e a cognata proteína do nucleocapsídeo (N), a partir de ensaio de associação proteína-proteína (BiFC). Esses resultados sugerem que possivelmente para os tospovírus, diferentes domínios da NSm estão envolvidos entre a associação NSm-N.

Em conclusão, nos estudos *in vivo* realizados neste trabalho foram observadas diferenças na eficiência do movimento viral célula à célula e sistêmico mediado pela proteína NSm. Sugerimos que a proteína NSm pode estar envolvida na determinação da restrição ou do amplo espectro de infecções viral, devido às diferenças significativas observadas nos padrões de movimento célula à célula e sistêmicos entre as NSm dos tospovírus. Utilizando o construto AMV CP 206, concluímos e corroboramos a teoria proposta do transporte mediado via túbulo guiado ([Storms et al., 1995](#)), observando a inibição do movimento com base na construção quimérica CP 206 que expressa as MPs heterólogas dos distintos tospovírus. Também

demonstramos que as NSm das quatro espécies de tospovírus estudadas foram igualmente eficientes para formar túbulos. Curiosamente, para BeNMV, o C-terminal não foi essencial para o movimento, em contraste, com as NSm dos vírus CSNV, TCSV e TSWV, para os quais existe a necessidade das NSm completas para garantir o movimento célula à célula. Por fim, observamos a não associação específica do extremo C-terminal da NSm do BeNMV com sua proteína N homóloga, demonstrando que possivelmente, para os tospovírus, domínios diferentes estariam envolvidos com essa função. Em geral, estas diferenças parecem revelar uma evolução distinta dos tospovírus e/ou adaptação relativa à sua capacidade para se mover entre diferentes hospedeiros.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Adkins, S. (2000). Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. *Mol Plant Pathol* 1:151-157.
- Aparicio, F., Pallas, V., and Sanchez-Navarro, J. (2010). Implication of the C terminus of the *Prunus necrotic ringspot virus* movement protein in cell-to-cell transport and in its interaction with the coat protein. *The Journal of general virology* 91:1865-1870.
- Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J.A., and Pallas, V. (2006). In vitro and in vivo mapping of the *Prunus necrotic ringspot virus* coat protein C-terminal dimerization domain by bimolecular fluorescence complementation. *The Journal of general virology* 87:1745-1750.
- Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C., and Maule, A.J. (2010). Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 23:1403-1412.
- Berger, L., Kimmie, A.R. (1987). *Methods in Enzymology Guide to Molecular Cloning Techniques*. New York, London: Academic press. 152.
- Berna, A., Gafny, R., Wolf, S., Lucas, W.J., Holt, C.A., and Beachy, R.N. (1991). The TMV movement protein: role of the C-terminal 73 amino acids in subcellular localization and function. *Virology* 182:682-689.
- Bezerra, I.C., de, O.R.R., Pozzer, L., Nagata, T., Kormelink, R., and De Avila, A.C. (1999). Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from *chrysanthemum* and one from *zucchini*. *Phytopathology* 89:823-830.
- Bortz, E., and Garcia-Sastre, A. (2011). Predicting the pathogenesis of influenza from genomic response: a step toward early diagnosis. *Genome medicine* 3:67.
- Bortz, E., Westera, L., Maamary, J., Steel, J., Albrecht, R.A., Manicassamy, B., Chase, G., Martinez-Sobrido, L., Schwemmle, M., and Garcia-Sastre, A. (2011). Host- and strain-specific regulation of influenza virus polymerase activity by interacting cellular proteins. *mBio* 2.
- Carmen Herranz, M., Sanchez-Navarro, J.A., Sauri, A., Mingarro, I., and Pallas, V. (2005). Mutational analysis of the RNA-binding domain of the *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) movement protein reveals its requirement for cell-to-cell movement. *Virology* 339:31-41.
- Carvalho, C.M., Wellink, J., Ribeiro, S.G., Goldbach, R.W., and Van Lent, J.W. (2003). The C-terminal region of the movement protein of Cowpea mosaic virus is involved in binding to the large but not to the small coat protein. *The Journal of general virology* 84:2271-2277.

- Codoner, F.M., Fares, M.A., and Elena, S.F. (2006). Adaptive covariation between the coat and movement proteins of prunus necrotic ringspot virus. *Journal of virology* 80:5833-5840.
- de Oliveira, A.S., Melo, F.L., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., Kitajima, E.W., and Resende, R.O. (2012). Characterization of bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the Genus Tospovirus. *PloS one* 7:e38634.
- Fajardo, T.V., Peiro, A., Pallas, V., and Sanchez-Navarro, J. (2013). Systemic transport of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family. *The Journal of general virology* 94:677-681.
- Gabriel, G., Herwig, A., and Klenk, H.D. (2008). Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha 1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS pathogens* 4:e11.
- Genovés, A., Pallás, V., and Navarro, J.A. (2011). Contribution of topology determinants of a viral movement protein to its membrane association, intracellular traffic, and viral cell-to-cell movement. *Journal of virology* 85:7797-7809.
- Hayes, R.J., and Buck, K.W. (1990). Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63:363-368.
- Herranz, M.C., and Pallas, V. (2004). RNA-binding properties and mapping of the RNA-binding domain from the movement protein of Prunus necrotic ringspot virus. *The Journal of general virology* 85:761-768.
- Horikoshi, M., Nakayama, M., Yamaoka, N., Furusawa, I., and Shishiyama, J. (1987). Brome mosaic virus coat protein inhibits viral RNA synthesis in vitro. *Virology* 158:15-19.
- Kim, S.H., Kalinina, N.O., Andreev, I., Ryabov, E.V., Fitzgerald, A.G., Taliansky, M.E., and Palukaitis, P. (2004). The C-terminal 33 amino acids of the cucumber mosaic virus 3a protein affect virus movement, RNA binding and inhibition of infection and translation. *The Journal of general virology* 85:221-230.
- Lacorte, C., Ribeiro, S.G., Lohuis, D., Goldbach, R., and Prins, M. (2010). Potatovirus X and Tobacco mosaic virus-based vectors compatible with the Gateway cloning system. *Journal of virological methods* 164:7-13.
- Lebas, B.S.M., Ochoa-Corona, F.M. (2007). Impatiens necrotic spot virus. In: Rao, G.P., Bragard, C., Lebas, B.S.M. (Eds.), *Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses. Grain Crops and Ornamentals*. Stadium Press LLC, Texas, 4:221-243.
- Lewandowski, D.J., and Adkins, S. (2005). The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virology* 342:26-37.
- Li, W., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E., and Adkins, S. (2009). Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* 390:110-121.
- Loesch-Fries, L.S., Jarvis, N.P., Krahn, K.J., Nelson, S.E., and Hall, T.C. (1985). Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 cDNA transcripts in vitro and in vivo. *Virology* 146:177-187.
- Melcher, U. (2000). The '30K' superfamily of viral movement proteins. *The Journal of general virology* 81:257-266.
- Nagano, H., Okuno, T., Mise, K., and Furusawa, I. (1997). Deletion of the C-terminal 33 amino acids of cucumber mosaic virus movement protein enables a chimeric brome mosaic virus to move from cell to cell. *Journal of virology* 71:2270-2276.
- Nassuth, A., and Bol, J. F. . (1983). Altered balance of the synthesis of plus- and minus-strand RNAs induced by RNA 1 and 2 of alfalfa mosaic virus in the absence of RNA3. . *Virology* 124: 75585.
- Niehl, A., and Heinlein, M. (2011). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248:75-99.
- Pallas, V., Mas, P., and Sanchez-Navarro, J.A. (1998). Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot-blot hybridization. *Methods in molecular biology* 81:461-468.

- Pappu, H.R., Jones, R.A., and Jain, R.K. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus research* 141:219-236.
- Persley, D.M., Thomas, J.E., Sharman, M. (2006). Tospoviruses—an Australian perspective. *Australas. Plant Pathology* 35:161–180.
- Peter E. M. Taschner, A.C.V.D.K., Lyda Neeleman, And John F. Bol. (1991). Replication of an incomplete Alfalfa Mosaic Virus Genome in Plants Transformed with Viral Replicase Genes. *Virology* 181:445-450.
- Quadt, R., Verbeek, H.J., and Jaspars, E.M. (1988). Involvement of a nonstructural protein in the RNA synthesis of brome mosaic virus. *Virology* 165:256-261.
- Resende, R.O.P., L.; Nagata, T.; Bezerra, I.C.; Lima, M.I.; Kitajima, E.W.; De Ávila, A.C. (1996). New Tospoviruses Found in Brazil. *Proceedings of the International Symposium on Tospovirus and Thrips of Floral and Vegetable Crops. Acta Horti* 431:78-89.
- Rolling, T., Koerner, I., Zimmermann, P., Holz, K., Haller, O., Staeheli, P., and Kochs, G. (2009). Adaptive mutations resulting in enhanced polymerase activity contribute to high virulence of influenza A virus in mice. *Journal of virology* 83:6673-6680.
- Salomon, R., Franks, J., Govorkova, E.A., Ilyushina, N.A., Yen, H.L., Hulse-Post, D.J., Humbert, J., Trichet, M., Rehg, J.E., Webby, R.J., et al. (2006). The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *The Journal of experimental medicine* 203:689-697.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Manuatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. . N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989-1659
- Sanchez-Navarro, J., Miglino, R., Ragozzino, A., and Bol, J.F. (2001). Engineering of alfalfa mosaic virus RNA 3 into an expression vector. *Archives of virology* 146:923-939.
- Sanchez-Navarro, J.A., and Bol, J.F. (2001). Role of the alfalfa mosaic virus movement protein and coat protein in virus transport. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 14:1051-1062.
- Sanchez-Navarro, J.A., Carmen Herranz, M., and Pallas, V. (2006). Cell-to-cell movement of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of Ilar-, bromo-, cucumo-, tobamo- and comoviruses and does not require virion formation. *Virology* 346:66-73.
- Scholthof, H.B. (2005). Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends in plant science* 10:376-382.
- Schoumacher, F., Giovane, C., Maira, M., Poirson, A., Godefroy-Colburn, T., and Berna, A. (1994). Mapping of the RNA-binding domain of the alfalfa mosaic virus movement protein. *The Journal of general virology* 75 (Pt 11):3199-3202.
- Silva, M.S., Martins, C.R., Bezerra, I.C., Nagata, T., de Avila, A.C., and Resende, R.O. (2001). Sequence diversity of NS(M) movement protein of tospoviruses. *Archives of virology* 146:1267-1281.
- Soellick, T., Uhrig, J.F., Bucher, G.L., Kellmann, J.W., and Schreier, P.H. (2000). The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:2373-2378.
- Storms, M.M., Kormelink, R., Peters, D., Van Lent, J.W., and Goldbach, R.W. (1995). The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214:485-493.
- Takeda, A., Kaido, M., Okuno, T., and Mise, K. (2004). The C terminus of the movement protein of Brome mosaic virus controls the requirement for coat protein in cell-to-cell movement and plays a role in long-distance movement. *The Journal of general virology* 85:1751-1761.
- Taliansky, M., Torrance, L., and Kalinina, N.O. (2008). Role of plant virus movement proteins. *Methods in molecular biology* 451:33-54.

- Taschner, P.E., van der Kuyl, A.C., Neeleman, L., and Bol, J.F. (1991). Replication of an incomplete alfalfa mosaic virus genome in plants transformed with viral replicase genes. *Virology* 181:445-450.
- Tenllado, F., and Bol, J.F. (2000). Genetic dissection of the multiple functions of alfalfa mosaic virus coat protein in viral RNA replication, encapsidation, and movement. *Virology* 268:29-40.
- Tilsner, J., Amari, K., and Torrance, L. (2011). Plasmodesmata viewed as specialised membrane adhesion sites. *Protoplasma* 248:39-60.
- Ueki, S., and Citovsky, V. (2011). To gate, or not to gate: regulatory mechanisms for intercellular protein transport and virus movement in plants. *Mol Plant* 4:782-793.
- van Dun, C.M., van Vloten-Doting, L., and Bol, J.F. (1988). Expression of alfalfa mosaic virus cDNA1 and 2 in transgenic tobacco plants. *Virology* 163:572-578.
- Vaquero, C., Liao, Y.C., Nahring, J., and Fischer, R. (1997). Mapping of the RNA-binding domain of the cucumber mosaic virus movement protein. *The Journal of general virology* 78 (Pt 8):2095-2099.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N., and Lucas, W.J. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246:377-379.
- Zamyatin, A.A., Solovyev, A.G., Bozhkov, P.V., Valkonen, J.P., Morozov, S.Y., and Savenkov, E.I. (2006). Assessment of the integral membrane protein topology in living cells. *Plant J* 46:145-154.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos, pelo excelente auxílio prestado em bancada para elaboração dos ensaios propostos no presente capítulo à Dr. Ana Peiró (CISIC, IBMCP) e a técnica do laboratório Lorena Valencia (CISIC, IBMCP). Agradecimentos especiais ao Dr. Jesús Angel Sánchez-Navarro (CISIC, IBMCP), por auxílio na elaboração dos experimentos e discussão dos resultados obtidos. Este trabalho foi financiado por BIO 2011-25018, agência da Espanha DGICYT, Capes (Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico) no Programa CsF (Ciência sem Fronteiras) Governo Federal, CNPq e FAP-DF, Brasil.

CAPÍTULO III

A proteína de movimento (NSm) associa-se periféricamente à membrana celular e interage com as proteínas do nucleocapsídeo (N) e outras proteínas NSm de distintos tospovirus.

Tospovirus é o único gênero da família *Bunyaviridae* que inclui espécies virais capazes de infectar planta. A espécie tipo é *Tomato spotted wilt virus*, atualmente ranqueada entre os “top 10” economicamente mais importantes vírus de plantas causando perdas significativas na produção agrícola mundial. Durante a infecção viral, o transporte célula à célula é um processo ativo provido por proteínas de movimento (MPs) codificadas pelos vírus que geralmente se associam com fatores do hospedeiro e outros componentes virais possibilitando o transporte a curta distância e sistêmico. A topologia de proteínas de membrana pode ser teoricamente predita com base na análise de sequência de aminoácidos ou determinada experimentalmente por técnicas bioquímicas. No entanto, há limitações nessas práticas por serem empregadas *in vitro*, omitindo muito do que biologicamente pode ocorrer. Um dos objetivos desse trabalho foi compreender a associação das MPs dos vírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum steam necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spotted virus* (TCSV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) com a membrana celular. Para tanto, foram utilizadas duas abordagens diferentes *in planta*: “Biomolecular Fluorescence Complementation” (BiFC) e tratamentos químicos a partir das MPs com seu extremo C-terminal fusionado à hemaglutinina (HA). Com base nos resultados obtidos, concluímos que as MPs se associam à membrana de forma periférica. Levando em consideração predições de hidrofobicidade, domínios “coiled-coil” de associação à membrana e orientações topológicas sugerimos um modelo de interação não-transmembrânico da NSm com a membrana celular. Finalmente, a partir de ensaios de dímeros, heterodímeros, intra-associação e inter-associação de homólogos e heterólogos de NSm e N (nucleoproteína) observamos que: i) todas as proteínas NSm e N são eficientes na formação de dímeros ii) as proteínas NSm interagem com a sua N homóloga (cognata) e iii) foi observado a interação entre NSm, N e NSm-N. Estes resultados podem propiciar uma melhor interpretação das interações de proteínas virais, com especial ênfase na compreensão dos processos de infecções mistas.

Este capítulo foi publicado como: Leastro, M.O; Pallás, V; Resende, R.O and Sánchez-Navarro, J, (2015). The movement proteins (NSm) of distinct tospoviruses peripherally associate with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins. *Virology*. doi:10.1016/j.virol.2015.01.031.

INTRODUÇÃO

Tospovirus é o único gênero da família *Bunyaviridae* que inclui espécies virais capazes de infectar planta. A espécie tipo é *Tomato spotted wilt virus*, atualmente ranqueada entre os “top 10” economicamente mais importantes vírus de plantas causando perdas significativas na produção agrícola mundial. (Adkins, 2000; Scholthof et al., 2011). Seu genoma consiste de três segmentos de RNA de fita simples, dois de orientação ambisense e um de orientação totalmente negativa, denominados de S RNA (small), M RNA (medium) e L RNA (large), respectivamente, e que contêm cinco “open reading frames” (ORFs) que codificam cinco proteínas estruturais e não-estruturais (Pappu et al., 2009).

O transporte viral célula à célula é um processo ativo provido por proteínas de movimento viral (MP) que geralmente se associam com fatores do hospedeiro e outros componentes virais possibilitando o transporte célula à célula e sistêmico (Aparicio et al., 2010; Dickert et al., 2004; Navarro et al., 2006; Pouwels et al., 2004). Transporte intracelular de macromoléculas para a periferia celular é um processo conjunto de associação do complexo de proteínas de membrana com o complexo viral, que permite que os vírus de planta superem a barreira rígida da parede da célula, movendo-se, a partir da modificação de canais de comunicação célula à célula (plasmodesmas). As MPs são comumente encontradas em associação com elementos do citoesqueleto, retículo endoplasmático, membrana ou bem como, outros fatores do hospedeiro, favorecendo o transporte celular (Heinlein and Epel, 2004; Kormelink et al., 1994; Lucas, 2006; Nelson and Citovsky, 2005; Pallas and Garcia, 2011; Wolf et al., 1989).

A topologia de membrana da MP do *Tobacco mosaic virus* (TMV), o membro tipo da família 30K (Melcher, 2000), foi proposta recentemente como sendo associada a superfície citosólica do ER, de uma forma não transmembrânica (Peiro et al., 2014). Tem sido proposto que esta topologia pode ser uma regra geral para os outros membros da família 30K, incluindo a MP dos tospovírus, embora dados confirmatórios dessa hipótese ainda não estão disponíveis. Além da associação com

membranas biológicas, para as MPs têm sido descrito que, em alguns casos, existe a necessidade da associação com as proteínas cognatas do nucleocapsídeo, para a ocorrência do transporte do complexo viral durante o processo de infecção ([Aparicio et al., 2010](#); [Nagano et al., 1997](#); [Sanchez-Navarro and Bol, 2001](#); [Sanchez-Navarro et al., 2006](#); [Takeda et al., 2004](#)). As MPs não são apenas os principais componentes no movimento dos vírus, mas podem ter uma contribuição significativa no desenvolvimento de sintomas ([Pallas and Garcia, 2011](#)) ou na modulação da susceptibilidade do hospedeiro ao vírus ([Amari et al., 2012](#)).

Interações entre vírus parecem ser uma característica comum na natureza. O processo de infecção mista em condições naturais entre espécies virais do mesmo gênero propiciam maior diversidade genética. Tal fato parece ser mais evidente em espécies que apresentam organização genômica segmentada, como nos tospovírus, devido a fatores que provavelmente favorecem o rearranjo genético ([Brown et al., 2002](#); [Idris and Brown, 2004](#); [Idris et al., 2008](#)). Rearranjo genético de componentes genômicos é bastante conhecido e difundido na natureza ([Webster et al., 2011](#)), podendo garantir modificações genômicas relevantes, favorecendo a evolução do genoma viral, como observado nos vírus de genoma segmentado: *Bromovirus*, *Cucumovirus* e *Nepovirus* ([Roossinck, 1997](#)). Infecções mistas já foram relatadas no gênero *Tospovirus*, como o sinergismo, proveniente da interação dos vírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV). Neste caso, a infecção mista favoreceu a acumulação do ToCV em tecidos do floema e garantiu a quebra da resistência do TSWV em plantas de tomate contendo o gene de resistência Sw-5 ([García-Cano et al., 2006](#)).

Existem poucos relatos de infecção mista de dois tospovírus distintos na mesma hospedeira, no entanto, há um exemplo evidente que envolve os vírus *Iris yellow spot virus* (IYSV) e TSWV em plantas de cebola, nas quais, em condições naturais de campo, 7% das plantas testadas apresentaram infecção mista ([Mullis SW, 2004](#)). A natureza e extensão dessa dupla infecção foram testadas. O IYSV que apresentava restrição na infecção sistêmica em plantas de *Datura stramonium*, com a presença do TSWV, teve a sua movimentação sistêmica favorecida ([Bag et al., 2012](#)). Um estudo mais extensivo de interações entre as proteínas virais de espécies distintas ou interações com proteínas do hospedeiro podem elucidar a natureza das infecções múltiplas e gerar uma melhor compreensão dos processos de sinergismo e/ou antagonismo durante a infecção dos tospovírus. Neste sentido, neste trabalho, foi

selecionada a MP como um componente essencial durante o transporte do vírus em que interações compatíveis entre as proteínas homólogas (NSm, N) e/ou heterólogas MPs e/ou N, poderiam propiciar um efeito sinérgico em infecções mistas. Além disso, foram selecionados quatro espécies de tospovírus com características biológicas diferentes, uma possuindo um estreito espectro de infecção (Bean necrotic mosaic virus, BeNMV) e outras três apresentando um amplo espectro de plantas hospedeiras (TSWV; *Chrysanthemum steam necrosis virus* CSNV, *Tomato chlorotic spotted virus*. TCSV).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos: analisar a MP, sua topologia de associação à membrana utilizando-se quatro espécies de tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV e um segundo objetivo que visou avaliar a capacidade das diferentes proteínas NSm em interagir com proteínas homólogas e/ou heterólogas NSm e N dos distintos tospovírus. Ensaios de fracionamento celular e tratamentos bioquímicos da NSm expressa em planta, em conjunto com os resultados de ensaios de microscopia confocal (“Biomolecular Fluorescence Complementation” - BiFC), permitiram propor que as quatro proteínas NSm estão periféricamente associadas à face citosólica da membrana do ER. Por fim, a análise de interações de NSm gerou informações que podem facilitar um melhor entendimento das interações entre proteínas virais, fortalecendo a compreensão dos processos biológicos e moleculares de infecções mistas.

MATERIAL E MÉTODOS

Manipulação do DNA.

Os genes das proteínas de movimento dos vírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV, foram amplificados a partir dos vetores pGEMT-Easy (NSm) ([de Oliveira et al., 2012](#); [Silva et al., 2001](#)). Primers foram desenhados com sítios de corte *PciI* e *NheI* e inseridos no extremo 5' e 3' das NSm dos vírus BeNMV, TCSV e TSWV, para a NSm do CSNV foram adicionados os sítios de *BspHI/NheI*.

Para amplificação do gene do nucleocapsídeo viral (N), RNA total de folhas de *N. benthamiana* infectadas com os vírus BeNMV, TCSV e TSWV foi extraído de acordo com especificações de [Sambrook, \(1989\)](#). RT-PCR foi desenvolvida baseado em especificações do produtor (Invitrogen™) com primers desenhados para adição

dos sítios de *NcoI/NheI* para o gene N do BeNMV e TCSV e para o gene N do vírus TSWV foram adicionados os sítios de *PciI/NheI*.

Para fusão da sequência de hemaglutinina (HA) no C-terminal dos genes da NSm, os respectivos genes foram subclonados no vetor pSK35S-MPTMV:HA (Peiro et al., 2014) substituindo o gene da MP do vírus *Tobacco mosaic virus* (TMV). Os clones resultantes foram pSK35S-NSmBeNMV:HA, pSK35S-NSmCSNV:HA, pSK35S-NSmTCSV:HA e pSK35S-NSmTSWV:HA, contendo a correspondente NSm fusionada ao epitopo HA sob o controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e terminador II, de “potato proteinase”. Em seguida, os cassetes pSk35S-NSm:HA foram subclonados no vetor binário pMOG800 usando enzima de restrição *XhoI*.

Para o ensaio de topologia de membrana e BiFC, foi realizada a fusão dos 154 aminoácidos N-terminal da proteína “Yellow fluorescent protein” (Nt-YFP) ou 84 resíduos C-terminal da YFP (Ct-YFP) no extremo C- e N-terminal de distintas proteínas. Para isto, quatro construções derivadas do vetor pSK35SC-eGFP-PoPit (Herranz et al., 2005) foram feitas, nas quais foram introduzidos as NtYFP e CtYFP tanto no extremo N como C terminal do gene eGFP usando os sítios de restrição *PscI/NcoI* ou *NheI/XbaI* compatíveis com *NcoI* (N-terminal do eGFP) ou *NheI* (C-terminal do eGFP), respectivamente. Os vetores resultantes pSK35S-NtYFP:eGFP-PoPit, pSK35S-CtYFP:eGFP-PoPit, pSK35S-eGFP:NtYFP-PoPit e pSK35S-eGFP:CtYFP-PoPit permitiram a fusão do Nt e CtYFP no N- ou C-terminal das proteínas de interesse pela mudança do gene eGFP usando as enzimas de restrição *NcoI/NheI*. Todos os genes da NSm e N foram clonados nas quatro construções e os cassetes de expressão gerados foram subclonados no vetor binário pMOG800 usando enzima de restrição *SacI*.

Os cassetes de expressão que continham os fragmentos N- e C- terminal da EYFP para direcionamento ao lúmen do retículo endoplasmático (NtYFPER e CtYFPER) foram originados a partir dos clones pRT-YN-ER e pRT-YC-ER (fornecidos pelo Dr. Jari P.T Valkonen, University of Helsinki), (Zamyatnin et al., 2006). Estes cassetes foram subclonados no vetor pMOG800. Vetores binários expressando N- e C- terminal da EYFP de direcionamento para o citosol (NtYFPCyt e CtYFPCyt) foram fornecidos pelo Dr. F. Aparicio (Instituto Biología Molecular y Celular de Plantas, España.), (Aparicio et al., 2006). Todas as construções foram confirmadas por sequenciamento dos vetores.

Localização subcelular da proteína NSm e N *in vivo*.

Para analisar a localização subcelular da proteína N e da NSm, todos os genes amplificados foram clonados no vetor pSK35S-MPPNRSV:GFP ([Herranz et al., 2005](#)) pela troca do gene da MP do vírus *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV). Posteriormente, o cassete de expressão foi subclonado no vetor pMOG800 usando enzimas de restrição *Bam*HI/*Xho*I. Plantas de *N.benthamiana* foram infiltradas ($OD_{600}=0,4$) com culturas de *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58) transformadas com os correspondentes vetores binários pMOG800. As plantas foram mantidas a temperatura de 24°C/dia, 18°C/noite, com 16 h/dia e 8 h/noite de fotoperíodo. A reconstituição da fluorescência foi monitorada 4 dpi com auxílio do microscópio confocal TCS Leica ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 500\text{-}550 \text{ nm}$).

Marcação de calose foi desenvolvida como previamente descrito por [Simpson et al., \(2009\)](#). Resumidamente, folhas de *N.benthamiana* foram infiltradas com uma mistura de 2:3 v/v de 0,1% de azul de anilina (Biosupplies) e 1M de glicerol pH 9,5. Marcação da calose foi visualizada 20 min após em microscópio confocal ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 410\text{-}480 \text{ nm}$).

Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC).

Em ensaio de BiFC ([Aparicio et al., 2006](#)) para determinar a topologia da NSm e a associação de dímeros e heterodímeros das proteínas NSm e/ou N, todos os diferentes construtos foram transientemente expressos *in planta*. Para tanto, culturas ($OD_{600}=0,4$) de *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58) transformadas com o correspondente vetor binário pMOG800, foram usadas para infiltração de plantas como descrito previamente por ([Genovés et al., 2011](#)). As plantas foram mantidas a temperatura de 24°C/dia, 18°C/noite, com 16 h/dia e 8 h/noite de fotoperíodo. A reconstituição da fluorescência foi monitorada 4 dpi com auxílio do microscópio confocal TCS Leica ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 500\text{-}550 \text{ nm}$).

No ensaio de BiFC objetivando caracterizar a topologia da NSm, as proteínas carregando NtYFP fusionadas ao seu N e C-terminal, foram transientemente co-expressas com os vetores contendo as proteínas CtYFP de direcionamento ao citoplasma (CtYFPCyt) ou ao lumen do ER (CtYFPER). Para aumentar a expressão das proteínas NSm e dos construtos contendo Nt/CtYFP, a fim de permitir uma melhor visualização do sinal fluorescente, as proteínas foram também co-expressas com o supressor de silenciamento HC-Pro do *Tabacco etch virus* (TEV).

Para o ensaio de interação *in vivo*, NtYFP e CtYFP foram fusionadas ao N- e C- terminal das proteínas NSm e N. Os pares de proteínas indicados foram expressos transientemente em plantas de *Nicotiana benthamiana* após a agroinfiltração como descrito acima, realizando-se o monitoramento da reconstituição de fluorescência 4dpi com auxílio do microscópio confocal.

Expressão da proteína NSm *in planta*, Sedimentação em Membrana e Western blot.

Folhas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58), a partir de culturas contendo os plasmídeos pMOG-35S-NSmBeNMV:HA, pMOG-35S-NSmCSNV:HA, pMOG-35S-NSmTCSV:HA e pMOG-35S-NSmTSWV:HA como descrito previamente ([Herranz et al., 2005](#)). Aos 3dpi amostras de folhas foram maceradas com tampão de lise (20mM HEPES, pH:6,8, 150mM de acetato de potássio, 250mM monnitol e 1mM MgCl₂), após homogeneização, o extrato foi clarificado por centrifugação a 3.000Xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi centrifugado a 30.000Xg por 1h a 4°C. As frações microsossomais do pellet, foram ressuspensas com tampão de lise, (100mM Na₂CO₃ - pH 11) e soluções salinas de 4M e 7M de ureia. Posteriormente, esta fração foi incubada por 30 min em gelo ([Schaad et al., 1997](#)). Uma nova ultracentrifugação de 30.000Xg por 25 min a 4°C foi feita e as frações do pellet e sobrenadante foram ressuspensas em 100 µl de tampão de lise. Por fim, as frações do pellet e dos sobrenadantes foram analisadas em SDS-PAGE e posteriormente, transferidas para membranas de polyvinylidene difluoride de acordo com as instruções dos produtores (Amersham). As membranas foram bloqueadas com tampão TBS 1X (NaCl 137mM, Fosfato 10mM, KCL 2,7mM, pH 7,4) contendo 5% de leite, incubada por 1 hora e lavadas por três vezes para retirada do excesso de leite. As membranas foram novamente mergulhadas em tampão TBS 1X contendo 2,5% de leite e posteriormente adicionado o anti-HA (SIGMA, diluição 1:10,000). Após incubação por 1h, novas lavagens foram feitas e por fim adicionado o anticorpo secundário anti-mouse (Sigma, 1:10,000). A detecção foi realizada por quimioluminescência de acordo com a recomendação do fabricante (Amersham).

Valores de porcentagem de concentração relativa das proteínas de movimento associadas à membrana e após os tratamentos alcalinos e salinos foram mensurados com auxílio do programa ImageQuant TL Versão 8.1.0.0. O valor de referência 1

equivalente a 100% foi dado com base na quantificação de pixels dos controles tratados apenas com tampão de lise.

Também foram realizados testes de Western blot para todas as combinações dos ensaios de topologia e BiFC com a utilização de anti-NtGFP e anti-GFP para a detecção das proteínas de interesse. (Figuras suplementares 1, 2, 3 e 4).

RESULTADOS

A proteína NSm dos tospovírus se associa periféricamente com membrana *in vivo*.

Análises *in silico* da NSm de distintos tospovírus pertencentes ao “clado Americano”, foram feitas e possibilitaram identificar regiões hidrofóbicas nas NSm, com a caracterização de resíduo de aspartato (“D-motif”) precedidos por aminoácidos hidrofóbicos localizados no centro da proteína (Silva et al., 2001). Baseado nessa predição e visando analisar a associação da NSm com membranas em ensaios experimentais em plantas, foi realizada em *N.benthamiana*, a expressão transiente das proteínas NSm fusionadas ao epitopo HA, por infiltração de *A.tumefaciens* carregando os correspondentes plasmídeos pMOG800-35S-NSm:HA. Aos 3dpi, as proteínas totais extraídas foram centrifugadas a 10.000Xg para gerar frações ricas em membranas que foram submetidas aos tratamentos químicos descritos na metodologia. Os resultados mostraram que as proteínas NSm dos tospovírus permaneceram associadas a fração membranosa após o tratamento com carbonato de sódio (94% para BeNMV NSm e 100% para CSNV, TCSV e TSWV NSm na fração do “pellet”, Figura 1). No entanto, em tratamentos mais agressivos (solução de ureia 4 M e 7 M) a detecção das NSm ocorreu na fração solúvel (9-18% e 54-92%, respectivamente). Tratamentos alcalinos com ureia e triton X-114 tem sido usados para distinguir-se proteínas de membrana de proteínas microssomais, além disso, permitem identificar se o tipo de associação é transmembrânica ou periférica (Schaad et al., 1997). Esses resultados contrastaram com os dados da amostra controle realizados com a proteína Lep marcada com HA, que representa uma forma de proteína integral de membrana, para a qual a acumulação da referida proteína se verificou exclusivamente nas frações membranosas após os tratamentos mencionados (Figura 1). Estes resultados indicaram que as NSm das quatro espécies de tospovírus se comportam como

proteínas apenas associadas periféricamente à membrana, distinto daquelas integralmente associadas à membrana.

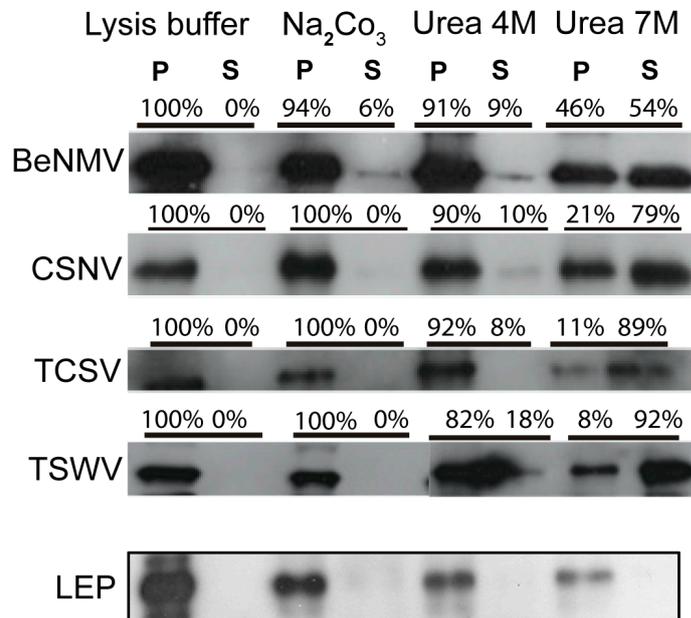


Figura 1. Associação da NSm com membranas celulares em plantas. Segregação em frações membranosas e solúveis da NSm dos vírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), expressa *in planta*. NSm:HA foram expressas em *N.benthamiana* por agroinfiltração. Os tratamentos alcalinos (Na₂CO₃) e salinos (4M e 7M), além de fração do pellet (P) ou sobrenadante (S) marcadas estão indicados. NSm:HA foram analisadas por Western blot usando anticorpo anti-HA (FermentasTM). A proteína transmembranar Lep marcada com HA foi expressa em plantas de *N. benthamiana* e tratada como as proteínas NSm. Valores de quantificação relativa estão apresentados em percentagem.

Associação *in vivo* da NSm dos tospovírus com membrana em células vegetais

Os resultados anteriores indicaram que as quatro NSm dos tospovírus estão associadas, mas não integradas, com as membranas celulares. No entanto, estes resultados não podem discernir em que compartimento subcelular as NSm estão expostas. A fim de elucidar esta questão, ensaios de BiFC foram realizados que permitiram avaliar em quais compartimentos subcelulares os C- e N-terminal das proteínas de movimento estariam localizados. Esta técnica baseia-se na capacidade de dois fragmentos não fluorescentes da EYFP, o N-terminal (NtYFP, 1-154 a.a) e C-terminal (CtYFP, 155-239 a.a) de interagir uns com os outros quando expressos no mesmo compartimento subcelular (Zamyatnin et al., 2006). Um fragmento da proteína EYFP é voltado ao citoplasma (CYFPCyt) e o outro ao lúmen do ER (CtYFPER) e ambos foram coinfiltrados com o fragmento homólogo NtYFP ligado ao N- ou C-

terminal das proteínas NSm dos tospovírus (Figura 2). A reconstituição da fluorescência do EYFP indica a localização, *in vivo*, do inserto fusionado ao EYFP no seu respectivo compartimento. Como esperado, não foi observado sinal de fluorescência quando os dois fragmentos da EYFP foram co-expressos em diferentes compartimentos celulares (NtYFPCyt+CtYFPER ou NtYFPER+CtYFPCyt, Figura 2 B). No entanto, um sinal de fluorescência evidente foi observado quando os dois fragmentos foram co-expressos no ER ou Citoplasma (NtYFPER+CtYFPER ou NtYFCyt+CtYFCyt, Figura 2 B). Em seguida, fusionamos o NtYFP ou o CtYFP ao N ou C-terminal de diferentes NSm, e as proteínas quiméricas resultantes foram co-expressas com a correspondente contraparte de direcionamento ao citosol (CtYFPcyt ou NtYFPcyt) ou para o lúmen do ER (CtYFPper ou NtYFPper), mediante a infiltração de *N.benthamiana*. Reconstituição da fluorescência foi apenas observada quando os quiméricos, contendo o fragmento NtYFP fusionado ao N- ou C-terminal, foram co-expressos com a CtYFPcyt, indicando que, os terminais de todas as proteínas NSm foram expostos ao compartimento citosólico (Figura 2 A e C). A expressão das proteínas NSm foi confirmada por Western blot, utilizando anticorpos específicos que reconhecem o C ou N-terminal da proteína EYFP (Figura suplementar 1).

Em conjunto, estes resultados sugerem que as quatro proteínas NSm dos tospovírus são periféricamente associadas a membrana, provavelmente através da região central hidrofóbica, ([Silva et al., 2001](#)) em conjunto com o domínio coiled-coil ([Singh et al., 2014](#)) com ambos terminais dessas moléculas orientados na direção da face citoplasmática das membranas biológicas.

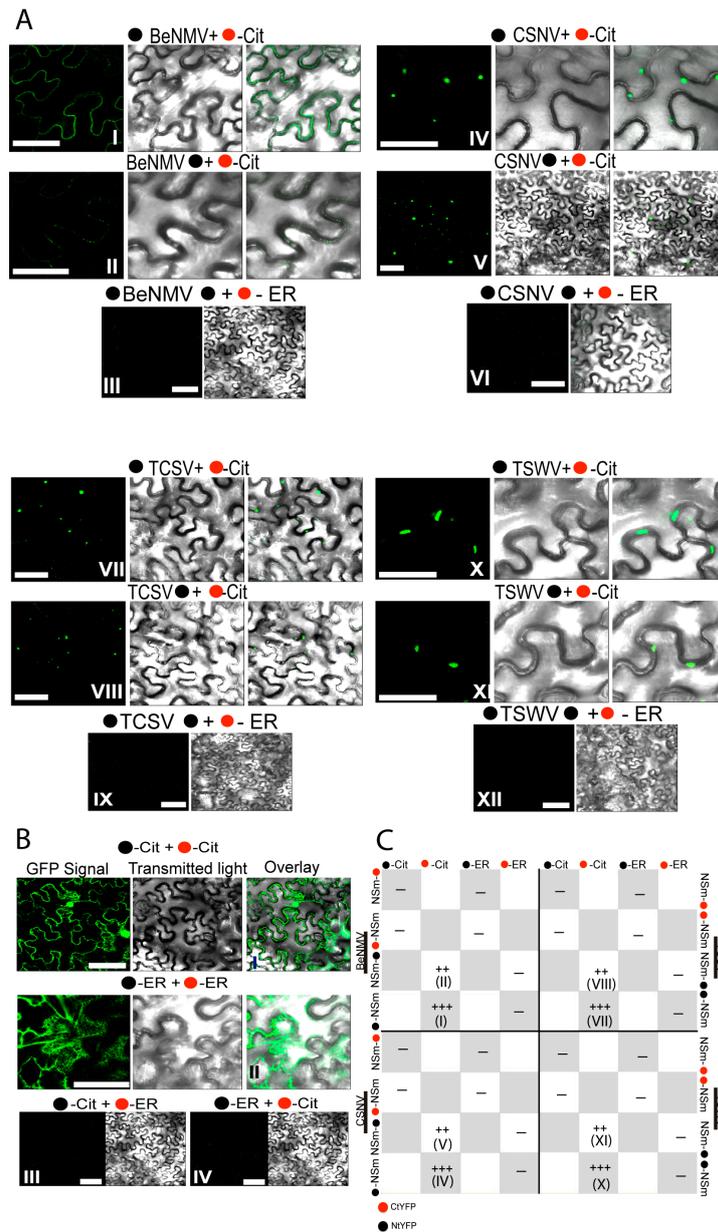


Figura 2. Associação *in vivo* da proteína N_{Sm} com membrana (ER) em células vegetais. A) Localização subcelular (Citoplasma ou lúmen do ER) do N e C terminal das proteínas de movimento dos vírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). A proteína N_{Sm} carregando fragmentos do N-terminal (●) ou C terminal (●) da YFP fusionada ao seu N- (●/●-NSm) ou C-terminal (NSm-●/●), foram co-expressas transientemente em planta com o complementar correspondente fragmento da EYFP endereçado ao citoplasma (●-Cit ou ●-Cit) ou lúmen do ER (●-ER ou ●-ER). Imagens revelam a topologia do N-terminal (I, IV, VII e X) ou C-terminal (II, V, VIII e XI) da proteína N_{Sm}. Controles Positivos e negativos estão indicados em A e B. Da esquerda para a direita, imagens de fluorescência da GFP, campo claro e imagens sobrepostas estão demonstradas. C) tabela sintetiza todas as interações realizadas, símbolos -,+,++ e +++ correspondem aos sinais de ausência, de baixa, média ou alta fluorescência, respectivamente. A fluorescência foi visualizada a 4 dpi com auxílio do microscópio confocal Leica TCS SL.

Interações homólogas e heterólogas entre as proteínas NSm e N dos tospovírus *in planta*.

Antes de prosseguir com a análise de BiFC, determinamos a localização subcelular das proteínas N e NSm. Para este propósito, fusionamos a proteína GFP no C-terminal das proteínas em estudo e a proteína quimérica resultante foi transientemente expressa *in planta* por agroinfiltração. O sinal de fluorescência visualizado 3 dpi, revelou um padrão semelhante de localização para todas as NSm analisadas, sendo localizada na periferia da célula e com a presença de pequenos pontos agregados, o que poderia corresponder a localização no PD (Figura 3A).

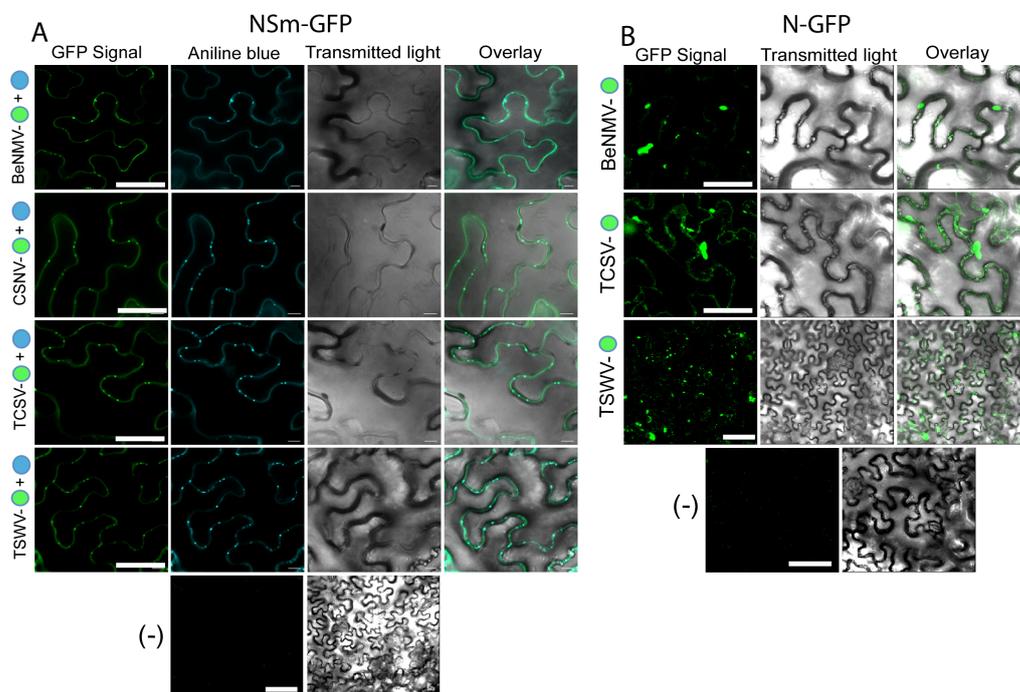


Figura 3. Localização subcelular das proteínas NSm (A) e N (B) dos tospovírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), carregando GFP (●) fusionado ao seu extremo C-terminal. Fluorescência monitorada em folhas de *N. benthamiana* 3dpi com auxílio do microscópio confocal Leica TCS SL. No caso da proteína NSm, depósito de calose em folhas de *N. benthamiana* infiltradas foram marcados usando Aniline blue (●). A proteína NSm e o fluorocromo acumularam em similiar local na periferia da célula, sugerindo que as NSm se acumulam no PD. Da esquerda para direita, imagem de fluorescência da GFP, marcação de calose, campo claro e sobreposição das imagens. Barras grossas e finas correspondem a 50 µm and 10 µm, respectivamente.

Para confirmar se os pontos de localização da NSm correspondem a localização nos PD, foi feita marcação de regiões ricas em calose com fluorocromo “Aniline blue” em folhas de *N. benthamiana* expressando NSm:GFP. Observamos co-

localização da NSm:GFP com depósitos de calose no PD, indicando que as quatro NSm em estudo se associam com PD. Em contraste, todas as proteínas N expressas resultaram na formação de aglomerados de tamanhos diferentes no citoplasma de células (Figura 3B).

Multimerização das proteínas NSm e N e conjunto de interações entre N-NSm, foram relatados para TSWV ([Dietzgen et al., 2012](#); [Soellick et al., 2000](#); [Storms et al., 1995](#); [Uhrig et al., 1999](#)). Levando em consideração estes aspectos, nós decidimos avaliar, por BiFC, a capacidade das proteínas de diferentes espécies em formar dímeros e de se associarem entre elas, *in vivo*, além da possibilidade de interação de distintas proteínas entre espécies diferentes de tospovírus. Antes da análise por BiFC, foram utilizadas as proteínas NSm e N de TSWV como controle positivo, para reproduzir as interações reportados anteriormente para dimerização da NSm ([Storms et al., 1995](#)) e N ([Uhrig et al., 1999](#)), e para interação NSm-N ([Soellick et al., 2000](#)). Nós avaliamos a melhor combinação em uma análise de melhor retorno de fluorescência resultante da fusão N- ou C-terminal do CtYFP/NtYFP à proteína de interesse. Para isso, procedemos a fusão do NtYFP ou CtYFP ao extremo N- ou C-terminal da proteína NSm dos vírus TSWV e BeNMV e para a proteína N de BeNMV. Expressão transiente de proteínas fusionadas em diferentes pares de combinação foi realizado por agroinfiltração das folhas de *N.benthamiana* (Figura 4B). Para a formação de dímeros, observamos que a proteína N não têm preferência para a localização do fragmento EYFP, observando uma reconstituição evidente de fluorescência em todas as combinações de proteínas de fusão analisadas (Figura 4 A). No entanto, a formação de dímeros da NSm foi mais restritiva, uma vez que a fluorescência foi observada apenas em duas das quatro combinações testadas, correspondendo aos pares de fusão: NtYFP-NSm+NSm-CtYFP e CtYFP-NSm+NSm-NtYFP (Figuras 4A e B). Para a interação NSm-N, observamos reconstituição da fluorescência apenas em duas das oito combinações testadas, correspondendo aos pares de proteínas de fusão: CtYFP-N+NSm-NtYFP e N-NtYFP +CtYFP-NSm. Com base nos resultados acima, as construções NtYFPNSm+NSm-CtYFP e NtYFP-N+CtYFP-N foram selecionados para formação dímera e heterodímera das proteínas NSm e N, entretanto, o par CtYFP-N+NSm-NtYFP foi selecionado para a interação N-NSm (Figura 4 B).

Em ensaio de BiFC dirigido a analisar a dimerização da NSm, observou-se uma clara reconstituição de fluorescências para todas as interações dímeras (Figura 5

A), indicando que a capacidade da N_{Sm} dos tospovírus para formar dímeros, pode ser

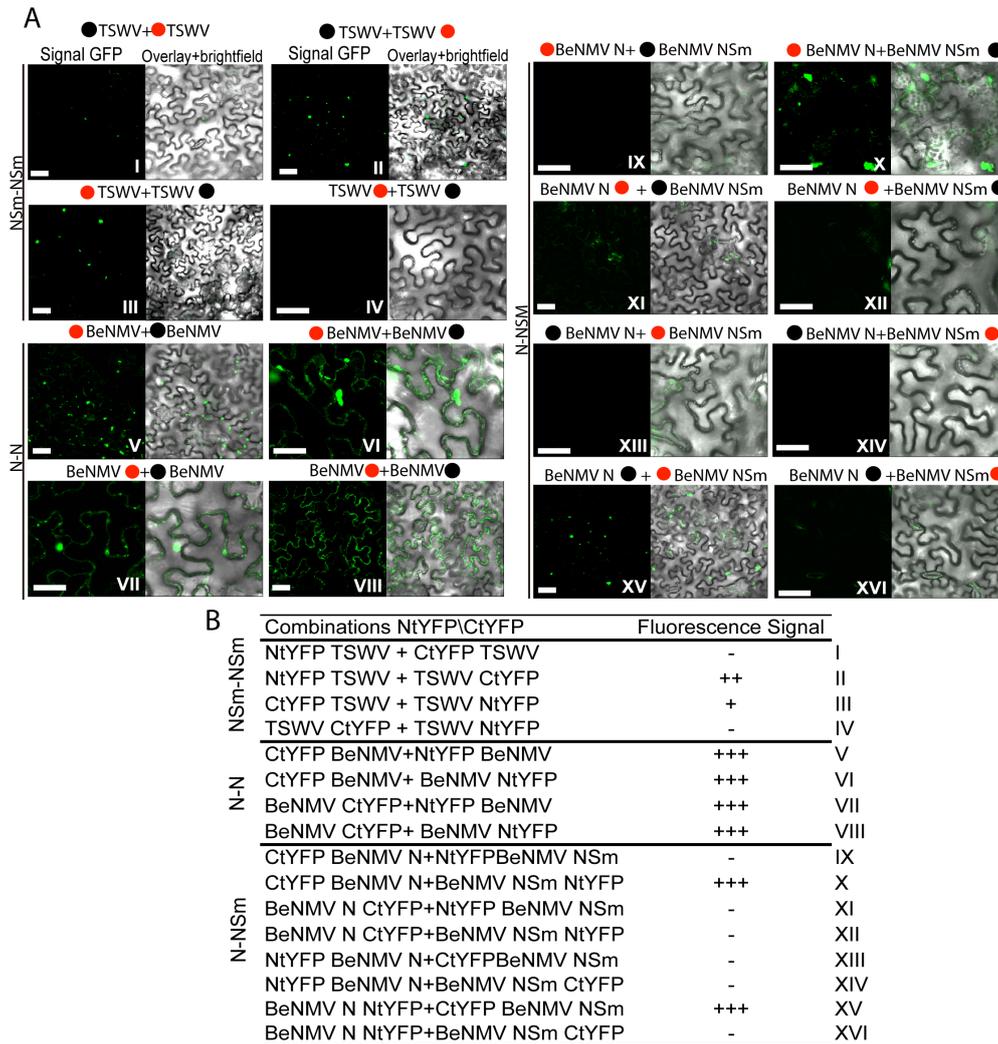


Figura 4. Determinação da localização mais eficiente para fusão dos dois fragmentos da YFP visando o estudo das interações entre proteínas de movimento (N_{Sm}-N_{Sm}), proteínas do nucleocapsídeo (N-N) e interação de proteínas (N_{Sm}-N) por BiFC. A proteína N e/ou N_{Sm} carregando fragmentos do N-terminal (●) ou C terminal (●) da YFP fusionada ao seu N- (●/●-N_{Sm}; ●/●-N) ou C-terminal (N_{Sm}-●/●; N-●/●), foram co-expressas transientemente em folhas de *N. benthamiana* por agroinfiltração. Para a dimerização da N_{Sm}, selecionamos a proteína de movimento de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), entretanto para as interações N-N e N_{Sm}-N, foram selecionadas ambas as proteínas do vírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV). **A)** Imagens de microscopia confocal que correspondem às diferentes combinações de proteínas de fusão testadas para as interações N_{Sm}-N_{Sm}, N-N e N_{Sm}-N. **B)** tabela sintetiza todas as interações realizadas, símbolos -,+,++ e +++ correspondem aos sinais de ausência, de baixa, média ou alta fluorescência, respectivamente. A fluorescência foi visualizada 4 dpi com auxílio do microscópio confocal Leica TCS SL. Números romanos de I a XVI correspondem as imagens apresentadas em A.

uma propriedade geral do gênero. O sinal de fluorescência foi encaminhado à periferia da célula, assemelhando-se aos resultados obtido na localização subcelular, embora a fluorescência também tenha se apresentado dispersa no citoplasma, estando

estritamente localizada ao redor dos cloroplastos (dados não mostrado). Além disso, foi analisada a capacidade das proteínas NSm para formar heterodímeros, e uma reconstituição evidente de fluorescência foi observada para todas as combinações, exceto para o NSm do BeNMV que demonstrou ausência de fluorescência em combinação com todas as demais NSm (Figura 5 B).

Resultados negativos semelhantes foram obtidos utilizando outra fusão nas combinações (Ex: CtYFP-NSm+NSm-NtYFP, dados não mostrados). No que diz respeito a proteína N, reconstituição de fluorescência com forte sinal foi observada para todas as combinações de dímeros e heterodímeros (Figuras 5C e D), reproduzindo o mesmo padrão de fluorescência obtido com a proteína N fusionada ao eGFP. Não foi observada fluorescência quando as proteínas de fusão CtYFP-N foram co-expressas com o NtYFP Cyt (controle negativo). Estes resultados indicam que as proteínas N dos tospovírus são mais permissivas para heterodimerização do que a NSm.

Finalmente, analisamos a interação NSm-N entre proteínas da mesma (intra-associação) ou diferentes (inter-associação) espécies de tospovírus. Reconstituição da fluorescência foi observada em todas as combinações intra e inter-associação das proteínas NSm e N (Figura 5F), sendo consistentemente mais intensa entre as interações das proteínas do mesmo vírus (Figuras 5E e F). Sinal difuso de fluorescência foi observado em todas as células analisadas para as combinações NSm-N. Não foi observada fluorescência quando as diferentes proteínas de fusão foram co-expressas com a construção NtYFP_{cyt} BiFC. Em todos os casos, a expressão das proteínas de fusão correspondentes foi confirmada por análise de Western blot, utilizando anticorpos específicos que reconhecem o N- ou C-terminal da EYFP (Figuras suplementares 2, 3 e 4).

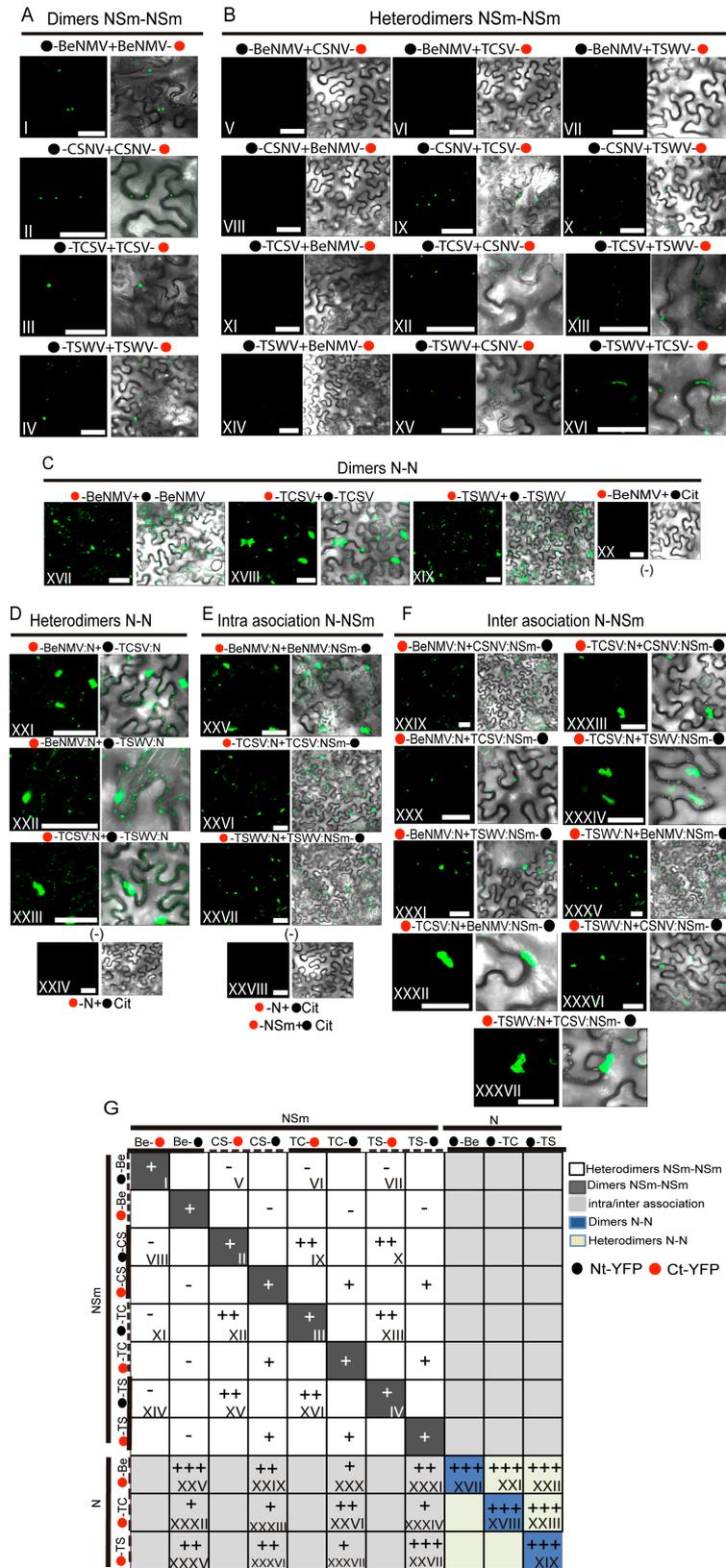


Figura 5. Análise BiFC da interação entre as proteínas de movimento (NSm), proteínas do nucleocapsídeo (N). Interações dimeras (A e C), heterodimeras (B e D), intra-associação (E) e inter-associação (F) das proteínas NSm e N das espécies de tospovírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot*

virus (TCSV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). A proteína N e/ou NSm carregando fragmentos do N-terminal (●) ou C terminal (●) da YFP fusionada ao seu N- (●/●-NSm; ●/●-N) ou C-terminal (NSm-●/●; N-●/●), foram co-expressas transientemente em folhas de *N.benthamiana* por agroinfiltração. Imagens de microscopia confocal que correspondem às diferentes combinações de proteínas de fusão estão indicadas na parte superior de cada imagem. Todas as imagens contêm duas imagens correspondentes a fluorescência individual da YFP ou em conjunto com o campo claro. G) tabela sintetiza todas as interações realizadas, símbolos -,+,++ e +++ correspondem aos sinais de ausência, de baixa, média ou alta fluorescência, respectivamente. A fluorescência foi visualizada 4 dpi com auxílio do microscópio confocal Leica TCS SL. Números romanos de I a XXXVII correspondem as imagens apresentadas em A, B, C, D, E e F. Be, CS, TC e TS correspondem respectivamente aos acrônimos BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV. Os controles negativos correspondem à expressão da NSm e N em combinação com vetores Cyt BiFC (números XX, XXIV e XXVII). Barras correspondem a 50 µm.

DISCUSSÃO

Tospovírus apresentam uma ampla diversidade, sendo um gênero de vírus de orientação genômica senso negativa cujos membros infectam plantas. Devido possuírem genoma de RNA negativo, a indisponibilidade de um sistema de genética reversa tem limitado significativamente o estudo mais aprofundado do ciclo de infecção viral. Portanto, a elucidação das funções das proteínas dos tospovírus tem sido impossibilitada por décadas desde a apresentação da sequência genômica completa do TSWV no início dos anos 90 ([Kormelink et al., 1993](#)). Além disso, as interações entre tospovírus que são esperadas acontecer no campo em processo de infecção mista são pouco compreendidas. No presente estudo, nós selecionamos quatro tospovírus que diferem no seu genoma e em sua gama de plantas hospedeiras e duas de suas proteínas que desempenham um papel direto durante o transporte do vírus (proteína de movimento-NSm, e proteína do nucleocapsídeo-N) para estudo. A elucidação de características biológicas e moleculares dessas proteínas, podem auxiliar na análise de diferentes propriedades (topologia de membrana e interações entre moléculas) que poderiam contribuir para o entendimento dos processos de infecção mista e/ou a especificidade viral com plantas hospedeiras.

A análise de topologia de membrana revelou que as proteínas de movimento das quatro espécies de tospovírus estudadas, são proteínas associadas com a face periférica da membrana celular. A expressão de proteínas NSm dos quatro tospovírus, *in vivo*, e subsequentes tratamentos químicos envolvidos na remoção da proteína a partir das frações de membrana, revelou que a proteína estava na fração membranosa após o tratamento com ureia 4M. Empregando-se um tratamento mais agressivo (7M

de ureia), uma grande proporção das proteínas NSm foi encontrada na fração solúvel, em contraste com a proteína de membrana integral Lep que permaneceu na fração membranosa. Estes resultados indicam que as quatro proteínas NSm aqui analisadas, estão fortemente associadas às membranas biológicas, porém, não representam uma classe de proteína integrais de membrana. Similiar observação foi reportada recentemente para a NSm do vírus *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) ([Singh et al., 2014](#)), embora, nesse caso, os autores deixam em aberto a possibilidade de que a NSm possa ser uma proteína integral de membrana. No nosso caso, a remoção das proteínas da fração da membrana pelo tratamento mais agressivo com ureia 7M, indica que essas não são integralmente associadas as membranas celulares. Semelhante padrão de proteína associada a membrana tem sido relatado para outros membros da família 30K, incluindo a MP do *Prunus necrotic ringspot virus* ([Martínez-Gil et al., 2009](#)) e, mais recentemente, a MP do *Tabacco mosaic virus*, o membro tipo da família 30K ([Peiro et al., 2014](#)). No caso do TMV, o modelo de topologia reportado anteriormente caracterizava a MP como sendo uma proteína integral de membrana do ER ([Brill et al., 2000](#)), porém, recentemente, foi re-enquadrada como uma proteína associada de forma periférica à membrana com exposição ao compartimento citoplasmático ([Peiro et al., 2014](#)).

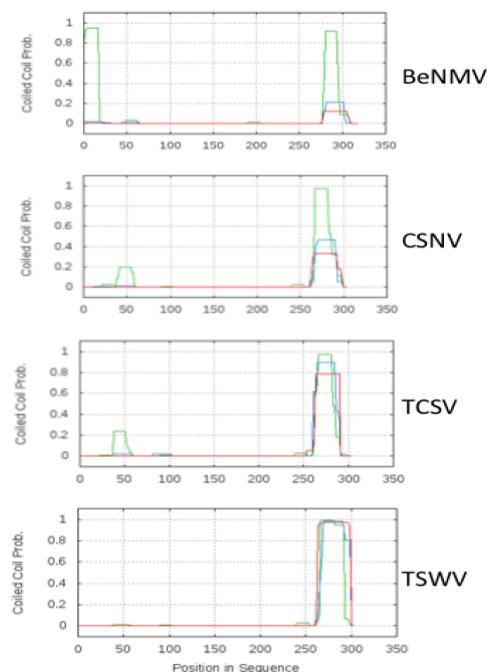


Figura 6. Análise de domínio coiled-coil da proteína NSm. O domínio coiled-coil da proteína de movimento dos tospovírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Tomato*

spotted wilt virus (TSWV) foram identificados com base em predições a partir do servidor coiled-coil (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils>). As linhas verde, azul e vermelha representam os resultados obtidos com as janelas dos resíduos 14, 21 e 28, respectivamente.

A análise de BiFC, conduzida para se determinar o compartimento celular, nos quais as proteínas NSm estão expostas, revelou que ambos extremos N- e C-terminais das quatro proteínas em estudo, estão localizados no citoplasma. Curiosamente, [Singh et al., \(2014\)](#) propuseram que a NSm do GBNV está associada à membrana através do domínio coiled-coil do seu extremo C-terminal. Análises *in silico*, revelaram um domínio coiled-coil presentes nas quatro NSm analisadas (Figura 6), indicando que esta região C-terminal poderia ser a responsável pela interação da proteína com a membrana.

Estes resultados, juntamente com a observação de que a NSm dos tospovírus co-localizam com ER ([Dietzgen et al., 2012](#)), além do relato do domínio hidrofóbico localizado próximo a região central da proteína ([Silva et al., 2001](#)), favoreceu a proposta de um modelo topológico de interação de NSm com membrana, em que as proteínas estão intimamente associadas com a face citosólica da membrana do ER. Este modelo está de acordo com a topologia relatada para outros membros da família 30K ([Lacorte et al., 2007](#); [Martínez-Gil et al., 2009](#); [Peiro et al., 2014](#); [Silva et al., 2001](#)). A observação de que a estrutura secundária de membros da família 30K compartilham uma estrutura comum ([Melcher, 2000](#)), em conjunto com a capacidade das MPs de nove diferentes gêneros de ser funcionalmente permutável compartilhando de um mesmo sistema viral para movimentação célula a célula e sistêmico ([Fajardo et al., 2013](#); [Peiro et al., 2014](#); [Sanchez-Navarro et al., 2010](#); [Sanchez-Navarro et al., 2006](#)), apoia a ideia de que a topologia associada à membrana pode ser uma propriedade geral de todos os membros da família 30K. Essa ideia favorece a argumentação de que a topologia da NSm não poderia explicar a diferente gama de hospedeiros observada, não só entre as quatro espécies de tospovírus aqui analisadas, mas também entre os demais membros da família 30K. No entanto, a mesma topologia pode ser um pré-requisito para interações compatíveis entre diferentes MPs durante processos de infecções mistas.

Infecção mista favorece o rearranjo genético entre espécies virais ([Roossinck, 1997](#)), e também, em algumas situações, potencializa a atuação dos vírus no processo de infecção ([Bag et al., 2012](#); [García-Cano et al., 2006](#)). Portanto, neste estudo nós avaliamos a interação entre as proteínas de movimento e do nucleocapsídeo de

distintas espécies do gênero *Tospovirus*, enfatizando a dimerização e heterodimerização entre homólogos e heterólogos dessas proteínas. Primeiramente, observamos que a localização dos dois fragmentos de EYFP (BiFC) em proteínas quiméricas NSm e N é um importante fator a ser considerado, ao menos para a dimerização da NSm e para interações NSm-N, sugerindo limitações topológicas para estas interações. Observamos dimerização de todas NSm e N analisadas e para as interações NSm-N entre proteínas da mesma espécie. Nossos resultados em conjunto com os resultados relatados para TSWV ([Soellick et al., 2000](#)) e *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) ([Dietzgen et al., 2012](#)) permitem inferir que tais interações podem ser estendidas para o restante dos membros do gênero. No caso da interação NSm-N, para outras MPs da família 30K, esta tem sido demonstrada específica na interação com a cognata proteína da capa, através da região C-terminal ([Aparicio et al., 2006](#); [Carvalho et al., 2003](#); [Sanchez-Navarro et al., 2006](#); [Stavolone et al., 2005](#)). A partir destas observações, podemos especular que o reconhecimento da partícula viral, ocorre, provavelmente pelo C-terminal das MPs da família 30K, embora o domínio específico da proteína NSm responsável por essa interação é ainda desconhecido. No caso da MP do vírus *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), a interação entre MP e CP é mediada através da proteína associada ao vírion (CP) e ao domínio coiled-coil localizado no C-terminal da MP ([Stavolone et al., 2005](#)). Interessante destacarmos que todas as NSm dos tospovírus analisadas aqui, possuem um domínio coiled-coil predito na região C-terminal, representando uma região potencial para interagir com a proteína N. No entanto, a recente observação de que a proteína NSm do GBNV se associaria com a membrana através do domínio coiled-coil do C-terminal ([Singh et al., 2014](#)) questiona se esta região possa permitir tantas funções.

A análise BiFC dirigida para a formação de heterodímeros entre as proteínas NSm ou N, revelou que as proteínas N, foram capazes de formar heterodímeros entre as três proteínas analisadas (BeNMV-N+TCSV-N, BeNMV-N+TSWV-N e TSWV-N+TCSV-N), com a intensidade do sinal de fluorescência comparável aos valores obtidos para a formação de dímeros. Estes resultados indicam que a região responsável pela interação entre dímeros das proteínas N é bastante compatível, devido provavelmente ao comando da estrutura terciária. No entanto, a associação heterodímero entre as proteínas NSm revelou interação compatível apenas entre TSWV, CSNV e TCSV. Em contraste, o BeNMV foi incapaz de interagir com outras proteínas NSm heterólogas. Interessante que TSWV, CSNV e TCSV estão agrupados

no mesmo clado no “Novo Mundo”, entretanto, o BeNMV pertence a um novo ramo do “clado Americano” ([de Oliveira et al., 2012](#); [Silva et al., 2001](#)). Esta observação apóia a idéia de que interação compatível da NSm ocorre apenas entre os vírus que são filogeneticamente próximos. É digno de mencionar que BeNMV apresenta características moleculares e biológicas que são peculiares e diferentes da maioria das espécies do gênero, o qual o coloca em um novo ramo do "grupo Americano" ([de Oliveira et al., 2012](#)). Além disso, estes resultados sugerem que a NSm do BeNMV poderia ter um papel importante na baixa gama de plantas hospedeiras relatadas para este vírus.

Por fim, analisamos a interação heteróloga entre as proteínas NSm e N. Observamos que todas as proteínas NSm analisadas são capazes de interagir com as três proteínas heterólogas N testadas, indicando que a NSm não discrimina partículas de vírus (RNP), incluindo os membros do "Novo Mundo" (TSWV, CSNV, TCSV) agrupados em um clado e BeNMV colocado em um novo ramo. Este comportamento difere significativamente do que é observado em outras MPs da família 30K, em que as MPs dos vírus AMV, BMV, CMV e PNRSV interagem com a cognata CP, mas não com as CPs heterólogas ([Aparicio et al., 2010](#); [Nagano et al., 1997](#); [Sanchez-Navarro and Bol, 2001](#); [Sanchez-Navarro et al., 2006](#); [Takeda et al., 2004](#)). Estes resultados levantam a questão de saber se a capacidade da NSm para interagir com proteínas heterólogas N é uma peculiaridade do gênero *Tospovirus* ou poderia ser estendido a outros membros da família 30K. Futuros ensaios devem ser realizados para responder a essas perguntas. Considerando as infecções mistas entre espécies de tospovírus, a interação heteróloga entre proteínas de movimento e do nucleocapsídeo, podem favorecer o sinergismo viral, facilitando a infecção e/ou evolução viral.

Em síntese, apresentamos dados que apoiam a uma topologia da associação de membrana de quatro proteínas NSm de tospovírus, tanto com a orientação do N- e C-terminal da NSm para a face citosólica. Este modelo está de acordo com a topologia relatada para outros MPs da família 30K. Além disso, foram apresentados dados referentes à capacidade das proteínas NSm e N em formar homo e heterodímeros, um aspecto que, em conjunto com a observação de que a NSm interage com as proteínas N cognatas e heterólogas, poderia dar uma nova compreensão da biologia dos tospovírus e suas interações em processo de infecções mistas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Adkins, S. (2000). Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. *Mol Plant Pathol* 1:151-157.
- Amari, K., Vazquez, F., and Heinlein, M. (2012). Manipulation of plant host susceptibility: an emerging role for viral movement proteins? *Frontiers in plant science* 3:10.
- Aparicio, F., Pallas, V., and Sanchez-Navarro, J. (2010). Implication of the C terminus of the Prunus necrotic ringspot virus movement protein in cell-to-cell transport and in its interaction with the coat protein. *The Journal of general virology* 91:1865-1870.
- Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J.A., and Pallas, V. (2006). In vitro and in vivo mapping of the Prunus necrotic ringspot virus coat protein C-terminal dimerization domain by bimolecular fluorescence complementation. *The Journal of general virology* 87:1745-1750.
- Bag, S., Mitter, N., Eid, S., and Pappu, H.R. (2012). Complementation between two tospoviruses facilitates the systemic movement of a plant virus silencing suppressor in an otherwise restrictive host. *PloS one* 7:e44803.
- Brill, L.M., Nunn, R.S., Kahn, T.W., Yeager, M., and Beachy, R.N. (2000). Recombinant tobacco mosaic virus movement protein is an RNA-binding, alpha-helical membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7112-7117.
- Brown, J.K., Idris, A.M., Alteri, C., and Stenger, D.C. (2002). Emergence of a New Cucurbit-Infecting Begomovirus Species Capable of Forming Viable Reassortants with Related Viruses in the Squash leaf curl virus Cluster. *Phytopathology* 92:734-742.
- Carvalho, C.M., Wellink, J., Ribeiro, S.G., Goldbach, R.W., and Van Lent, J.W. (2003). The C-terminal region of the movement protein of Cowpea mosaic virus is involved in binding to the large but not to the small coat protein. *The Journal of general virology* 84:2271-2277.
- de Oliveira, A.S., Melo, F.L., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., Kitajima, E.W., and Resende, R.O. (2012). Characterization of bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the Genus Tospovirus. *PloS one* 7:e38634.
- Dickert, F.L., Hayden, O., Bindeus, R., Mann, K.J., Blaas, D., and Waigmann, E. (2004). Bioimprinted QCM sensors for virus detection-screening of plant sap. *Analytical and bioanalytical chemistry* 378:1929-1934.
- Dietzgen, R.G., Martin, K.M., Anderson, G., and Goodin, M.M. (2012). In planta localization and interactions of impatiens necrotic spot tospovirus proteins. *The Journal of general virology* 93:2490-2495.
- Fajardo, T.V., Peiro, A., Pallas, V., and Sanchez-Navarro, J. (2013). Systemic transport of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family. *The Journal of general virology* 94:677-681.
- García-Cano, E., Resende, R.O., Fernández-Muñoz, R., and Moriones, E. (2006). Synergistic Interaction Between Tomato chlorosis virus and Tomato spotted wilt virus Results in Breakdown of Resistance in Tomato. *Phytopathology* 96:1263-1269.
- Genovés, A., Pallás, V., and Navarro, J.A. (2011). Contribution of topology determinants of a viral movement protein to its membrane association, intracellular traffic, and viral cell-to-cell movement. *Journal of virology* 85:7797-7809.
- Heinlein, M., and Epel, B.L. (2004). Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. *Int Rev Cytol* 235:93-164.
- Herranz, M.C., Sanchez-Navarro, J.A., Aparicio, F., and Pallas, V. (2005). Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *Journal of virological methods* 124:49-55.
- Idris, A.M., and Brown, J.K. (2004). Cotton leaf crumple virus Is a Distinct Western Hemisphere Begomovirus Species with Complex Evolutionary Relationships Indicative of Recombination and Reassortment. *Phytopathology* 94:1068-1074.

- Idris, A.M., Mills-Lujan, K., Martin, K., and Brown, J.K. (2008). Melon chlorotic leaf curl virus: characterization and differential reassortment with closest relatives reveal adaptive virulence in the squash leaf curl virus clade and host shifting by the host-restricted bean calico mosaic virus. *Journal of virology* 82:1959-1967.
- Kormelink, R., de Haan, P., Meurs, C., Peters, D., and Goldbach, R. (1993). The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *The Journal of general virology* 74 (Pt 4):790.
- Kormelink, R., Storms, M., Van Lent, J., Peters, D., and Goldbach, R. (1994). Expression and subcellular location of the NSM protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* 200:56-65.
- Lacorte, C., Ribeiro, S.G., Lohuis, D., Goldbach, R., and Prins, M. (2007). The nucleoprotein of Tomato spotted wilt virus as protein tag for easy purification and enhanced production of recombinant proteins in plants. *Protein Expr Purif* 55:17-22.
- Lucas, W.J. (2006). Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344:169-184.
- Martínez-Gil, L., Sánchez-Navarro, J.A., Cruz, A., Pallás, V., Pérez-Gil, J., and Mingarro, I. (2009). Plant virus cell-to-cell movement is not dependent on the transmembrane disposition of its movement protein. *Journal of virology* 83:5535-5543.
- Melcher, U. (2000). The '30K' superfamily of viral movement proteins. *The Journal of general virology* 81:257-266.
- Mullis SW, L.J.D., Gitaitis RD, Sherwood JL, Csinos AC. (2004). First report of *Vidalia* onion (*Allium cepa*) naturally infected with Tomato spotted wilt virus and Iris yellow spot virus (family Bunyaviridae, genus Tospovirus) in Georgia. In: *Plant Disease*. 1285. .
- Nagano, H., Okuno, T., Mise, K., and Furusawa, I. (1997). Deletion of the C-terminal 33 amino acids of cucumber mosaic virus movement protein enables a chimeric brome mosaic virus to move from cell to cell. *Journal of virology* 71:2270-2276.
- Navarro, J.A., Genovés, A., Climent, J., Saurí, A., Martínez-Gil, L., Mingarro, I., and Pallás, V. (2006). RNA-binding properties and membrane insertion of Melon necrotic spot virus (MNSV) double gene block movement proteins. *Virology* 356:57-67.
- Nelson, R.S., and Citovsky, V. (2005). Plant viruses. Invaders of cells and pirates of cellular pathways. *Plant Physiol* 138:1809-1814.
- Pallas, V., and Garcia, J.A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *The Journal of general virology* 92:2691-2705.
- Pappu, H.R., Jones, R.A., and Jain, R.K. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus research* 141:219-236.
- Peiro, A., Martínez-Gil, L., Tamborero, S., Pallas, V., Sánchez-Navarro, J.A., and Mingarro, I. (2014). The Tobacco mosaic virus movement protein associates with but does not integrate into biological membranes. *Journal of virology* 88:3016-3026.
- Pouwels, J., van der Velden, T., Willemsse, J., Borst, J.W., van Lent, J., Bisseling, T., and Wellink, J. (2004). Studies on the origin and structure of tubules made by the movement protein of Cowpea mosaic virus. *The Journal of general virology* 85:3787-3796.
- Roossinck, M.J. (1997). Mechanisms of plant virus evolution. *Annu Rev Phytopathol* 35:191-209.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989-1659.
- Sánchez-Navarro, J., Fajardo, T., Zicca, S., Pallas, V., and Stavelone, L. (2010). Caulimoviridae tubule-guided transport is dictated by movement protein properties. *Journal of virology* 84:4109-4112.
- Sánchez-Navarro, J.A., and Bol, J.F. (2001). Role of the alfalfa mosaic virus movement protein and coat protein in virus transport. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 14:1051-1062.

- Sanchez-Navarro, J.A., Carmen Herranz, M., and Pallas, V. (2006). Cell-to-cell movement of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of Ilar-, bromo-, cucumo-, tobamo- and comoviruses and does not require virion formation. *Virology* 346:66-73.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E., and Carrington, J.C. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* 16:4049-4059.
- Scholthof, K.B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., et al. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 12:938-954.
- Silva, M.S., Martins, C.R., Bezerra, I.C., Nagata, T., de Avila, A.C., and Resende, R.O. (2001). Sequence diversity of NS(M) movement protein of tospoviruses. *Archives of virology* 146:1267-1281.
- Simpson, C., Thomas, C., Findlay, K., Bayer, E., Maule, A.J., 2009. An Arabidopsis GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. *The Plant. cell.* 21, 581-594.
- Singh, P., Indi, S.S., and Savithri, H.S. (2014). Groundnut bud necrosis virus encoded NSm associates with membranes via its C-terminal domain. *PLoS one* 9:e99370.
- Soellick, T., Uhrig, J.F., Bucher, G.L., Kellmann, J.W., and Schreier, P.H. (2000). The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:2373-2378.
- Stavolone, L., Villani, M.E., Leclerc, D., and Hohn, T. (2005). A coiled-coil interaction mediates cauliflower mosaic virus cell-to-cell movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:6219-6224.
- Storms, M.M., Kormelink, R., Peters, D., Van Lent, J.W., and Goldbach, R.W. (1995). The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214:485-493.
- Takeda, A., Kaido, M., Okuno, T., and Mise, K. (2004). The C terminus of the movement protein of Brome mosaic virus controls the requirement for coat protein in cell-to-cell movement and plays a role in long-distance movement. *The Journal of general virology* 85:1751-1761.
- Uhrig, J.F., Soellick, T.R., Minke, C.J., Philipp, C., Kellmann, J.W., and Schreier, P.H. (1999). Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt tospovirus: identification and characterization of two interacting domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:55-60.
- Webster, C.G., Reitz, S.R., Perry, K.L., and Adkins, S. (2011). A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. *Virology* 413:216-225.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N., and Lucas, W.J. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246:377-379.
- Zamyatnin, A.A., Solovyev, A.G., Bozhkov, P.V., Valkonen, J.P., Morozov, S.Y., and Savenkov, E.I. (2006). Assessment of the integral membrane protein topology in living cells. *Plant J* 46:145-154.

FIGURAS SUPLEMENTARES

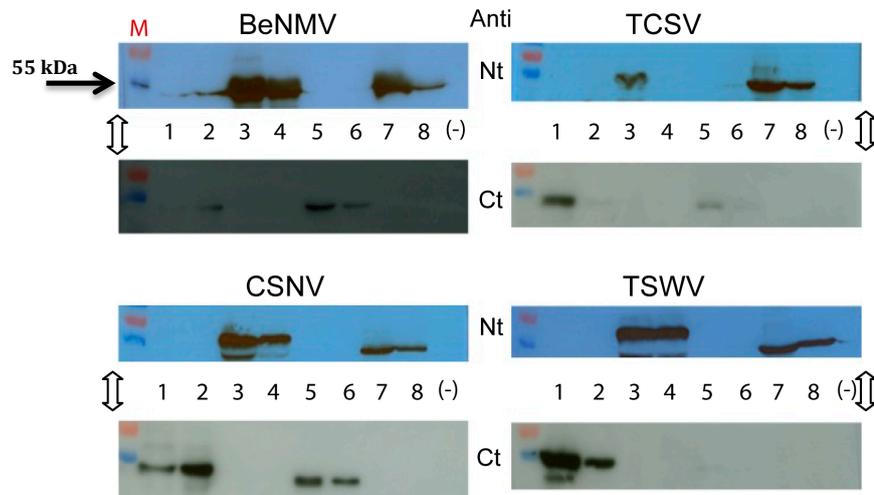


Figura S1: Ensaio BiFC de topologia. Western blot de folhas de *N. benthamiana* infiltrada com N_{Sm} dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV inseridos em vetores BiFC. **M** representa marcado de proteína PageRuler™ prestained protein ladder (Fermentas). Anti Ct e Nt localizado entre as figuras correspondem aos anticorpos usados para marcação para Western blot. Números correspondem a todos os tipos de associações com sua respectivas N_{Sm} fusionadas: 1-N_{Sm}CtYFP+NtYFPCit, 2-N_{Sm}CtYFP+NtYFPre, 3-N_{Sm}NtYFP+CtYFPCit, 4-N_{Sm}NtYFP+CtYFPre, 5-CtYFPN_{Sm}+NtYFPCit, 6-CtYFPN_{Sm}+NtYFPre, 7-NtYFPN_{Sm}+CtYFPCit, 8-NtYFPN_{Sm}+CtYFPre. Setas correspondem a numeração (ordem das amostras) igual tanto para o painel de cima quanto para o respectivo painel abaixo.

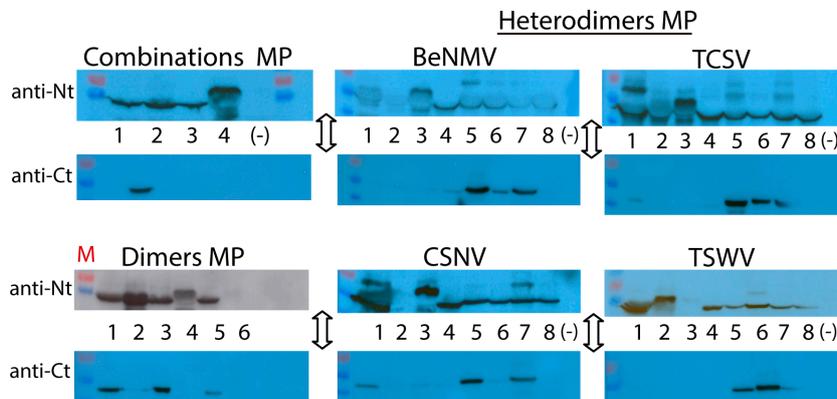


Figura S2: Western blot de folhas de *N. benthamiana* infiltrada com N_{Sm} dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV em ensaio BiFC de dímeros e heterodímeros da MP. **M** representa marcado de proteína PageRuler™ prestained protein ladder (Fermentas). Anti Ct e Nt localizado entre as figuras correspondem aos anticorpos usados para marcação para Western blot. MP combination (1, 2, 3, 4 (-)) corresponde: 1-NtTSWV+CtTSWV, 2-NtTSWV+TSWVCt, 3-NtTSWV+NtTSWV, 4 CtTSWV+TSWVNt e controle negativo. Dimers MP: 1-NtBeNMV+BeNMVCt, 2-CtBeNMV+BeNMVNt, 3-NtCSNV+CSNVcT, 4-CtCSNV+CSNVnt, 5-NtTCSV+TCSVcT, 6-CtTCSV+TCSVnt. Heterodimers MP BeNMV: 1-CtBeNMV+CSNVnt, 2-CtBeNMV+TCSVnt, 3-CtBeNMV+TSWVNt, 4-CtBeNMV+ZLCVNt, 5-NtBeNMV+CSNVcT, 6-NtBeNMV+TCSVcT, 7-

NtBeNMV+TSWVCt, 8-NtBeNMV+ZLCVCt. CSNV: 1-CtCSNV+BeNMVNt, 2-CtCSNV+TCSVNt, 3-CtCSNV+TSWVNt, 4-CtCSNV+ZLCVNt, 5-NtCSNV+BeNMVCt, 6-NtCSNV+TCSVCt, 7-NtCSNV+TSWVCt, 8-NtCSNV+ZLCVCt. TCSV: 1-CtTCSV+BeNMVNt, 2-CtTCSV+CSNVNt, 3-CtTCSV+TSWVNt, 4-CtTCSV+ZLCVNt, 5-NtTCSV+BeNMVCt, 6-NtTCSV+CSNVNt, 7-NtTCSV+TSWVCt, 8-NtTCSV+ZLCVCt e TSWV: 1-CtTSWV+CSNVNt, 2-CtTSWV+TCSVNt, 3-CtTSWV+BeNMVNt, 4-CtTSWV+ZLCVNt, 5-NtTSWV+CSNVNt, 6-NtTSWV+TCSVCt, 7-NtTSWV+BeNMVCt, 8-NtTSWV+ZLCVCt. Setas correspondem a numeração (ordem das amostras) igual tanto para o painel de cima quanto para o respectivo painel a baixo.

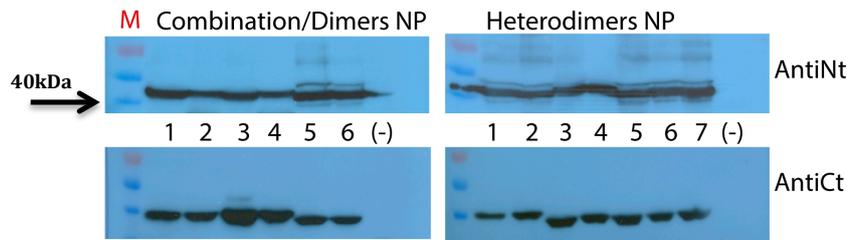


Figura S3: Western blot dos ensaios de dímeros e heterodímeros da proteína N dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV. Western blot de folhas de *N. benthamiana* infiltradas com as NPs inseridas em vetores BiFC. **M** representa marcado de proteína PageRuler™ prestained protein ladder (Fermentas). Anti Ct e Nt localizado entre as figuras correspondem aos anticorpos usados para marcação para Western blot. Samples combinations / NP dimer: 1- CtBeNMVNP+NtBeNMVNP, 2-CtBeNMVNP+BeNMVNPnt, 3- BeNMVNPct+NtBeNMVNP, 4-BeNMVct+BeNMVNPnt, 5-CtTCSVNP+NtTCSVNP, 6- CtTSWVNP+NtTSWVNP, (-) negative control. Heterodimers NP: 1- CtBeNMVNP+NtTCSVNP, 2-CtBeNMVNP+NtTSWVNP, 3-NtBeNMV+CtCSNVNP, 4- NtBeNMVNP+CtTSWVNP, 5-CtTCSVNP+NtTSWVNP, 6-NtTCSVNP+CtTSWVNP, 7- CtTSWVNP+NtTCSVNP, (-) controle negativo.

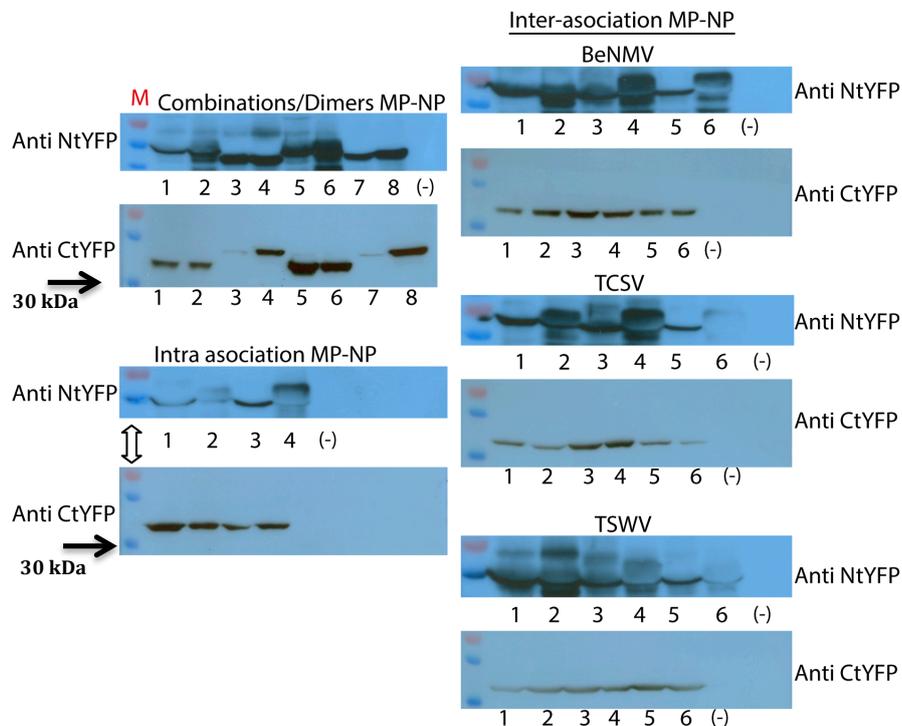


Figura S4: Western blot dos ensaios de dímeros NSm-N, intra/inter-associação NSm e N. Western blot de folhas de *N. benthamiana* infiltradas com NPs e MPs em vetores BiFC dos

vírus BeNMV, CSNV, TCSV, e TSWV. **M** representa marcado de proteína PageRuler™ prestained protein ladder (Fermentas). Anti Ct e Nt localizado na figura correspondem aos anticorpos usados para marcação para Western blot. Combination/Dimer MP-NP: 1-CtBeNMVNP+NtBeNMVmp, 2-CtBeNMVNP+BeNMVmpNt, 3-NtBeNMVNP+CtBeNMVmp, 4-NtBeNMV+BeNMVmpCt, 5-BeNMVNPct+NtBeNMVmp, 6-BeNMVNPct+BeNMVmpNt, 7-BeNMVNPnt+CtBeNMVmp, 8-BeNMVNPnt+BeNMVmpCt. Intra association NP-MP: 1-CtTCSVNP+NtTCSVmp, 2-CtTCSVNP+TCSVmpNt, 3-CtTSWVNP+NtTSWVmp, 4-CtTSWV+TSWVmpNt, (-) Controle negativo. Inter association NP-MP BeNMV: 1-CtBeNMVNP+NtTCSVmp, 2-CtBeNMVNP+TCSVmpNt, 3-CtBeNMVNP+NtCSNVmp, 4-CtBeNMVNP+CSNVmpNt, 5-CtBeNMVNP+NtTSWVmp, 6- CtBeNMVNP+TSWVmpNt, (-) controle negativo. TCSV: 1-CtTCSVNP+NtBeNMVmp, 2-CtTCSVNP+BeNMVmpNt, 3-CtTCSVNP+NtCSNVmp, 4-CtTCSVNP+CSNVmpNt, 5-CtTCSVNP+NtTSWVmp, 6- CtTCSVNP+TSWVmpNt, (-) controle negativo. TSWV: 1-CtTSWVNP+NtBeNMVmp, 2-CtTSWVNP+BeNMVmpNt, 3-CtTSWVNP+NtCSNVmp, 4-CtTSWVNP+CSNVmpNt, 5-CtTSWVNP+NtTCSVmp, 6-CtTSWVNP+TCSVmpNt, (-) controle negativo. Setas correspondem a numeração (ordem das amostras) igual tanto para o painel de cima quanto para o respectivo painel a baixo.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Dr. F. Aparicio (Instituto Biología Molecular y Celular de Plantas, España) por conceder os vetores binários pMOG800 (Cyt) e ao Dr. Jari P.T (Valkonen, University of Helsinki) por conceder os vetores pRT (ER), essenciais para elaboração dos ensaios de topologia. Agradecimentos ao auxílio prestado em bancada para elaboração dos ensaios pela técnica do laboratório Lorena Valencia. Agradecimentos em especial ao Dr. Jesús Angel Sánchez-Navarro (Instituto Biología Molecular y Celular de Plantas, España), por auxílio na elaboração dos experimentos e discussão dos resultados obtidos. Este trabalho foi financiado por BIO 2011-25018, agência da Espanha DGICYT, Capes (Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico) no Programa CsF (Ciência sem Fronteiras) Governo Federal, CNPq e FAP-DF, Brasil.

CAPÍTULO IV

Possível associação da proteína de movimento (NSm) de tospovírus com cloroplastos

No gênero *Tospovirus*, pouco é conhecido sobre o comportamento viral nas células infectadas ou sobre o envolvimento de organelas celulares com o processo de infecção. Existem apenas evidências de expressão isolada das proteínas co-localizando com filamentos de Actina e miosina, Membrana, ER e Complexo de Golgi. Baseado em resultados adicionais obtidos da interação homotípica e heterotípica por BiFC (Capítulo III), observamos a possível associação das NSm dos tospovírus com cloroplasto. Levando em conta esses aspectos, o presente estudo tem como objetivo confirmar a possível associação da NSm dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV com cloroplastos. Para tanto, com ensaios de BiFC (com adição de Tag para encaminhamento ao cloroplasto) e expressão da NSm em vetor viral PVX possibilitou um melhor entendimento da associação da NSm com cloroplasto. Com base nos resultados, nós hipotetizamos o possível envolvimento do cloroplasto como sítio de replicação viral, como observado para outros gêneros de vírus que infectam plantas e/ ou uma das possíveis organelas envolvida com o processo de movimentação intra-celular.

INTRODUÇÃO

Nos estudos dos processos de infecção viral em plantas, por um longo período, a virologia vegetal se manteve focada na análise do processo de infecção viral, com foco principalmente em aspectos do patógeno e “negligenciando” fatores do hospedeiro envolvidos com o processo. Tal fato se deveu, principalmente, à limitações das técnicas de avaliação da interação patógeno-hospedeiro.

Atualmente, o foco no estudo viral, centra-se em uma análise conjunta de fatores do patógeno com a resposta do hospedeiro. Vários estudos tem identificado a associação de proteínas virais com proteínas do hospedeiro em distintos processos de infecção, como na replicação e movimento intra-celular e inter-celular ([Feng et al., 2013](#); [Paape et al., 2006](#); [Wei et al., 2010b](#); [Wei et al., 2013](#)). No processo de replicação viral, para os vírus de RNA senso positivo foi proposta a associação de componentes virais induzindo a formação de vesículas intracelulares ([Kopeck et al., 2007](#)). Estas vesículas provem o ancoramento de complexos de replicação viral (Virus replication complex-VCR) criando um ambiente adequado para a replicação, evitando-se à ativação da resposta de defesa do hospedeiro que pode ser desencadeada pela presença de dsRNA ([Reichel et al., 1998](#); [Wileman, 2006](#)). De acordo com o tipo de vírus, foram caracterizadas diferentes organelas como sítio alvo de formação de vesículas. Dentre elas estão Retículo Endoplasmático, Mitocôndrias, Endossomas, Lisossomas, Peroxissomos e Cloroplastos ([Ahlquist, 2006](#); [Ju et al., 2005](#); [Magliano et al., 1998](#); [McCartney et al., 2005](#); [Prod'homme et al., 2001](#)). No gênero *Potyvirus*, um modelo de replicação com a formação de vesículas em cloroplasto já está bem caracterizado, para o qual, foi proposto o tráfico da proteína 6K do retículo endoplasmático (ER) para periferia dos cloroplastos com ancoramento da 6K no envelope dos cloroplastos em associação com fatores de replicação viral. Nesse caso a intermediação do tráfico parece ser proveniente da associação da proteína 6K com o sistema de actinmiosina ([Wei et al., 2010a](#)).

Em vírus de plantas de RNA senso negativo pouco se sabe sob o envolvimento de organelas com o processo de replicação, sendo indicado, como possível sítio de replicação, o citoplasma da célula, como observado em espécies do gênero *Cytorhabdovirus* ([Jackson et al., 2005](#)). Nesse caso, foi observada a formação de vesículas na região externa do núcleo e brotamento de partículas do retículo endoplasmático com acumulação de viroplasmas no citoplasma ([Bassi M., 1980](#);

[Dietzgen, 1995](#); [Francki R.I.B, 1980](#)). No entanto, curiosamente em espécies do gênero *Nucleorhabdovirus* foi observado como sítio de replicação, o núcleo de células vegetais infectadas. A proteína N desses vírus contém sinais de localização nuclear, que não somente dirigem a proteína ao núcleo, mas também o ribonucleocapsídeo viral que é necessário para estabelecer locais de replicação e montagem viral no núcleo celular ([Jackson et al., 2005](#); [Kuzmin et al., 2009](#)).

Em relação aos tospovírus, a informação disponível é muito limitada sobre o sítio de replicação ou envolvimento de organelas com este processo viral. Existem apenas evidências através da expressão isolada das proteínas virais, co-localizando com filamentos de Actinmiosina, Membrana, ER e Complexo de Golgi ([Dietzgen et al., 2012](#); [Feng et al., 2013](#); [Ribeiro et al., 2009](#)).

O presente estudo buscou elucidar a possível associação da proteína de movimento (NSm) dos tospovírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum stean necrosis virus* (CSNV) *Tomato chlorotic spotted virus* (TCSV) e o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) com cloroplastos durante o processo de infecção. Ensaios de BiFC e de expressão da NSm em vetor *Potato virus X* (PVX) demonstraram a localização da proteína de movimento NSm nos cloroplastos, permitindo a formulação de hipóteses sobre o possível envolvimento de cloroplastos com o processo de replicação ou movimentação viral para as espécies do gênero *Tospovirus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Manipulação do DNA.

Os genes das proteínas de movimento dos vírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV, foram amplificadas a partir dos vetores pGEMT-Easy (NSm) ([de Oliveira et al., 2012](#); [Silva et al., 2001](#)). Primers foram desenhados com sítios de corte *PciI/NheI* e inseridos no extremo 5' e 3' dos genes das proteínas NSm dos vírus BeNMV, TCSV e TSWV, no caso da NSm do CSNV foram adicionados os sítios de *BspHI/NheI*.

Para o ensaio de BiFC, os genes das proteínas NSm amplificadas foram inseridas nos vetores pSK (descrito no Capítulo III) nas seguintes orientações de fusão: pSK:CtYFP-NSm-PoPit, pSK:NtYFP-NSm-PoPit, pSK:NSm-CtYFP-PoPit, pSK:NSm-NtYFP-PoPit. No processo de infiltração, a NSm fusionada ao Ct ou

NtYFP, foi co-infiltrada com a construção pSK-35S-CtYFP:Clo ou pSK-35S-NtYFP:Clo contendo Tag de direcionamento para o cloroplasto. Uma dupla digestão com enzimas *Bam*HI e *Xho*I foi realizada para liberação dos cassetes de todas as construções de MP subclonadas e posteriormente ligadas ao vetor binário pMOG800.

Para o ensaio de localização baseado na infecção viral (a partir de um vetor viral), os genes das proteínas NSm foram amplificados com primers específicos que continham sequências para adição dos sítios *Bam*HI e *Xho*I, além da adição de dois nucleotídeos no primer senso que garantiria a manutenção da “frame C” após recombinação no vetor PVX-GFP-GW ([Lacorte et al., 2007](#)). Inicialmente os genes das proteínas foram clonados em vetor pENTR11TM e posteriormente, pelo sistema GatewayTM com o auxílio da enzima LR Clonase (InvitrogenTM), recombinados em vetor PVX-GFP-GW, de acordo com especificações do fabricante (InvitrogenTM).

Agroinfiltração, microscopia confocal e Western blot.

Os vetores pMOG800 contendo os cassetes de expressão das proteínas NSm foram eletroporados (GenePulser Xcell electroporation system; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) em *A. Tumefaciens* C58C1 ([Hoekema et al., 1983](#)). Culturas de agrobactérias foram crescidas overnight a 28°C, com 10mM de MES (pH:5,6), 10mM de MgCl₂ e 150mM de acetosyringone até atingirem uma densidade ótica final de OD₆₀₀=0.5. As culturas foram posteriormente incubadas por 3h a temperatura ambiente, homogeneizadas, e com auxílio de uma seringa de 1ml, infiltradas na região abaxial das folhas de *N. benthamiana*. A infiltração das folhas foi realizada a partir das combinações de bactérias contendo os plasmídeos inseridos, e contendo o supressor de silenciamento HC-Pro ([Savenkov and Valkonen, 2001](#)). Os vetores PVX-GFP:NSm-GW foram eletroporados em *A. tumefaciens* estirpe GV3101 contendo o “pSouop helper” plasmídeo ([Hellens et al., 2000](#)). As reações de reconstituição de fluorescência para os ensaios com BiFC foram visualizadas a 3 dpi e para o ensaio de localização sistêmica com 5 dpi.

A expressão da GFP e a reconstituição do sinal de fluorescência da YFP a partir das combinações e associações de topologia e BiFC, foram visualizadas com o auxílio do microscópio confocal Leica TCS LS de varredura a Laiser, com excitação de 488 nm e emissão de 510-560 nm.

Proteínas totais foram extraídas das folhas infiltradas com as construções em vetor binário pMOG800 e PVX-GFP:NSm-GW. A extração foi feita como

previamente descrito por [Berger, \(1987\)](#). Proteínas foram separadas por eletroforese em gel (12%) SDS PAGE e transferidas para membranas de polyvinylidene difluoride, seguindo instruções do fabricante (Amersham). As membranas foram bloqueadas em tampão TBS 1X (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, pH de 7.4.) com 5% de leite, incubadas por 1 hora e posteriormente lavadas três vezes para retirar-se o excesso de leite. As membranas foram novamente mergulhadas em tampão TBS 1X contendo 2,5 % de leite, além dos anticorpos anti GFP, Anti Nt-GFP ou Anti Ct-GFP (Sigma, diluição 1:10.000) de acordo com o tramento empregado. Em sequência, as membranas foram incubadas por 1h, novas lavagens foram feitas, e por fim, adicionados os anticorpos secundários anti-mouse ou anti-rabbit (Sigma, diluição 1:10.000). A detecção foi feita por quimioluminescência de acordo com as recomendações do fabricante (Amersham).

RESULTADOS

As proteínas NSm co-localizam na periferia dos cloroplastos.

No capítulo III, foi realizado o estudo das interações das proteínas NSm de quatro tospovírus distintos em associações homólogas e heterólogas entre essas espécies, onde observou-se a localização das NSm testadas na periferia das células (capítulo III Figuras 2, 3, 4 e 5).

Como resultado adicional e complementar do Capítulo III, após a agroinfiltração de plantas de *N. benthamiana* com as construções NSm BiFC (construções detalhadas no capítulo III), observamos uma possível associação das proteínas NSm com a periferia do cloroplasto, para todas as espécies testadas (Figura 1). Os controles positivos e negativos correspondem aos mesmo controle mostrados na Figura 2 do capítulo III.

Com a indicação, via nossos resultados, da possível associação da NSm com a periferia do cloroplastos, testamos o direcionamento da NSm ao cloroplasto com auxílio de uma Tag específica fusionada a contraparte do YFP em vetor pSK.

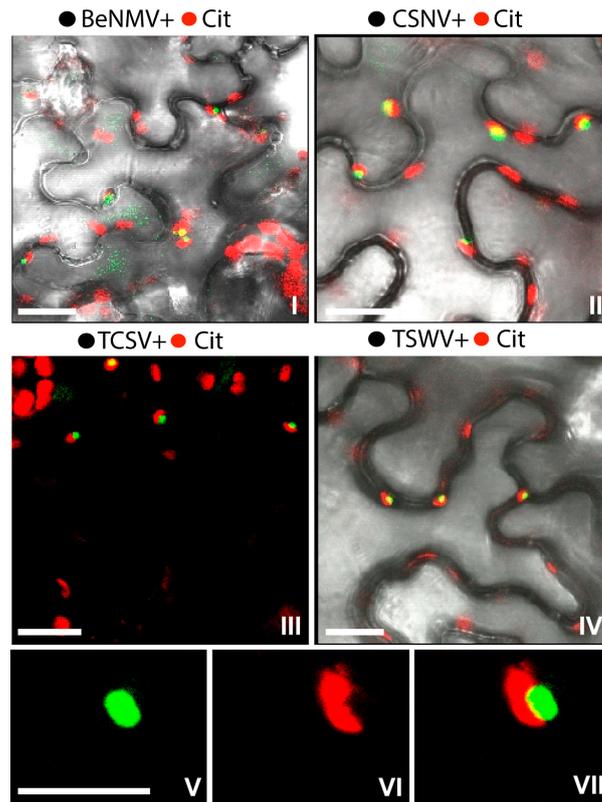


Figura 1. Associação das proteínas de movimento viral (NSm) de tospovírus com cloroplastos. Localização subcelular (cloroplasto) das proteínas de movimento dos vírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). A proteína NSm carregando fragmentos do N-terminal (●) ou C terminal (●) da YFP fusionada ao seu N- (●/●-NSm) ou C-terminal (NSm-●/●), foram co-expressas transientemente em plantas com o fragmento complementar correspondente da EYFP endereçado ao citoplasma (●-Cit ou ●-Cit). Imagens revelam a topologia do N-terminal ou C-terminal da proteína NSm. Imagens sobrepostas estão demonstradas (I, II, III e IV) e da esquerda para a direita, imagens de fluorescência da GFP, campo claro (V, VI e VII) e imagens sobrepostas estão indicadas. A fluorescência foi visualizada a três dpi com auxílio do microscópio confocal Leica TCS SL. Barras 50µm.

Inicialmente, para testar a eficiência das construções pSK-35S-CtYFP:clo e pSK35S-CtYFP:clo, combinações das construções no processo de infiltração em plantas de *N. benthamiana* foram realizadas com os vetores pSK35S-CtYFP:Cit/ER pSK35S-NtYFP:Cit/ER (Capítulo III) resultando nas seguintes associações Cit+Cit, Cit+ER, ER+ER, Cit+Clo, Clo+ER e Clo+Clo, além de Clo-GFP. A recuperação de fluorescência foi observada para todas as associações da YFP direcionadas ao mesmo sítio de localização (Figura 2, PaineI I, III, VI e VIII).

Vetores BiFC com Tag específica para direcionamento para cloroplastos (●-Clo/●-Clo), foram combinados com vetores BiFC contendo as NSm dos tospovírus (●/●-NSm ou NSm-●/●). Aos três dpi, foi visualizada a recuperação de fluorescência em folhas de *N. benthamiana*. As combinações nas quais NtYFP estava fusionado ao extremo C-terminal das proteínas NSm, apenas foi visualizada a recuperação da fluorescência na periferia celular (Figura 2, Painéis X, XII, XIV e XVI). Com a fusão CtYFP ao extremo N-terminal das proteínas NSm, a localização foi claramente no cloroplasto (Figura 2, Frames XI, XII, XV e XVII).

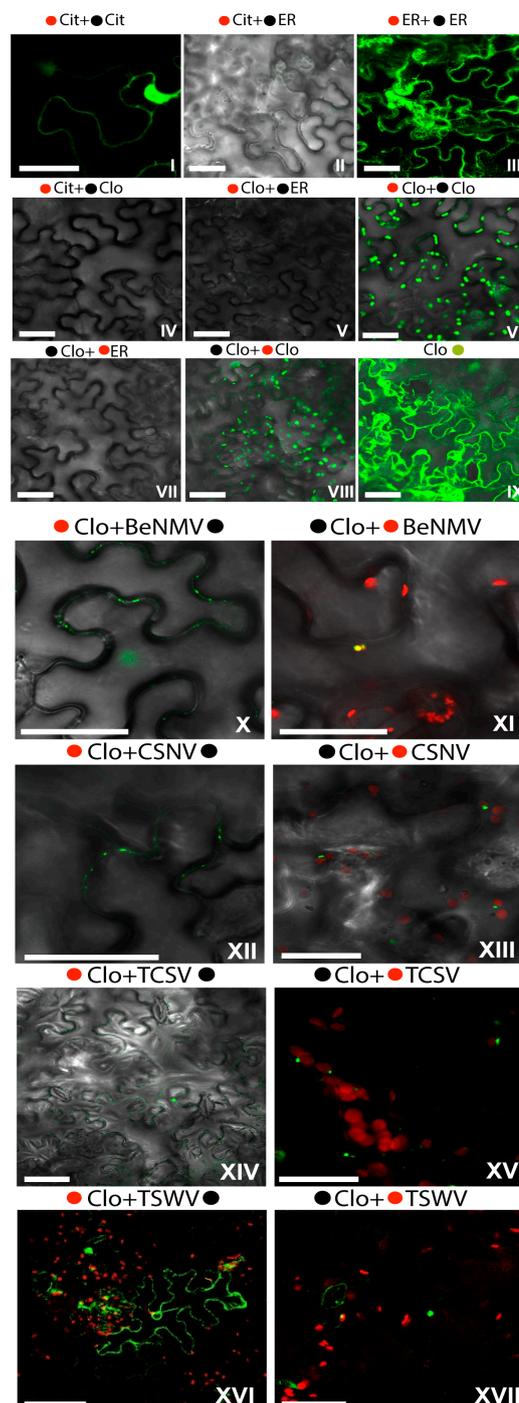


Figura 2. Associação das proteínas de movimento NSm de tospovírus com cloroplastos por sinal (Tag) de direcionamento. Localização subcelular (cloroplasto) das proteínas de movimento dos vírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). A proteína NSm carregando fragmentos do N-terminal (●) ou C terminal (●) da YFP fusionada ao seu N- (●/●-NSm) ou C-terminal (NSm-●/●), foram co-expressas transientemente em planta com o fragmento complementar correspondente da EYFP endereçado ao Cloroplasto (●-Clo/●-Clo) Controles da co-expressão entre construtos ●-Clo ou ●-Clo com ●-Cit/●-Cit e ●-ER/●-ER estão demonstrados. Imagens revelam a topologia do N-terminal ou C-terminal da proteína NSm com cloroplastos. Imagens sobrepostas estão indicadas. Frames I a IX corresponde aos controles e X a XVII as associações ●-NSm-●/●-Clo ou ●-Clo. Todas as combinações estão apresentadas na parte superior das imagens. A fluorescência foi visualizada a três dpi com auxílio do microscópio confocal Leica TCS SL. Barras 50µm.

Os testes de Western blot confirmaram a expressão das proteínas clonadas para todas as combinações testadas (Figura 3).

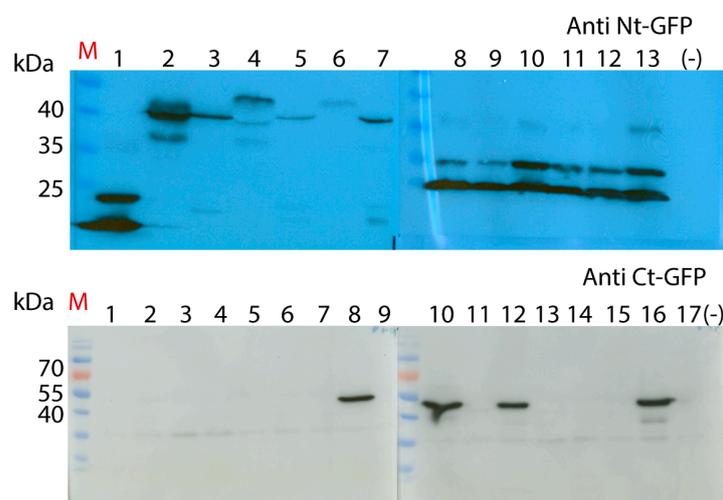


Figura 3: Western blot comprova expressão da Ct/NtYFP fusionada as proteínas de movimento (MPs) de tospovírus. Proteínas totais foram extraídas de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções BiFC Clo+Nt/Ct+NSm. Marcador utilizado PageRuler prestained (Termo Scientific™). Os tamanhos das bandas estão indicados a esquerda da Figura em kDa. Presença da expressão de NtYFP ou CtYFP foram confirmados com anticorpo Anti-NtGFP policlonal e Anti-CtYFP monoclonal (Sigma™). Anti Nt-GFP) 1- CloNt+CICt, 2-CloCt+BeNMVNt, 3-CloCt+NtBeNMV, 4-CloCt+CSNVNt, 5- CloCt+NtCSNV, 6-CloCt+TCSVNt, 7-CloCt+NtTCSV, 8-CloNt+BeNMVct, 9- CloNt+CtBeNMV, 10-CloNt+CSNVct, 11-CloNt+CtCSNV, 12-CloNt+TCSVct, 13- CtTCSV e (-) controle negativo. Anti Ct-GFP) 1-CloNt+CloCt, 2-CloCt+BeNMVNt, 3- CloCt+NtBeNMV, 4- CloCt+CSNVNt, 5- CloCt+NtCSNV, 6-CloCt+TCSVNt, 7- CloCt+NtTCSV, 8-CloNt+BeNMVct, 9- CloNt+CtBeNMV, 10- CloNt+CSNVct, 11- CloNt+CtCSNV, 12- CloNt+TCSVct, 13- CloNt+CtTCSV, 14- CloCt+TSWVNt, 15- CloCt+CtTSWV Nt, 16- CloNt+TCSVct, 17- CloNt+CtTCSV e (-) controle negativo.

As proteínas NSm são endereçadas aos cloroplastos no contexto de infecção viral (Sistema PVX).

A fim de avaliar a sub-localização das proteínas NSm dos tospovírus durante um processo de infecção viral, as NSm foram clonadas em vetor PVX-GFP-GW (Lacorte et al., 2007). Folhas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas e posteriormente a fluorescência da GFP fusionada a NSm foi visualizada. De todos os vetores PVX contendo as NSm BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV, apenas a construção PVX-GFP:TCSV-GW gerou fluorescência. Mostrou localização próxima a periferia celular, possivelmente associados ao plasmodesma, além da presença evidente de fluorescência nos cloroplasto (Figura 4A, Painéis I, II, III, VII e VIII).

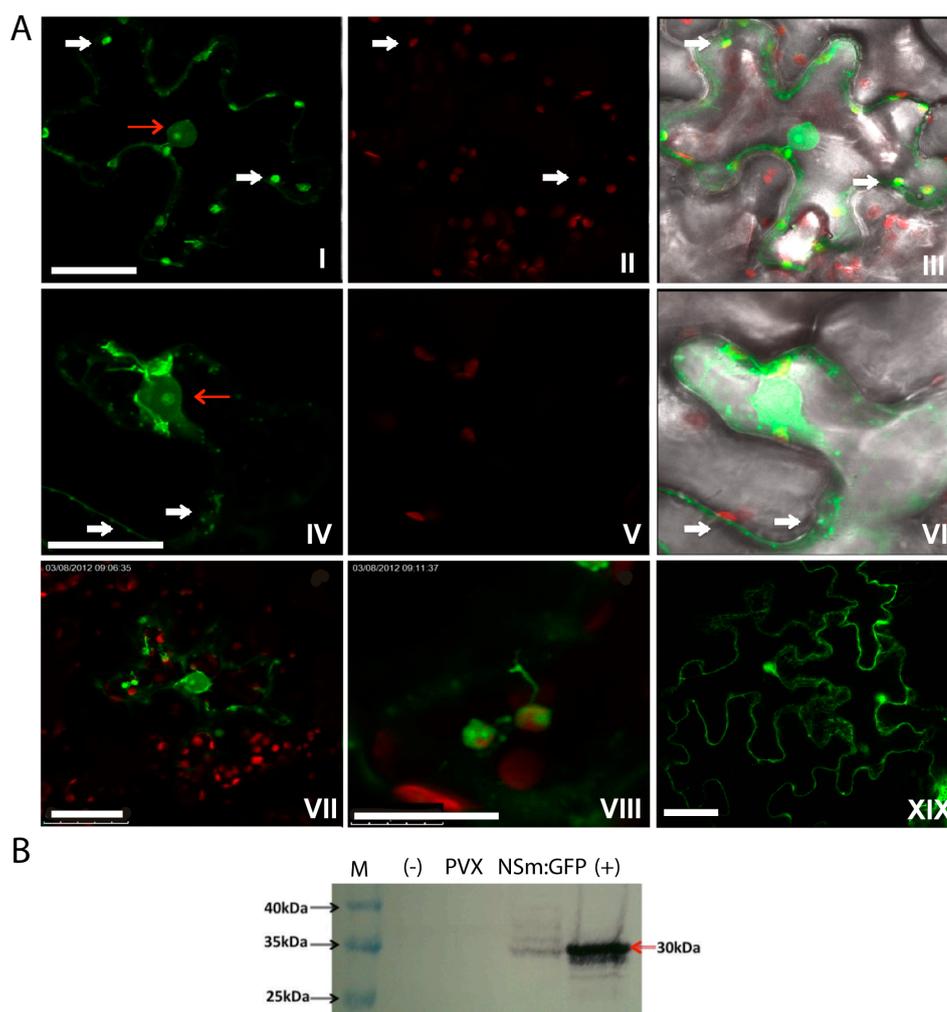


Figura 4: Sublocalização da NSm de tospovírus em processo de infecção viral. A) Expressão da proteína NSm do TCSV em vetor PVX-GFP-GW (Lacorte et al., 2007) agroinfectadas em folhas de *N. benthamiana* aos 3 dpi. Da esquerda para direita imagem de GFP, campo claro e sobreposição é demonstrada. GFP é visualizada expressa próxima a periferia celular, formando pontos de aglomeração (Painéis IV e VI), no núcleo e nucléolo (Painéis I e II) e cloroplasto (Painéis I, III, VII e VIII). Setas brancas indicam fluorescência da GFP no cloroplasto e periferia celular e seta em vermelho aponta núcleo celular. Controle PVX-GFP-GW Wt é indicado (Painel X) com localização dispersa no núcleo e na periferia

celular. Imagens obtidas com auxílio de microscópio confocal Leica TCS LS. Barras 50µm. **B)** Western blot para confirmação de expressão da proteína GFP-NSm em processo de infecção viral via PVX. Extração de proteínas totais, a partir de folhas de *N. benthamiana* 5 dpi. Marcador utilizado PageRuler prestained Thermo Scientific™. O tamanho das bandas do marcador estão demonstrados a esquerda da figura em kDa. (-) planta não infiltrada, (PVX) planta inoculada com vírus PVX, (GFP:NSm) planta infiltrada com a construção PVX-GFP:TCSV-GW, (GFP C+) planta transgênica 16 C expressando GFP.

Também foi visualizado fluorescência no Núcleo e Nucléolo (Figura 4A, Painéis I e IV). O controle PVX-GFP-GW wt apresentou localização difusa no núcleo e periferia celular (Figura 4A, Painéis XIX). Para confirmar a expressão da GFP fusionada a NSm do vírus TCSV, realizou-se Western blot. Diferentes marcações são observadas na amostra GFP/NSm, com a presença de bandas variando de 35 a 40 kDa (Figura 4B).

DISCUSSÃO

Diferentes organelas estão envolvidas com processo de infecção viral ([Ahlquist, 2006](#); [Ju et al., 2005](#); [Magliano et al., 1998](#); [McCartney et al., 2005](#); [Prod'homme et al., 2001](#)). Para o gênero tospovírus no entanto, não existem ainda modelos que definam a interação de proteínas virais com organelas do hospedeiro nos processos de desencapsidação, replicação, movimentação intra-celular e montagem da partícula viral.

No presente estudo, com a utilização da expressão individual das proteínas NSm de quatro espécies distintas de tospovírus e também a expressão destas no contexto do vetor PVX em processo *in vivo* de infecção viral, a localização da NSm associadas aos cloroplastos foi observada. Para alguns gêneros de planta, o cloroplasto já foi observado como sítio de replicação viral, através da formação de vesículas com auxílio da associação de proteínas transmembranas com cloroplastos ([Wei et al., 2010b](#)). Com a metodologia de BiFC, observamos associação das quatro NSm testadas com a periferia dos cloroplastos. O mesmo sítio de localização foi observado em ensaios de fluorescência com a expressão da proteína 6K de TuMV ([Wei et al., 2010b](#)). Curiosamente, no ensaio de BiFC, observamos alteração da localização com o encaminhamento das proteínas NSm para periferia celular ou cloroplasto, baseado na extremidade de fusão do Ct ou NtYFP com NSm. A localização dirigida para o cloroplasto foi observada quando a extremidade C-

terminal estava livre, que indicam que essa possa ser a região de interação. No entanto, ensaios adicionais com deleções da proteína são necessários para essa confirmação.

O sistema de movimentação viral de espécies do gênero *Potexvirus* vem sendo extensivamente estudado. O movimento é mediado pelo complexo de 3 genes sobrepostos (Triple gene block TGB1-3) em associação com a proteína da capa (coat protein-CP) ([Adams et al., 2005](#); [Baulcombe et al., 1995](#); [Chapman, 1992](#); [King, 2009](#); [Solovyev et al., 2012](#)). TGB 2, codificada pela segunda ORF do complexo TGB é uma proteína integral de membrana ([Mitra et al., 2003](#)), a partir de estudos de topologia observou-se localização dessa proteína com ER ([Hsu et al., 2008](#)). TGB3 também é uma proteína integral de membrana ([Krishnamurthy et al., 2003](#)) com localização no ER ([Wu et al., 2011](#)). Análises de mutação demonstraram que a localização das proteínas TGB 1 e TGB 2 no ER é crítica para o movimento viral célula a célula ([Krishnamurthy et al., 2003](#); [Mitra et al., 2003](#)). Com a expressão heteróloga da NSm em sistema de infecção viral, no contexto da infecção do vírus PVX, observamos apenas a expressão e localização da NSm do TCSV. A fluorescência foi observada em associação com a periferia da célula e de forma evidente com o cloroplasto. Essa localização é distinta daquela observada para o complexo de movimento TGB, a qual é extensivamente dirigida ao ER ([Krishnamurthy et al., 2003](#); [Mitra et al., 2003](#)). A presença de um sítio distinto de localização, baseado na inserção da NSm de tospovírus no contexto de infecção do PVX, demonstra e reforça o possível envolvimento da NSm com cloroplasto.

É importante ressaltar a presença de bandas de diferentes tamanhos no Western blot, a partir das folhas infiltradas com a construção PVX-GFP:NSm-GW (Figura 4B). Tem sido relatado para vetores PVX, a instabilidade de insertos clonados nesse vetores ([Chapman et al., 1992](#)), devido, provavelmente a duplicação de promotores (Subgenomic promoter-like sequences, SGPs) para expressão de proteínas nesse sistema, fato que ocasiona a instabilidade genética ([Dickmeis et al., 2014](#)). A instabilidade genética possivelmente justifica a localização da proteína GFP no núcleo (Figura 4A), além das diferentes bandas observadas no western blot. Especulamos que possivelmente, no processo tradução, estão sendo formadas proteínas truncadas da fusão GFP-NSm.

O conjunto desses resultados com base em três metodologias distintas, permitem especular a possível localização da NSm com cloroplastos, sugerindo o

envolvimento dessa organela no processo de infecção viral, possivelmente, pela participação no processo de movimentação intra-celular e/ou replicação viral. Contudo, ensaios adicionais que permitam observar a associação específica e direta da NSm com os cloroplastos são necessários para tornarem esses resultados mais conclusivos. Confirmando-se a associação da NSm com cloroplastos, ensaios específicos poderiam confirmar o envolvimento do cloroplasto como possível sítio de replicação de tospovírus. Esses experimentos permitiriam, por exemplo, a identificação de alterações estruturais com a formação de vesículas e a identificação de duplex de RNA, como observado no gênero *Potyvirus* (Wei et al., 2010b). Além disso, poderiam comprovar o envolvimento dos cloroplastos como agentes participantes do processo de movimentação intra-celular. Portanto, estudos adicionais são requeridos para validar esta hipótese.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Adams, M.J., Antoniw, J.F., and Fauquet, C.M. (2005). Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of virology* 150:459-479.
- Ahlquist, P. (2006). Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nature reviews. Microbiology* 4:371-382.
- Bassi M, B.N., Appiano A, Conti M, D'Agostino G, Caciagli P. (1980). Cytochemical and autoradiographic studies on the genome and site(s) of replication of barley yellow striate mosaic virus in barley plants. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 12:201-207.
- Baulcombe, D.C., Chapman, S., and Santa Cruz, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J* 7:1045-1053.
- Berger, L., Kimmie, A.R. (1987). *Methods in Enzymology Guide to Molecular Cloning Techniques*. New York, London: Academic press. 152.
- Chapman, S., Kavanagh, T., and Baulcombe, D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J* 2:549-557.
- Chapman, S.N., Hills, G, Watts, J, Baucombe, D.C. (1992). Mutational analysis of the coat protein gene of Potato virus X: Effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology* 191:223-230.
- de Oliveira, A.S., Melo, F.L., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., Kitajima, E.W., and Resende, R.O. (2012). Characterization of bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the Genus Tospovirus. *PloS one* 7:e38634.
- Dickmeis, C., Fischer, R., and Commandeur, U. (2014). Potato virus X-based expression vectors are stabilized for long-term production of proteins and larger inserts. *Biotechnology journal* 9:1369-1379.
- Dietzgen, R. (1995). Rhabdoviridae. In *Pathogenesis and Host-Parasite Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Basis*, ed. RP Singh, US Singh, K Kohmoto. Oxford: Pergamon 3:177-197.
- Dietzgen, R.G., Martin, K.M., Anderson, G., and Goodin, M.M. (2012). In planta localization and interactions of impatiens necrotic spot tospovirus proteins. *The Journal of general virology* 93:2490-2495.
- Feng, Z., Chen, X., Bao, Y., Dong, J., Zhang, Z., and Tao, X. (2013). Nucleocapsid of Tomato spotted wilt tospovirus forms mobile particles that traffic on an

- actin/endoplasmic reticulum network driven by myosin XI-K. *The New phytologist* 200:1212-1224.
- Francki R.I.B, R., J. W. . (1980). Rhabdoviruses infecting plants. . In *Rhabdoviruses*, ed. DHL Bishop, 3:135–65. Boca Raton: CRC. 272 pp.
- Hellens, R., Mullineaux, P., and Klee, H. (2000). Technical Focus:a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in plant science* 5:446-451.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. . In: *Nature*. 179–180. .
- Hsu, H.T., Chou, Y.L., Tseng, Y.H., Lin, Y.H., Lin, T.M., Lin, N.S., Hsu, Y.H., and Chang, B.Y. (2008). Topological properties of the triple gene block protein 2 of Bamboo mosaic virus. *Virology* 379:1-9.
- Jackson, A.O., Dietzgen, R.G., Goodin, M.M., Bragg, J.N., and Deng, M. (2005). Biology of plant rhabdoviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43:623-660.
- Ju, H.J., Samuels, T.D., Wang, Y.S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R.S., and Verchot-Lubicz, J. (2005). The potato virus X TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiol* 138:1877-1895.
- King, A.M.Q., Lefkowitz, E., Adams, M.J.,and Carstens,E.B. (2009). *Virus Taxonomy:Ninth Reportof the International Committeon Taxonomy of Viruses*. London: . AcademicPress.
- Kopek, B.G., Perkins, G., Miller, D.J., Ellisman, M.H., and Ahlquist, P. (2007). Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS biology* 5:e220.
- Krishnamurthy, K., Heppler, M., Mitra, R., Blancaflor, E., Payton, M., Nelson, R.S., and Verchot-Lubicz, J. (2003). The Potato virus X TGBp3 protein associates with the ER network for virus cell-to-cell movement. *Virology* 309:135-151.
- Kuzmin, I.V., Novella, I.S., Dietzgen, R.G., Padhi, A., and Rupprecht, C.E. (2009). The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 9:541-553.
- Lacorte, C., Ribeiro, S.G., Lohuis, D., Goldbach, R., and Prins, M. (2007). The nucleoprotein of Tomato spotted wilt virus as protein tag for easy purification and enhanced production of recombinant proteins in plants. *Protein Expr Purif* 55:17-22.
- Magliano, D., Marshall, J.A., Bowden, D.S., Vardaxis, N., Meanger, J., and Lee, J.Y. (1998). Rubella virus replication complexes are virus-modified lysosomes. *Virology* 240:57-63.
- McCartney, A.W., Greenwood, J.S., Fabian, M.R., White, K.A., and Mullen, R.T. (2005). Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *The Plant cell* 17:3513-3531.
- Mitra, R., Krishnamurthy, K., Blancaflor, E., Payton, M., Nelson, R.S., and Verchot-Lubicz, J. (2003). The potato virus X TGBp2 protein association with the endoplasmic reticulum plays a role in but is not sufficient for viral cell-to-cell movement. *Virology* 312:35-48.
- Paape, M., Solovyev, A.G., Erokhina, T.N., Minina, E.A., Schepetilnikov, M.V., Lesemann, D.E., Schiemann, J., Morozov, S.Y., and Kellmann, J.W. (2006). At-4/1, an interactor of the Tomato spotted wilt virus movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 19:874-883.
- Prod'homme, D., Le Panse, S., Drugeon, G., and Jupin, I. (2001). Detection and subcellular localization of the turnip yellow mosaic virus 66K replication protein in infected cells. *Virology* 281:88-101.
- Reichel, C., Will, B., Cornelius, C.P., and Schwenzer, N. (1998). [Effect of early fronto-orbital advancement on growth of the frontal sinus and supraorbital area]. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG 2 Suppl* 1:S41-43.

- Ribeiro, D., Borst, J.W., Goldbach, R., and Kormelink, R. (2009). Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. *Virology* 383:121-130.
- Savenkov, E.I., and Valkonen, J.P. (2001). Potyviral helper-component proteinase expressed in transgenic plants enhances titers of Potato leaf roll virus but does not alleviate its phloem limitation. *Virology* 283:285-293.
- Silva, M.S., Martins, C.R., Bezerra, I.C., Nagata, T., de Avila, A.C., and Resende, R.O. (2001). Sequence diversity of NS(M) movement protein of tospoviruses. *Archives of virology* 146:1267-1281.
- Solovyev, A.G., Kalinina, N.O., and Morozov, S.Y. (2012). Recent advances in research of plant virus movement mediated by triple gene block. *Frontiers in plant science* 3:276.
- Wei, C.S., Tsai, C.H., Chiou, S.M., Hseu, Y.T., Liu, T.W., Lai, H.Y., Chien, T.F., Kuo, Y.H., Zhao, W.T., Tang, Y.S., et al. (2010a). Nonlinear analysis of movement-related changes in human subthalamic local field potentials. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference* 2010:4132-4135.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C., and Wang, A. (2010b). Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS pathogens* 6:e1000962.
- Wei, T., Zhang, C., Hou, X., Sanfacon, H., and Wang, A. (2013). The SNARE protein Syp71 is essential for turnip mosaic virus infection by mediating fusion of virus-induced vesicles with chloroplasts. *PLoS pathogens* 9:e1003378.
- Wileman, T. (2006). Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Science* 312:875-878.
- Wu, C.H., Lee, S.C., and Wang, C.W. (2011). Viral protein targeting to the cortical endoplasmic reticulum is required for cell-cell spreading in plants. *The Journal of cell biology* 193:521-535.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Dr. Cristiano Lacorte (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Cenargen) por conceder o vetor viral PVX-GFP-GW. Este trabalho foi financiado por BIO 2011-25018, agência da Espanha DGICYT, Capes, CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico no Programa CsF (Ciência sem Fronteiras) Governo Federal e FAP-DF, Brasil.

CAPÍTULO V

Estudo dos determinantes de avirulência (*avr*) da proteína de movimento (NSm) de distintas espécies de tospovírus.

Algumas abordagens são bastante exploradas para o estudo da resistência vegetal contra vírus de planta. Resistência mediante o uso de transgênicos com a expressão heteróloga de proteínas virais, ou através da indução de RNAi que garante ampla resistência a distintas espécies virais. Outra forma de resistência é mediante a utilização de genes que garantem resistência natural, embora exista um baixo número de diferentes genes de resistência direcionado a um patógeno específico. Para os tospovírus, os genes Tsw e Sw5 são bastante estudados. O gene Sw5, com base em dois estudos concomitantes levando em conta duas metodologias distintas, foi caracterizada a proteína NSm como o determinante de avirulência. E em uma análise mais aprofundada, observou-se que as modificações nos resíduos C118Y e T120N são cruciais para ultrapassar barreira de hipersensibilidade. Com base nesse contexto, nosso trabalho considerou o envolvimento das proteínas de movimento dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV com reação de hipersensibilidade e necrose baseado na análise das proteínas NSm tipo selvagem (wt) ou mediante a substituições dos aminoácidos 118 e 120, caracterizados como cruciais para resistência.

INTRODUÇÃO

Além do uso de transgênicos na expressão de proteínas heterólogas para geração de resistência ([Griep et al., 2000](#); [Prins et al., 2005](#), [Zhang et al., 2008](#), [Rudolph et al., 2003](#)), estudo de resistência natural também vem sendo explorado contra espécies do gênero *Tospovirus*. O número de genes de resistência contra tospovírus disponíveis no entanto é ainda bastante limitado. Até o momento, apenas dois genes foram caracterizados e veem sendo utilizados nos programas de obtenção de resistência genéticas as espécies de tospovírus. O gene Tsw, foi identificado em plantas de *Capsicum chinense* acesso PI e mapeado na porção distal do cromossomo 10 ([Jahn et al., 2000](#)), no entanto, a sequência genética ainda não foi elucidada. A resistência, após a infecção, é manifestada por uma eficiente resposta de hipersensibilidade (HR) contra um amplo espectro de isolados de TSWV ([Roggero P., 2002](#)). O gene de avirulência (*avr*) ou determinante de avirulência, está apontado no segmento S. A proteína supressora (NSs) e/ou proteína do nucleocapsídeo (N), seriam os fatores virais responsáveis por elicitar a resposta de hipersensibilidade como apontado pelos resultados obtidos por dois trabalhos envolvendo a caracterização de fatores de avirulência a este gene ([Lovato et al., 2008](#); [Margaria et al., 2004](#)). No entanto, estudos mais recentes apontam a proteína NSs como o determinante de avirulência, a partir de ensaios com a expressão das proteínas N e NSs de isolados que garantem a quebra de resistência (resistance-breaking: RB) e isolados que induzem a resistência (resistance-inducing: RI ou no resistance-breaking: NRB) em plantas resistentes de *Capsicum* ([de Ronde et al., 2013](#)).

O outro gene denominado Sw5 ([Aramburu J., 2000](#); [Cho J.J., 1996](#); [Stevens et al., 1995](#)), foi identificado em *Solanum peruvianum* e introgridido na cultivar Stevens a partir do cruzamento entre *S. peruvianum* e *S. lycopersicum* ([Van Zijl, 1986](#)). Este gene apresenta um amplo espectro de resistência contra diversas espécies de tospovírus pertencentes ao clado americano como TSWV, GRSV, CSNV, TCSV e INSV ([Boiteux L.S., 1993](#); [Stevens et al., 1995](#), [Hallwass et al. 2014](#)). A proteção contra infecção viral também é derivada da indução de HR. A resistência foi mapeada no cromossomo 9 sendo que, um único gene denominado Sw5-b que representa uma cópia dentro de um cluster gênico Sw5 é responsável por conferir esta resistência ([Brommonschenkel et al., 2000](#); [Spasova M.I., 2001](#)). Esta comprovação foi confirmada a partir de plantas de *N. benthamiana* transformadas com a cópia b do

gene, as quais foram altamente resistentes à infecção por TSWV. Esta cópia também demonstrou ser funcional para outras plantas hospedeiras, como por exemplo *N. tabacum* transformadas com o Sw5-b ([Spasova M.I., 2001](#)). O gene Sw5-b codifica uma proteína de 1246 aminoácidos e é membro do grupo de genes de resistência que apresenta um domínio “coiled-coil” e região sítio de ligação a nucleotídeos denominada NB-ARC, além de conjunto de repetições de leucina ([Plyusnin, 2011](#)).

Para o gene Sw5-b, o determinante de avirulência foi inicialmente proposto, com base em estudo utilizando rearranjos do segmento M do vírus TSWV, o qual indicou que o determinante genético envolvido com a resistência estaria no segmento M ([Hoffmann et al., 2001](#)). Estudo posterior, em análises comparativas *in silico* das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de segmento M, a partir de isolados RB e IR, revelou por seleção positiva que a capacidade para ultrapassar a resistência mediada ao gene Sw5-b estava associada à presença de uma tirosina (Y) no local de uma cisteína (C) na posição 118 da proteína NSm do TSWV. Também foi apontado a presença do aminoácido asparagina (N) no local de uma treonina (T) na posição 120, em isolados com a capacidade de quebrar a resistência mediada pelo gene Sw5-b ([Lopez et al., 2011](#)). Por fim, com base em dois estudos concomitantes levando em conta duas metodologias distintas, foi finalmente caracterizada a proteína NSm como o determinante de avirulência ao gene Sw5-b ([Hallwass et al., 2014](#); [Peiro et al., 2014](#)). Um desses trabalhos apontou também que as modificações nos resíduos C118Y e T120N da proteína NSm do TSWV estão envolvidos na indução da hipersensibilidade pelo vírus TSWV ([Peiro et al., 2014](#)).

Diante da diversidade de espécies caracterizadas dentro do gênero tospovírus, uma questão relevante é estudar a estabilidade da resistência frente à diferentes tospovírus que se diferem molecular e biologicamente. O presente trabalho visou estudar a capacidade de indução da reação de hipersensibilidade e indução de necrose de quatro MPs de distintos tospovírus (Bean necrotic mosaic vírus -BeNMV, Chrysanthemum stem necrosis vírus -CSNV, *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV e *Tomato spotted wilt virus* -TSWV e o envolvimento de aminoácidos específicos (118 e 120) da proteína NSm apontados como cruciais para a indução da resistência mediada pelo gene Sw-5.

MATERIAL E MÉTODOS

Manipulação do DNA.

O plasmídeo pUC18 foi modificado para inserção de uma construção infecciosa do cDNA3 do vírus AMV. Neste trabalho, visando observar as respostas de resistência mediada pelo gene Sw5-b, nos ensaios de infecção sistêmica foi utilizada a construção pUC18-MP:A44-CP (Figura 1 e Tabela 1) ([Sanchez-Navarro and Bol, 2001](#)). As proteínas NSm dos vírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV, foram inseridas com sítios de corte *NcoI/NheI* e amplificadas a partir dos vetores pGEMT-Easy ([de Oliveira et al., 2012](#); [Silva et al., 2001](#)). No caso da MP do *Alfalfa mosaic virus* (AMV), esta foi previamente construída por [Sanchez-Navarro and Bol \(2001\)](#).

Para análise da expressão individual heteróloga das proteínas NSm, o mesmo produto de PCR amplificado a partir dos vetores pGEMT-Easy foram clonados nos vetores pSK35S-MPTMV:HA ([Peiro et al., 2014](#)) com a troca da MP do vírus *Tabacco mosaic virus* (TMV) pelas proteínas NSm dos vírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV, com sítios de corte *NcoI/NheI*.

As substituições de aminoácidos feitas para os ensaios de mutação das MPs, foram conduzidas por PCR invertida com enzima de alta fidelidade de atividade exonuclease 3'-5' gerando extremos "blunt" (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, ThermoScientific™), a partir dos vetores pSK35S-NSm-HA. Uma diluição seriada dos plasmídeos contendo as MPs foi realizada visando diminuir a possibilidade de reclonagem do plasmídeo íntegro utilizado como molde na reação de PCR. Após amplificação, foi realizada a fenolização do produto da PCR e, por fim, a fosforilação e ligação do vetor de acordo com recomendações do fabricante (BioLabs).

As substituições de aminoácidos foram realizadas baseadas no trabalho de ([Lopez et al., 2011](#)). Para a NSm do BeNMV, que apresenta naturalmente uma fenilalanina no aminoácido 118, esta foi substituída por uma cisteína, presente nos isolados RI. Para o aminoácido 120, uma fenilalanina foi trocada por uma treonina (observada em isolados de TSWV NRB). Para as proteínas NSm dos vírus CSNV TCSV e TSWV, foi realizada a substituição do aminoácido 118, na qual a cisteína foi substituída por uma tirosina (observada em isolados de TSWV RB) e o aminoácido 120 uma treonina foi substituída por uma asparagina (aminoácido também observado em isolados de TSWV RB) (Tabela 1).

Todos os construtos clonados em vetor pSK35S-N_{Sm}:HA foram digeridos com a enzima *Xho*I, originando os cassetes contendo os genes de interesse para posterior ligação no vetor binário pMOG800.

Tabela 1: Primers utilizados para amplificação das proteínas de movimento N_{Sm} de distintos tospovírus .

Vector and construct	Restriction sites	Primer sequence (5'-3')	
Systemic infection			
pUC18-BeNMV:A44-CP	<i>Pci</i> I <i>Nhe</i> I	SP/ BeNMV N _{Sm} 5'-AA <u>ACATGT</u> CGAAGCTGTTGTCAAAGATCA-3' ASP/ BeNMV N _{Sm} 5'-AAAA <u>GCTAGC</u> TGTCATGAGTTTCAAAGGAGGGAAA-3'	
pUC18-CSNV:A44-CP	<i>Bsp</i> HI <i>Nhe</i> I	SP/CSNV N _{Sm} 5'-AA <u>TCATGA</u> TGACACTCTTTGGTAACAAGG-3' ASP/CSNV N _{Sm} 5'-AAAA <u>GCTAGC</u> CACCTCATCAATAAAAGAAAAGTTTA-3'	
pUC18-TCSV:A44-CP	<i>Pci</i> I <i>Nhe</i> I	SP/TCSV N _{Sm} 5'-AA <u>ACATGT</u> TGACATTTTTCGGCAGCAAGA-3' ASP/TCSV N _{Sm} 5'-AAAA <u>GCTAGC</u> TATCTCGTCCACAAACGAAAGTTTA-3'	
pUC18-TSWV:A44-CP	<i>Pci</i> I <i>Nhe</i> I	SP/ TSWV N _{Sm} 5'-AA <u>ACATGT</u> TGACTCTTTTCGGTAACAAGAGGC-3' ASP/ TSWV N _{Sm} 5'-AAAA <u>GCTAGC</u> TATTTTCATCAAAGGATAACTGAGC-3'	
Mutant MP 118-120			
			Modification a.a 118-120
pSK-BeNMV-HA	-	SP/BeNMV 118:120 5'-AAGCTTAGTCTC <u>TGTCCTACAT</u> GGGACAGT-3' ASP/BeNMV 5'- CTTTTTATCAGATTGTTCCATTGCC-3'	F118C F120T
pSK-CSNV-HA	-	SP/CSNV 118:120 5'- GTTATCAAGATA <u>TATCCAAATT</u> GGGACAGC-3' ASP/CSNV 5'- TTTTGTTCATTACTAGTCCATTACC-3'	C118Y T120N
pSK-TCSV-HA	-	SP/TCSV118:120 5'- ATCATTAAAGATA <u>TATCCTAATT</u> GGGATAGC-3' ASP/TCSV 5'- CTTAGTTGCATTCTGCTCCCGTTGCC-3'	C118Y T120N
pSK-TSWV-HA	-	SP/TSWV 118:120 5'- GTTATCAAGATC <u>TATCCGAATT</u> GGGACAGC-3' ASP/TSWV 5'- CTTATTAGCATTTTCTTTCCGTTGCC-3'	C118Y T120N

Construtos quiméricos AMV RNA 3 em vetor pUC18-MP:A44-CP (Sanchez-Navarro and Bol, 2001) e pSK35S-MP:HA (Peiro et al., 2014) com fusão da proteína de movimento (N_{Sm}) estão indicados baseado nos ensaios de movimento sistêmico e substituição de aminoácidos. N_{Sm} dos vírus Bean necrotic mosaic virus, *Chrysanthemum stem necrosis virus*, *Tomato chlorotic spot virus*, *Tomato spotted wilt virus* wt e N_{Sm} mutadas 118-120, estão indicados. SP: primer senso, ASP: primer anti-senso. *Pci*I, *Bsp*HI e *Nhe*I correspondem aos sítios de restrição. Sequências em negrito e sublinhadas correspondem aos sítios de restrição adicionados por primers e em negrito e itálico correspondem as regiões com substituição de aminoácidos. F fenilalanina, C cisteína, N aspargina, T treonina, Y tirosina. 118 e 120 correspondem aos aminoácidos mutados.

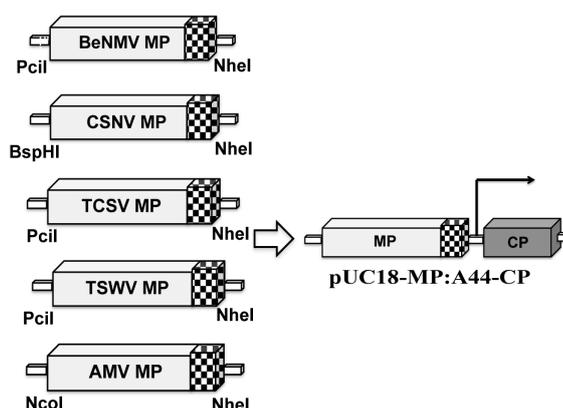


Figura1: Representação esquemática da construção quimérica AMV RNA 3 contendo os genes das proteínas de movimento de distintos tospovírus. Bloco branco corresponde a MP (Movement Protein) e em cinza a CP (Coat Protein). Bloco quadriculado representa a adição de 44 aminoácidos da MP do *Alfalfa mosaic virus* (AMV). *Pci*I, *Bsp*HI e *Nhe*I representam sítios de restrição adicionados as respectivas MPs. Setas correspondem ao promotor independente para CP. Estão indicadas as MPs wt dos vírus Bean necrotic mosaic virus, *Chrysanthemum stem necrosis virus*, *Tomato chlorotic spot virus*, *Tomato spotted wilt virus* e a proteína MP do AMV usada como controle.

Inoculação de plantas, purificação de vírions e inoculação de *N. tabacum* transgênicas contendo o gene Sw5-b.

Plasmídeos contendo as proteínas NSm (NSm BeNMV wt, NSm CSNV wt, NSm TCSV wt e NSm TSWV wt) e a polimerase P1 e P2 do AMV em vetor pUC18, foram linearizados com a enzima *Pst*I e transcritos dos genes foram produzidos empregando-se a enzima T7 RNA polymerase (TakaraTM). Plantas *N. benthamiana* foram inoculadas com cerca de 20 µg de transcrito com auxílio de abrasivo ([Peter E. M. Taschner, 1991](#)). Quinze dias pós inoculação (dpi), foi feita a extração de vírions (AMV recombinantes contendo as MPs dos tospovírus) das plantas inoculadas de acordo com [Pallas et al., \(1998\)](#).

Por fim, foi feita a inoculação mecânica dos vírions purificados (cerca de 1 mg de vírion por planta) com auxílio de abrasivo. O ensaio foi realizado utilizando-se repetições de três plantas de *N. tabacum* Sw5-b (Nt/Sw5-b) por vírus recombinante. Plantas de Nt/Sw5-b também foram inoculadas com o produto da transcrição dos RNA1, RNA2 e RNA3 quimérico do AMV de acordo com [Pallas et al., \(1998\)](#).

Agroinfiltração de *N. benthamiana* wt e *N. benthamiana* transgênica contendo o gene Sw5-b.

Todos os vetores binários pMOG800-35S-NSm:HA contendo as MPs wt e as MPs com substituição de aminoácidos (118-120) dos tospovírus em estudos foram eletroporados (GenePulser Xcell electroporation system; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) em *A. tumefaciens* C58C1 ([Hoekema et al., 1983](#)). Culturas de agrobactérias foram crescidas “overnight” a 28°C, com 10mM de MES (pH:5,6), 10mM de MgCl₂ e 150mM de acetosyringone até atingirem uma densidade final de OD₆₀₀=0.5, foram posteriormente incubadas por 3h a temperatura ambiente, homogenizadas, e com auxílio de uma seringa de 1ml, infiltradas na região abaxial das folhas de *N. benthamiana* wt e Sw5-b. A infiltração das folhas foi realizada a partir das combinações de bactérias contendo os plasmídeos inseridos, e contendo também a proteína supressora de silenciamento HC-Pro ([Savenkov and Valkonen, 2001](#)). O ensaio foi realizado em 3 repetições de plantas por tratamento. Para cada tratamento (construção com MP) foi utilizado plantas wt e plantas transgênicas contendo o gene Sw5-b. Somente metade da folha foi infiltrada com a construção a ser testada contendo as diferentes MPs em vetor pMOG800-35S-NSmwt:HA e pMOG800-35S-NSmΔ:HA. A região não infiltrada da folha serviu como controle após o

desenvolvimento ou não do sintoma de necrose. Controles com folhas apenas infiltradas com agrobactérias (com e sem vetor binário) foram também testados.

Detecção viral por “Tissue printing”, “Dot blot” e RT-PCR.

Para os testes de “Tissue printing” foram feitas secções transversais do pecíolo das folhas inoculadas e sistêmicas de plantas P12. Os cortes foram prensados em membrana de nylon a partir dos pecíolos seccionados. A membrana foi acondicionada a 65°C por 5 minutos até sua secagem. Os RNAs foram fixados nas membranas com auxílio da UV cross-linker (700 x100 µJ/cm²). As hibridizações e detecções foram conduzidas como descrito por [Pallas et al., \(1998\)](#) usando sonda complementar a região à região 3’UTR AMV.

Para os ensaios de “Dot blot”, RNA total foi extraído de tecido vegetal inoculado 15 dpi [Sambrook, \(1989\)](#), usando reagente Trizol (Invitrogen™). Aproximadamente 50 ng de RNA total foram aplicados em membranas de nylon e os demais procedimentos de fixação, hibridização e detecção, foram desenvolvidos como descrito na metodologia de “Tissue printing”.

Com RNA extraído foi realizada a reação de RT-PCR One-Step com primers para os genes das proteínas NSm dos tospovírus testados e para a CP (coat protein) do AMV, seguindo recomendações do fabricante (Invitrogen™).

RESULTADOS

NSm BeNMV wt não ativa resposta necrótica (HR) em plantas transgênicas de *N. benthamiana* Sw5-b, em contraste com as proteínas NSm dos vírus CSNV, TCSV e TSWV que provocam resposta eficiente de HR.

A análise de seleção positiva dos aminoácidos da NSm de isolados de TSWV RB e isolados TSWV NRB gerou a hipótese de que a substituição individual dos aminoácidos Y118 e N120 poderia conferir a capacidade dos isolados de TSWV de quebrarem a resistência mediada pelo gene Sw5-b ([Lopez et al., 2011](#)).

A fim de avaliar a reação de hipersensibilidade com base na expressão individual em vetor binário das proteínas NSm wt dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV, plantas de *N. Benthamiana* wt e transgênicas contendo o gene Sw5-b foram agroinfiltradas. Plantas agroinfiltradas com BeNMV NSm wt em plantas Nb/wt (controle) não apresentaram reação necrótica (Figura 2). BeNMV NSm wt apresenta

substituição natural nos aminoácidos 118 e 120 com a presença de duas Fenilalaninas (F), respectivamente. Após a agroinfiltração da NSm do BeNMV wt em plantas transgênicas de Nb/Sw5-b, não foi observado reação necrótica (Figura 2), demonstrando que BeNMV se comporta como isolados RB de TSWV capazes de romper a resistência do gene Sw-5b. Em contraste, as proteínas NSm dos vírus CSNV, TCSV e TSWV wt, (os quais não apresentam as substituições naturais nos aminoácidos 118-120) não induziram lesões em plantas Nb/wt. No entanto, apresentaram reações necróticas evidentes em plantas Nb/Sw5-b, com destaque para a intensidade das lesões causadas pela NSm do CSNV wt (Figura 2). A NSm do isolado TSWV Grau conhecido por ultrapassar a resistência ([Lopez et al., 2011](#)) foi utilizado como controle, a qual não gerou reação necrótica em plantas contendo o gene Sw5-b (Figura 2).

Quando plantas de Nb/wt e Nb/Sw5 foram infiltradas com a BeNMV Δ NSm (C118-T120), o qual contem a reversão para os aminoácidos dos isolados RI, observamos nas plantas contendo o gene Sw5-b, que a reação esperada de necrose, característica dos isolados RI não foi induzida (Figura 2). Para as proteínas NSm mutadas (Y118-N1120) do CSNV Δ , TCSV Δ e TSWV Δ , contendo os aminoácidos encontrados nos isolados RB de TSWV, não foi observada a reação de resistência caracterizada pela formação de necrose. Esses resultados eram esperados com base nas substituições de aminoácidos que geram NRB por RB (Figura 2). Plantas Nb/wt (controle) não apresentaram reação necrótica. A análise via Western blot da expressão das NSms wt/ Δ confirmou a expressão das proteínas mutadas e está demonstrado na Figura 2.

Avaliação em sistema viral (AMV) da resposta de hipersensibilidade (HR) induzidas pelas MPs dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV.

O presente ensaio teve como objetivo avaliar a resposta de resistência mediada pelo gene Sw5-b em processo de infecção viral, com a utilização do sistema de genética reversa *Alfalfa mosaic virus* (AMV). Para tanto, em uma primeira avaliação foi utilizado as MPs wt dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV. Plantas de *N. benthamiana* wt foram inoculadas com transcritos do RNA 1, 2 e construções heterólogas RNA3 AMV contendo as proteínas NSm dos tospovírus. Posteriormente, foi realizada a purificação de vírions, sendo esses a seguir, utilizados para a inoculação de plantas transgênicas de *N. tabacum* Sw5-b. As plantas inoculadas com

os transcritos do RNA3 AMV contendo a MP dos vírus BeNMV e CSNV não geraram infecção sistêmica, impossibilitando a purificação de vírions, ao contrário das plantas infectadas com transcritos AMV RNA3 contendo as MPs dos vírus TCSV e TSWV as quais apresentaram infecção sistêmica. O ensaio subsequente de inoculação de plantas de *N. tabacum* com gene Sw5-b foi realizado com a inoculação de vírions purificados contendo as MPs TCSV e TSWV, no entanto, para as MPs BeNMV e CSNV, foi realizada uma nova transcrição *in vitro* dos RNAs 1, 2 e heterólogo 3 e uma nova inoculação de plantas. Os transcritos do AMV contendo a NSm do BeNMV geraram pontos necróticos locais na folha inoculada (Figura 3A), similar ao que foi observado para os vírus contendo as proteínas NSm do TCSV e TSWV. Para a NSm do CSNV não foi observado lesão local, assim como, para o controle negativo utilizando-se o AMV wt. (Figura 3). Aparentemente nenhuma construção heteróloga RNA3 contendo as proteínas NSm dos tospovírus apresentaram infecção sistêmica (Figura 3B). O controle, contendo a MP do AMV desenvolveu infecção sistêmica, como esperado.

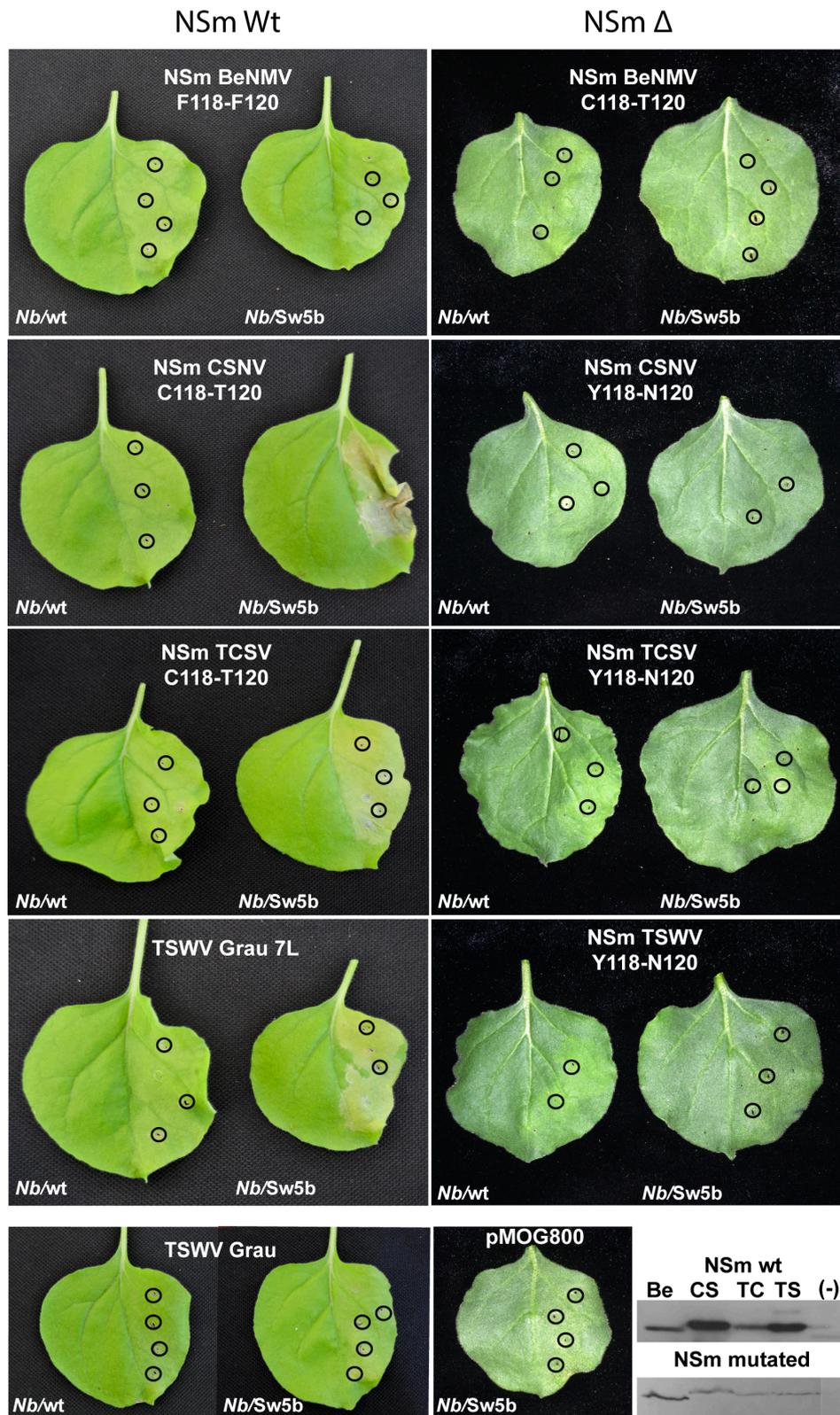


Figura 2: Análise da reação de hipersensibilidade induzida pelas proteínas de movimento (Nsm) de tospovírus em plantas *N. benthamiana* wt e *N. benthamiana* transgênica com o gene Sw-5 - Nb/Sw5-b. Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolados Grau (resistance breaking-RB) e Grau 7L (non-resistance breaking-NRB) estão demonstrados. Plantas de Nb/wt e Nb/Sw5 foram agroinfiltradas com as

construções pMOG800-35S NSm:HA com BeNMV (F118-F120 wt/ C118-T120 Δ), CSNV (C118-T120 wt/ Y118-N120 Δ), TCSV (C118-T120 wt/ Y118-N120 Δ), TSWV (C118-T120 wt/ Y118-N120 Δ), TSWV Grau e TSWV Grau 7L (Peiró et al., 2014). Região abaxial de metade da folha das plantas Nb foram agroinfiltradas com cultura de *Agrobacterium tumefaciens* C58, OD₆₀₀= 0,5. Visualização de necrose foi acompanhada até 10 dpi. Circulo negro corresponde aos pontos de infiltração na folha. Western blot de plantas *N. benthamiana* expressando a NSm dos vírus BeNMV (Be), CSNV (CS), TCSV (TC) e TSWV (TS) wt/ Δ , está indicado. Marcação com anticorpo monoclonal anti-HA (SigmaTM) 3dpi.

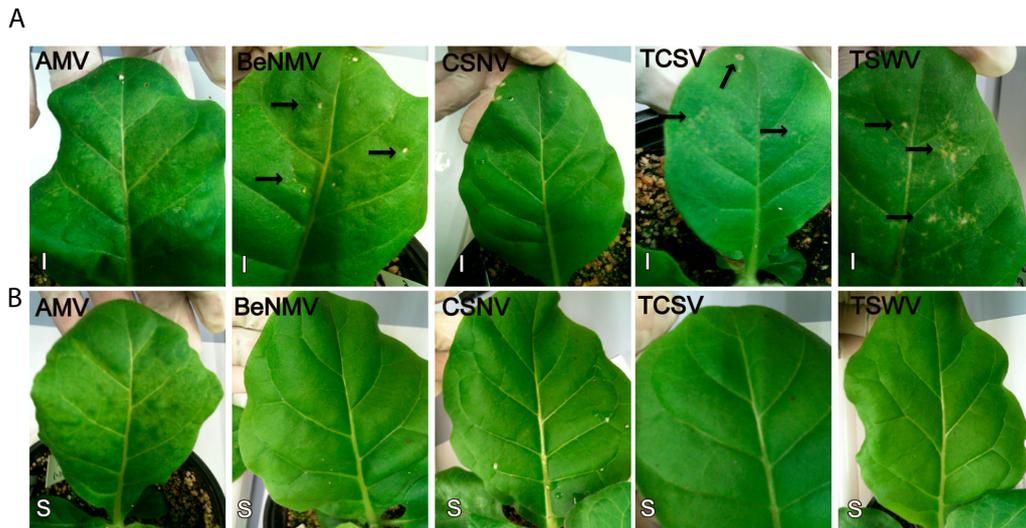


Figura 3: Ensaio de hipersensibilidade com base no sistema *Alfalfa mosaic virus* (AMV) de infecção viral. Plantas transgênicas de *N. tabacum* Sw5-b (transformadas com o gene Sw5-b) inoculadas com vírus AMV recombinante contendo as proteínas NSm dos tospovírus Bean necrotic mosaic virus (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) inseridas no RNA3 e AMV wt. **A)** Imagens de folhas inoculadas de planta Nt/Sw5-b **B)** Imagens de folhas sistêmicas de plantas Nt/Sw5-b. (I) corresponde a folhas inoculadas e (S) sistêmicas. Setas apontam regiões na folha com lesões locais.

Para confirmação molecular da infecção, folhas inoculadas e sistêmicas foram coletadas e as análises via “Tissue printing” e “dot blot” foram realizadas. Por “Tissue printing” somente foi possível detectar RNA nas plantas inoculadas com o AMV wt (controle), e para os demais recombinantes de AMV contendo as NSm dos tospovírus não houve detecção de RNA (Figura 4). Por “Dot blot” o resultado foi similar havendo detecção, tanto nas folhas inoculadas quanto nas sistêmicas, do controle AMV. No recombinante AMV-TSWV MP, somente foi detectado RNA nas folhas inoculadas, para os demais recombinantes não houve detecção dos RNAs virais (Figura 4).

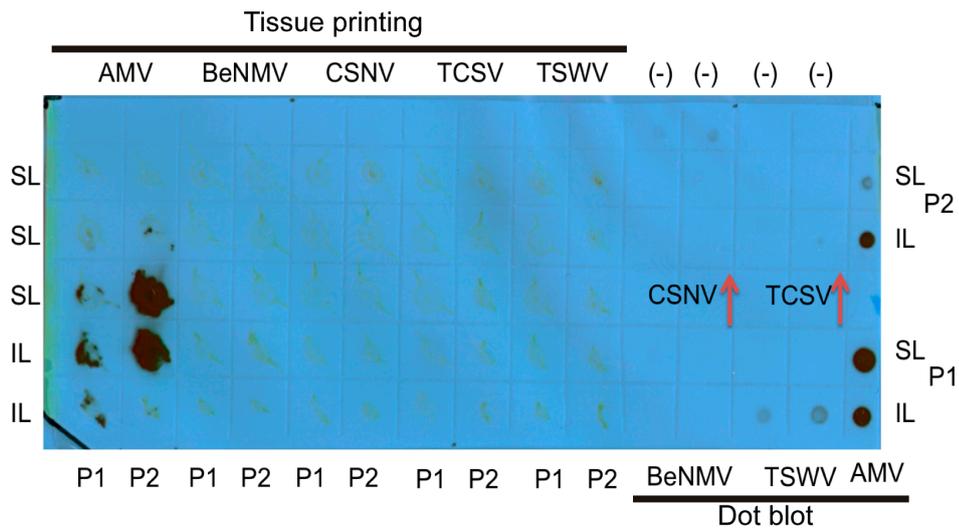


Figura 4: Ensaio de detecção do *Alfalfa mosaic virus* (AMV) RNA 3 heterólogo contendo os genes das proteínas de movimento NSm de distintos tospovírus. Tissue printing e Dot blot de folhas das plantas transgênicas de *N. tabacum* Sw5-b (contendo o gene de resistência Sw-5) inoculadas com vírions e transcritos dos AMV recombinantes contendo os genes das proteínas de movimento NSm dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV, TSWV e AMV wt, 15 dpi. SL corresponde a folhas sistêmicas e IL a folhas inoculadas. P1 (planta 1) e P2 (planta 2) correspondem ao conjunto de repetição de plantas utilizadas no ensaio. Setas em vermelho apontam as colunas dos dots de CSNV e TSWV. (-) corresponde a amostra de RNA de planta não infectada. Barras em preto separam os ensaios de “Tissue printing” e “Dot blot”. A hibridização do RNA foi feita com sonda complementar a região 3 “UTR” do RNA 3 AMV.

Tendo em vista a dificuldade de detecção do RNA viral pelas metodologias descritas foi realizada a análise da replicação viral via RT-PCR, a partir do RNA extraído das folhas inoculadas e sistêmicas. Com os primers para detecção específica das proteínas NSm de cada tospovírus foi possível detectar o gene NSm de todos os tospovírus somente na folha inoculada (Figura 5A). A detecção sistêmica só foi possível para o AMV controle empregando-se primers específicos para o gene da capa proteica (Figura 5B).

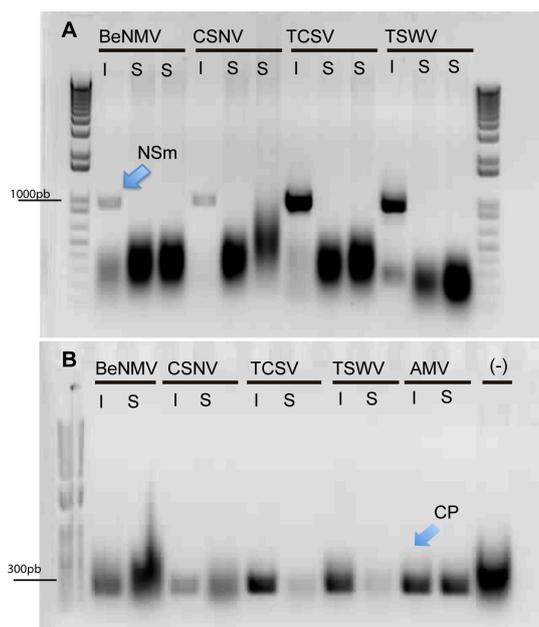


Figura 5: Detecção dos genes da proteínas de movimento (NSm) de tospovírus e da capa protéica (CP) AMV por RT-PCR no sistema *Alfalfa mosaic virus* (AMV). Detecção dos amplicons é apresentada em gel de agarose 1%. **A)** RT-PCR com primers específicos para a NSm dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV. **B)** RT-PCR com primers específicos para a CP do AMV. I corresponde às folhas inoculadas e S às folhas sistêmicas. (-) controle negativo. Setas azuis acompanhadas de NSm e CP, indicam banda de amplificação correspondentes aos genes das proteínas de movimento dos tospovírus e ao gene da proteína da capa do AMV.

DISCUSSÃO

Estudos prévios sugerem que o fator viral que representa o determinante de avirulência contra o gene de resistência a tospovírus Sw5-b é a proteína de movimento viral (NSm). Alguns fatores como alta acumulação da proteínas na célula infectada ou um efeito potencializado devido a outras respostas celulares associadas a infecção viral, parecem estar envolvidos na modulação da resposta de hipersensibilidade (Hallwass et al., 2014; Peiro et al., 2014). Neste trabalho, foi avaliada a resposta de hipersensibilidade mediada pelo gene Sw5-b induzida pela expressão isolada ou em processo de infecção viral, da proteína NSm de quatro espécies de tospovírus que apresentam características moleculares e biológicas distintas. Observamos que na expressão isolada das proteínas, a NSm do vírus BeNMV aparentemente não induziu a resistência em plantas de *N. benthamiana* Sw5-b, em contraste, com as demais proteínas NSm que resultaram na formação de necrose após a expressão de cada uma delas em plantas contendo o gene Sw5-b. Esses

resultados corroboram as análises da ampla resistência mediada pelo gene Sw5-b durante o processo de infecção de espécies distintas de tospovírus como, TSWV, GRSV, CSNV e TCSV ([Boiteux L.S., 1993](#); [Stevens et al., 1995](#)) Com base em estudos *in silico*, comparativos das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do segmento M a partir de isolados RB e RI, revelou, por seleção positiva, que a capacidade para ultrapassar a resistência mediada ao gene Sw5-b estava associada à presença de uma tirosina (Y118) no local de uma cisteína (C118) na proteína NSm. Portanto, o resultado observado para o vírus BeNMV que apresenta na sua proteína NSm wt o aminoácido fenilalanina na região F118 e F120 era esperado. Também foi observada a capacidade de ultrapassar a resistência em isolados com a presença do aminoácido asparagina (N120) no local de uma treonina (T120) ([Lopez et al., 2011](#)). Intrigantemente, após substituição na proteína BeNMV NSm dos aminoácidos F118 por C (**cisteína**) e F120 por T (**treonina**), aminoácidos que não estão envolvidos na quebra da resistência, a formação de necrose não foi observada, sugerindo que esses aminoácidos para a NSm do BeNMV possivelmente não sejam funcionais. Essas observações parecem indicar que a resistência mediada pelo gene Sw5 não apresenta um padrão conservado para todas as espécies de tospovírus do grupo “Americano”. Vale ressaltar que o BeNMV, juntamente com o Soybean vein necrosis associated virus (SVNaV), apesar de pertencerem ao grupo americano estão localizados filogeneticamente, em um ramo a parte das demais espécies americanas ([de Oliveira et al., 2012](#)). Para as proteínas NSm dos vírus CSNV, TCSV e TSWV, após a substituição dos aminoácidos C118 por Y, T120 por N, observamos o rompimento da resistência devido a não formação de necrose. Essas observações sugerem que, para essas espécies de tospovírus testadas, os aminoácidos preditos como funcionais e determinantes de avirulência para TSWV ([Lopez et al., 2011](#); [Peiro et al., 2014](#)), são também funcionais para outras espécies de tospovírus, diferentes, mas filogeneticamente próximas ao TSWV. Devemos ressaltar que essas três espécies estão agrupadas no mesmo clado do grupo “Americano” ([Silva et al., 2001](#)) e compartilham características moleculares e biológicas similares entre elas, quando comparadas ao BeNMV.

Em ensaios de infecção viral, a partir da inserção dos genes das proteínas NSm dos tospovírus em um sistema de expressão baseado no *Alfalfa mosaic virus*, que possibilita o estudo funcional de distintas MPs, observamos resultados contrastantes. No ensaio de expressão individual da NSm wt do BeNMV, vimos a não formação de

necrose, dado contrário aos resultados observados com o processo de infecção viral, onde observamos formação necrótica, tendo em vista que a proteção contra infecção viral é derivada de indução de HR ([Aramburu, 2003](#)). Sendo que nesse sistema de estudo utilizando-se transcritos infecciosos do AMV, a infecção sistêmica não foi observada. No ensaio de infecção viral com a NSm do CSNV inserida no RNA 3 do AMV e co-inoculada com os RNAs 1 e 2 tal como feita para a NSm do vírus BeNMV, não observamos reação de hipersensibilidade, em contra partida, no ensaio da expressão individual dessa proteína em plantas contendo o gene Sw5-b, esta foi a NSm que induziu uma reação necrótica mais evidente. Importante ressaltar, que não foi possível realizar a purificação dos vírions completos recombinantes do AMV contendo os genes NSm do CSNV e BeNMV, em folhas sistêmicas de plantas de Nb/wt. Portanto, devido a ausência e/ou a baixa concentração de vírus nas folhas sistêmicas, não é possível concluir, nesse tipo de sistema, sobre o envolvimento da NSm do CSNV e BeNMV na quebra ou manutenção da resistência. Como comentando por [Peiro et al., \(2014\)](#), o nível de acumulação das proteínas na célula infectada, podem modular a resposta de hipersensibilidade. Portanto, uma quantidade menor de vírus em comparação com aqueles purificados a partir das construções contendo a NSm de TSWV e TCSV, não permitem uma conclusão definitiva sobre a influência das NSm do BeNMV e CSNV com o processo de resistência a tospovírus. Novos ensaios com a utilização de outros sistemas mais permissíveis à infecção sistêmica, mediante a inserção das proteínas NSm de tospovírus, devem ser realizados para uma compreensão mais ampla da influência de distintas proteínas NSm com o processo de resistência.

Em uma avaliação geral, obtivemos resultados conclusivos na expressão individual das proteínas NSm dos tospovírus BeNMV, CSNV, TCSV e TSWV (Isolados grau e grau 7L) em plantas de *N. benthamiana* wt e Sw5-b. Para a BeNMV NSm observamos a possível quebra da resistência do gene Sw5, se comportando como um isolado RB que não induz necrose, no entanto, após a modificação dos aminoácidos da NSm não envolvidos no processo por aminoácidos críticos para a resposta de indução da resistência, observamos a não formação necrótica, fato que foi comprovado pela expressão da NSm BeNMV Δ . Este resultado demonstra que para a NSm do BeNMV, os aminoácidos ditos como essenciais para quebra de resistência em isolados de TSWV ([López et al., 2011](#)) não se demonstram funcionais para o gene NSm do BeNMV. Para as demais NSm, observamos a ativação do gene de resistência

mediante expressão *in planta* das proteínas NSm wt, e a superação da resistência após as modificações de aminoácidos ditos como críticos para o processo. Essas observações sugerem de forma evidente a influência dos aminoácidos 118 e 120 na manutenção e/ou quebra de resistência mediada pelo gene Sw5-b à distintas espécies de tospovírus do “clado Americano” que estão filogeneticamente mais próximas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aramburu J., M.R.a.J.A. (2000). Effect of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) infection on the fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants of cultivars carrying the SW-5 gene. *Journal of Phytopathology*. 148.
- Aramburu, J.a.M., M. (2003). The occurrence in north-east Spain of a variant of Tomato spotted wilt virus (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. *Plant Pathol.* 52:407-407.
- Boiteux L.S., T.N., A.N. Dusi and A.C. De Avila,. (1993). Natural occurrence of two Tospovirus species infecting *Capsicum* spp. in Brazil. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 12:75.
- Brommonschenkel, S.H., Frary, A., Frary, A., and Tanksley, S.D. (2000). The broad-spectrum tospovirus resistance gene Sw-5 of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene Mi. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 13:1130-1138.
- Cho J.J., D.M.C., S.H. Brommonschenkel and S.D. Tanksley,. (1996). Conventional breeding: host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to tomato spotted wilt virus in vegetables. *Acta Horticulturae* 438:367-378.
- de Oliveira, A.S., Melo, F.L., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., Kitajima, E.W., and Resende, R.O. (2012). Characterization of bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the Genus Tospovirus. *PloS one* 7:e38634.
- de Ronde, D., Butterbach, P., Lohuis, D., Hedil, M., van Lent, J.W., and Kormelink, R. (2013). Tsw gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the Tomato spotted wilt virus. *Mol Plant Pathol* 14:405-415.
- Griep, R.A., Prins, M., van Twisk, C., Keller, H.J., Kerschbaumer, R.J., Kormelink, R., Goldbach, R.W., and Schots, A. (2000). Application of Phage Display in Selecting Tomato spotted wilt virus-Specific Single-Chain Antibodies (scFvs) for Sensitive Diagnosis in ELISA. *Phytopathology* 90:183-190.
- Hallwass, M., de Oliveira, A.S., de Campos Dianese, E., Lohuis, D., Boiteux, L.S., Inoue-Nagata, A.K., Resende, R.O., and Kormelink, R. (2014). The Tomato spotted wilt virus cell-to-cell movement protein (NS) triggers a hypersensitive response in Sw-5-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional Sw-5b resistance gene copy. *Mol Plant Pathol*.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *In: Nature*. 179-180. .
- Hoffmann, K., Qiu, W.P., and Moyer, J.W. (2001). Overcoming host- and pathogen-mediated resistance in tomato and tobacco maps to the M RNA of Tomato spotted wilt virus. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 14:242-249.
- Jahn, M., Paran, I., Hoffmann, K., Radwanski, E.R., Livingstone, K.D., Grube, R.C., Aftergoot, E., Lapidot, M., and Moyer, J. (2000). Genetic mapping of the Tsw locus for resistance to the Tospovirus Tomato spotted wilt virus in *Capsicum* spp. and its relationship to the Sw-5 gene for resistance to the same pathogen in tomato. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 13:673-682.

- Lopez, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F., and Rubio, L. (2011). Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *The Journal of general virology* 92:210-215.
- Lovato, F.A., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., de Avila, A.C., Pereira, L.A., and Resende, R.O. (2008). The N protein of Tomato spotted wilt virus (TSWV) is associated with the induction of programmed cell death (PCD) in *Capsicum chinense* plants, a hypersensitive host to TSWV infection. *Virus research* 137:245-252.
- Margaria, G., Riccomagno, E., and White, L.J. (2004). Structural identifiability analysis of some highly structured families of statespace models using differential algebra. *Journal of mathematical biology* 49:433-454.
- Pallas, V., Mas, P., and Sanchez-Navarro, J.A. (1998). Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot-blot hybridization. *Methods in molecular biology* 81:461-468.
- Peiro, A., Canizares, M.C., Rubio, L., Lopez, C., Moriones, E., Aramburu, J., and Sanchez-Navarro, J. (2014). The movement protein (NSm) of Tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the tomato Sw-5 gene-based resistance. *Mol Plant Pathol*.
- Peter E. M. Taschner, A.C.V.D.K., Lyda Neeleman, And John F. Bol. (1991). Replication of an incomplete Alfalfa Mosaic Virus Genome in Plants Transformed with Viral Replicase Genes. *Virology* 181:445-450.
- Plyusnin, A.a.E., R.M. (2011). *Bunyaviridae: Molecular and Cellular Biology*. Caister Academic Press ISBN: 978-1-904455-90-5.
- Prins, M., Lohuis, D., Schots, A., and Goldbach, R. (2005). Phage display-selected single-chain antibodies confer high levels of resistance against Tomato spotted wilt virus. *The Journal of general virology* 86:2107-2113.
- Roggero P, M.V., Tavella L. (2002). Field isolates of Tomato spotted wilt virus overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy. *Plant Disease* 86:950-954.
- Rudolph, C., Schreier, P.H., and Uhrig, J.F. (2003). Peptide-mediated broad-spectrum plant resistance to tospoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4429-4434.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Manuatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. . N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989-1659
- Sanchez-Navarro, J.A., and Bol, J.F. (2001). Role of the alfalfa mosaic virus movement protein and coat protein in virus transport. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 14:1051-1062.
- Savenkov, E.I., and Valkonen, J.P. (2001). Potyviral helper-component proteinase expressed in transgenic plants enhances titers of Potato leaf roll virus but does not alleviate its phloem limitation. *Virology* 283:285-293.
- Silva, M.S., Martins, C.R., Bezerra, I.C., Nagata, T., de Avila, A.C., and Resende, R.O. (2001). Sequence diversity of NS(M) movement protein of tospoviruses. *Archives of virology* 146:1267-1281.
- Spassova M.I., T.W.P., R.T. Folkertsma, R.M. Klein-Lankhorst, J. Hille, R.W. Goldbach and M. Prins. (2001). The tomato gene Sw5 is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding* 7 2.
- Stevens, M.R., Lamb, E.M., and Rhoads, D.D. (1995). Mapping the Sw-5 locus for tomato spotted wilt virus resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 90:451-456.
- Van Zijl, J.J.B.B., S.E.; Coetzee, C.P.J. . (1986). Breeding tomatoes for processing in South Africa. . *Acta Horticulturae*, n.194, p.67-75, 1986. *Acta Horticulturae* 67-75.
- Zhang, H.L., Lin, H.H., Tao, L., Ma, X.H., Dai, J.L., Jia, J., and Cao, Z.W. (2008). Prediction of antibiotic resistance proteins from sequence-derived properties irrespective of sequence similarity. *International journal of antimicrobial agents* 32:221-226.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Dra. Ana Peiró (Instituto Biología Molecular y Celular de Plantas, España) por conceder o vetor pSK35S-MPTMV:HA essencial para elaboração do ensaio de expressão individual das NSm em plantas Sw5-b. Agradecimentos ao auxílio prestado em bancada para elaboração dos ensaios pela técnica do laboratório Lorena Valencia. Este trabalho foi financiado por BIO 2011-25018, agência da Espanha DGICYT, Capes, CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico no Programa CsF (Ciência sem Fronteiras) Governo Federal e FAP-DF, Brasil.

1 **CONCLUSÕES, INFERÊNCIAS E PERSPECTIVAS GERAIS**

2
3 Nesta tese, o mecanismo de movimentação dos tospovírus foi amplamente
4 explorado. Com base em genética reversa e com a utilização de sistema infeccioso
5 viral, abordamos aspectos do envolvimento de distintas NSm com processo de
6 movimento célula à célula e sistêmico. Observamos a possível influência da NSm de
7 tospovírus com a regulação do espectro de infecção viral, considerando os
8 comportamentos biologicamente distintos observados entre espécies do gênero.
9 Concluimos, em uma observação *in vivo*, e corroboramos a hipótese do movimento
10 viral de espécies do gênero ser proveniente da associação da NSm com a N (teoria de
11 túbulo guiado). Através da formação de túbulos em 4 espécies do gênero,
12 observamos que, a polimerização da NSm, para formação de túbulos parece ser uma
13 característica conservada para as espécies do gênero.

14 Também concluimos que as NSm das 4 espécies estudadas são eficientes na
15 formação de túbulos e que para o BeNMV, o extremo C-terminal não é essencial para
16 o movimento. Esses resultados foram obtidos a partir da identificação, por
17 truncamento, do limite de aminoácidos que poderiam ser removidos da NSm sem
18 inibição do movimento célula à célula. No entanto, os mesmos estudos demonstraram
19 que para as NSm do CSNV, TCSV e TSWV existe a necessidade da integridade da
20 proteína de movimento para garantir o movimento viral a curta distância. Em geral,
21 estas diferenças no comportamento biológico de movimento, além de aspectos
22 moleculares envolvidos com a movimentação, parecem revelar uma evolução distinta
23 dos tospovírus e/ou adaptação, relativa à sua capacidade para se mover entre
24 diferentes hospedeiros.

25 Baseado em predições com a identificação de aminoácidos hidrofóbicos na
26 região central da NSm, além dos ensaios com duas abordagens diferentes em análise
27 topológica e química de interação de proteína com membrana, concluimos que as
28 NSm em estudo se associam com a periferia da membrana, constituindo uma
29 associação periférica, do tipo não trans-membrânica. Sugerimos um modelo de
30 associação da NSm com membrana, onde a região central hidrofóbica se mantém
31 inserida na membrana lipídica e os extremos amino e carboxi estão livres e apontados
32 ao citoplasma. Estamos propondo que no processo de movimentação, esses extremos
33 livres podem ser essenciais para o ancoramento da própria NSm com a sua
34 contraparte, além da NSm com complexo RNP. Além disso, observamos também a

35 possível associação da NSm com cloroplastos, o que nos permite especular um
36 possível complexo de associação de membranas, cloroplastos e complexos
37 ribonucleoproteína (RNP) envolvidos com a movimentação e/ou replicação viral de
38 espécies do gênero tospovírus.

39 Em uma abordagem de infecção mista, com base em ensaios de dímeros,
40 heterodímeros, intra/inter-associação da NSm e N, observamos uma associação
41 permissiva entre as proteínas de distintas espécies virais. Somente observamos uma
42 falta de associação heteróloga da NSm do BeNMV com as demais proteínas NSm das
43 outras espécies testadas. Diferenças significativas na estrutura terciária da NSm do
44 BeNMV podem impossibilitar a associação heterodímera entre esta NSm
45 significativamente distinta com as demais em estudo. Esses resultados podem auxiliar
46 em uma melhor compreensão do envolvimento, no processo de infecção mista, de
47 uma proteína viral complementando e potencializando a infecção de outro vírus. Com
48 os resultados demonstrados de inter-associação, observamos que as espécies de
49 tospovírus, compreendem o único gênero dentre os membros da família 30K de
50 proteína de movimento que é permissível à uma associação heteróloga entre as
51 proteínas de movimento e as proteínas da capa protéica e/ou nucleocapsídeo.

52 A NSm demonstra ser uma proteína multifuncional. Além dos aspectos
53 envolvidos com movimentação, neste trabalho de tese observamos o envolvimento da
54 NSm também com o processo de resistência mediada pelo gene Sw5-b. Observamos
55 que para BeNMV NSm wt, o gene Sw5 não foi eficiente, resultados obtidos através
56 da observação da expressão da proteína NSm BeNMV Δ . No entanto, para as demais
57 MPs, observamos a ativação do gene a partir da expressão *in planta* das NSm wt, e a
58 supressão da resistência, após modificações de aminoácidos ditos como críticos para
59 resistência. Essas observações indicam a influência dos aminoácidos 118 e 120 na
60 manutenção e/ou quebra de resistência mediada pelo gene Sw5-b à distintas espécies
61 de tospovírus. Demonstramos dessa forma, que para as proteínas NSm dos vírus
62 CSNV e TCSV os aminoácidos caracterizados como determinantes de avirulência são
63 funcionais ativando a resposta do gene de resistência mediante o tipo de alteração
64 produzida (substituição a.a 118-120). No entanto, para a NSm do BeNMV
65 aparentemente a resposta é distinta.

66 Por fim, observamos a possível interação da NSm com cloroplastos, tanto em
67 processo de expressão isolada das proteínas de movimento, quanto em processo de
68 infecção viral. Os resultados sugeriram a possível associação de distintas proteínas

69 NSm com esta organela celular apresentando uma localização próxima a periferia dos
70 cloroplastos. Inferimos o envolvimento do cloroplasto como possível sítio de
71 replicação e/ou movimentação dos tospovírus. No entanto, metodologias adicionais
72 tornam-se essenciais para uma conclusão definitiva dessa real associação dando
73 suporte a hipótese proposta.

74 Em uma análise geral, exploramos diversos aspectos do envolvimento de duas
75 proteína virais (NSm e N) com distintos processos de infecção (movimentação,
76 resistência e interação vírus-hospedeiro). Em uma análise mais ampla, para uma
77 eficiente estabelecimento de infecção viral nos tospovírus é necessário a codificação
78 de 5 genes e a expressão de 6 proteínas virais (N, Gc, Gn, NSs, NSm e L) e uma
79 interação complexa entre essas proteínas é esperado durante à infecção viral. No
80 presente estudo, focado em apenas duas proteínas virais (NSm e N), já foi possível
81 observar uma interação efetiva entre essas proteínas e o envolvimento dessas em
82 distintos aspectos do processo de infecção. A abordagem pela qual a tese foi
83 desenvolvida, reforça que para um entendimento mais amplo dos processos básicos da
84 infecção viral é necessário o estudo conjunto e mais aprofundado, da ação de
85 proteínas virais. Além disso, é essencial entendermos o envolvimento de proteínas do
86 hospedeiro no processo infectivo, nos permitindo formar um conhecimento mais
87 coerente e crítico de processos conjuntos envolvidos na infecção viral.

88 Como perspectiva, o estudo de movimento célula à célula e sistêmico gerou
89 informações que permitirão estudos mais aprofundados do envolvimento das
90 proteínas não estruturais com a regulação da infecção. Aqui demonstramos a primeira
91 evidência do envolvimento de uma proteína viral com a regulação do espectro viral
92 em espécies do gênero tospovírus. Estudos adicionais, utilizando uma gama maior de
93 hospedeiras com ensaios semelhantes aos apresentados no capítulo II, tornaria mais
94 conclusivo os resultados. Em relação ao processo de infecção mista, a capacidade de
95 interação e a baixa inibição observada na associação entre proteínas heterotípicas,
96 corroboram a potencialização da infecção, como é observado naturalmente em alguns
97 processos de infecção mista. Ensaio adicionais de complementação, através do
98 emprego de processos de infiltração e utilização de clones infecciosos, poderiam
99 demonstrar, em um contexto de infecção viral *in vivo*, a real complementação
100 observada no presente estudo. Por fim, no contexto do trabalho de tese, o tópico que
101 permite uma perspectiva mais ampla e complexa está no envolvimento da NSm com
102 cloroplastos. Levando em conta o modelo proposto (Capítulo III) e a forma pela qual

103 a NSm foi visualizada associando-se com cloroplasto, com ensaios adicionais
104 avaliando possível sítios de replicação no cloroplasto, a partir do envolvimento da
105 NSm e N, nos permitiria complementar o modelo proposto. Seria possível traçar um
106 modelo mais completo da infecção por tospovírus envolvendo a movimentação intra-
107 celular, replicação, e movimentação intercelular de espécies do gênero, para as quais
108 as etapas de infecção e as interações moleculares ainda representam uma incógnita.

109 O desenvolvimento de um modelo amplo para espécies de um gênero viral que
110 apresenta orientação negativa, agrupando a replicação e movimentação, torna-se
111 necessário. Partindo do pressuposto de ser um gênero bastante estudado, onde ainda
112 são poucos compreendidos os aspectos envolvidos com esses processos. Nosso grupo
113 pretende em estudos adicionais abordar aspectos visando desvendar processos da
114 infecção viral, focando nos principais processos envolvidos com a replicação e
115 movimentação, via uma análise de sítios do hospedeiro envolvidos, empregando-se
116 ensaios da interação de proteínas do hospedeiro com fatores virais. Baseado em
117 estudos preliminares alcançados pelo nosso grupo de pesquisa, temos como ponto de
118 partida, o possível envolvimento da proteína de movimento viral com o cloroplasto,
119 demonstrando ser um sítio potencialmente implicado com o processo conjunto de
120 replicação e movimentação dos tospovírus. Em vírus de RNA senso positivo é
121 observado o envolvimento de organelas do hospedeiro servindo como sítios de
122 proteção do material genético viral contra a maquinaria de defesa do hospedeiro,
123 possibilitando assim, a replicação do material genético viral. Partindo da possível
124 associação da proteína de movimento de tospovírus com cloroplastos ou outras
125 organelas a serem identificadas, pretendemos visualizar alterações morfológicas de
126 organelas (como exemplo cloroplasto, mitocôndrias, peroxissomos), em plantas-
127 modelo infectadas com tospovírus. Confirmado algumas alterações de organelas nos
128 hospedeiros, podemos identificar o sítio ativo de replicação viral. Para tanto, distintas
129 metodologias podem ser aplicadas para a identificação de RNA ou duplex de RNA
130 em vesícula ou no citoplasma (imunofluorescência com anticorpo J2 (scicons
131 Hungary), MS2 System, Pumillo homology domain-PUMHDs). Além do uso de
132 marcadores de Miosina, Cloroplasto, Retículo Endoplasmático, Endossomas e
133 Plasmodemas, pretendemos elaborar um modelo de atividade intracelular das
134 proteínas virais envolvidas com a replicação e movimentação viral. Por fim, a
135 possibilidade de esclarecer qual maquinaria celular é utilizada pelo vírus para a
136 movimentação intra-celular. Recentemente, uma nova via de movimentação

137 endossômica foi caracterizada para alguns vírus que infectam plantas. Como em
138 teoria as proteínas de movimento de tospovírus não se associam com os
139 microfilamentos de actinmiosina (via bem caracterizada e envolvida com a
140 movimentação intra-celular de algumas gêneros virais), podemos desenvolver ensaios
141 de co-localização das NSm com o complexo endossômico. Mutações produzidas em
142 sítios de associação das NSm com esses complexos podem revelar o envolvimento
143 dos tospovírus com os complexos de endomembranas das células.

144 Em suma, diferentes abordagens podem ser desenvolvidas para um
145 entendimento mais aprofundado desses processos, permitindo a elaboração de um
146 modelo de movimentação e replicação para os tospovírus.

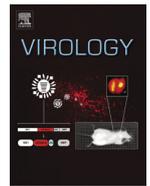
AGRADECIMENTOS

Eu resumo os agradecimentos da tese desenvolvida a duas pessoas fundamentais para minha formação acadêmica e profissional. Ao **Dr. Jesús Angel Sánchez-Navarro**, por todos os ensinamentos de bancada, onde realmente eu aprendi a trabalhar de forma correta e eficiente. Me sinto bastante grato pela experiência de ter trabalhado com o seu grupo de pesquisa que me possibilitou uma compreensão maior do que vem a ser a pesquisa, reforçando aspectos como interpretação, elaboração e execução de ideias. Agradeço pelo acolhimento a mim prestado na Espanha para elaboração da maioria dos resultados aqui apresentados.

Agradeço em especial ao meu maior tutor da vida acadêmica, o **Dr. Renato de Oliveira Resende** que me propiciou uma visão diferenciada do mundo com base em todas as experiências vividas no seu grupo de pesquisa. O Renato foi o grande mentor que me forneceu a possibilidade de um pensamento aberto, independente e crítico dentro da pesquisa, e me permito estender isso a uma visão de mundo. Seguramente me ensinou aspectos desde a escrita acadêmica até a possibilidade de contra argumentar inferências de bons pesquisadores do mundo. Me sinto lisonjeado de ter elaborado essa tese sob a sua orientação, sendo esse o passo inicial para outras grandes parcerias.

Agradeço cordialmente a todos que de alguma forma participaram!!!

Dr. Mikhail Oliveira Leastro.



The movement proteins (NSm) of distinct tospoviruses peripherally associate with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins

M.O. Leastro^a, V. Pallás^b, R.O. Resende^a, J.A. Sánchez-Navarro^{b,*}

^a Departamento de Biología Celular, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, Brasil

^b Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, E-46022 Valencia, Spain



ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2014

Returned to author for revisions

6 January 2015

Accepted 31 January 2015

Keywords:

Tospoviruses

NSm dimer

N dimer

NSm–N interaction

BiFC

Movement protein topology

Mixed infections

ABSTRACT

Tospovirus is the only genus containing virus species which infect plants in the *Bunyaviridae* family. The aims of this study were to understand the *in vivo* membrane association of the movement protein (NSm) of the tospovirus species *Bean necrotic mosaic virus*, *Chrysanthemum stem necrosis virus*, *Tomato chlorotic spot virus* and *Tomato spotted wilt virus* and the homologous and heterologous interactions among NSm and nucleocapsid protein (N). The results obtained by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay and chemical treatments after membrane fractionation revealed that the four NSm proteins are associated with the biological membranes with the N- and C-termini oriented to the cytoplasm. BiFC analysis for protein–protein interactions showed: i) dimer formation for all NSm and N proteins; ii) interaction between NSm and the cognate N and iii) heterologous interactions between the NSm and N proteins. The implications of these interactions in the life cycle of tospoviruses are discussed.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Tospovirus is the only genus of the family *Bunyaviridae* that includes plant-infecting viral species. The type species, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), is currently ranked among the top 10 most economically important plant viruses worldwide with significant losses in agronomic production (Adkins, 2000; Scholthof et al., 2011). Their genome consists of three single-stranded RNA segments denoted S RNA (small), M RNA (medium) and L RNA (large), respectively, having the first two an ambisense coding strategy and the L segment a negative polarity. Tospovirus genome presents five “open reading frames” (ORFs) that encode four structural and two nonstructural proteins (Pappu et al., 2009). The L segment has a complete negative polarity and contains an ORF encoding an RNA-dependent RNA polymerase (de Haan et al., 1991). Both M and S RNA have two ORFs separated by an intergenic region (IRG). The ORF present in the viral sense of the S RNA segment encodes the non-structural NSs protein, identified as an RNA silencing suppressor (Takeda et al., 2002) and the ORF located in the complementary viral RNA encodes the N protein involved in the formation of viral

ribonucleocapsids (NPs). The ORF located in the complementary viral M RNA encodes the precursor of the Gn and Gc glycoproteins that are localized in the viral particle envelope and that are important for tospovirus transmission mediated by thrips in a circulative and propagative mode (Ribeiro et al., 2009; Sin et al., 2005). The ORF in the viral RNA sense encodes a non-structural protein (NSm) involved in the short distance (cell-to-cell) and systemic movements (Pappu et al., 2009) and, more recently, proved to work as an avirulence determinant (Hallwass et al., 2014; Peiro et al., 2014a).

Cell-to-cell and systemic transports of viruses are provided via viral movement proteins (MPs) that generally associate themselves to host factors and other viral components (Aparicio et al., 2010; Dickert et al., 2004; Pouwels et al., 2004; Sanchez-Navarro et al., 2006; Wolf et al., 1989). Genetic and molecular biology studies have demonstrated that those proteins, denoted movement proteins (MPs), interact with the plasmodesma (PD) enhancing its exclusion limit and allow the virus passage (Wolf et al., 1989). The MPs can be divided into two main categories based on the degree of structural changes that they induce in the PD (Benitez-Alfonso et al., 2010; Niehl and Heinlein, 2011; Scholthof, 2005). The first one is that represented by the MP of the *Tobacco mosaic virus* (TMV) that interacts with the viral RNA and facilitates the transport of the ribonucleotide complex through the PD without causing any visual changes (Citovsky et al., 1992; Heinlein and Epel, 2004; Kawakami et al., 2004; McLean et al., 1995; Wolf et al., 1989). The other category

* Corresponding author. Fax: +34 963877859.

E-mail addresses: m.leastro@gmail.com (M.O. Leastro), vpallas@ibmcp.upv.es (V. Pallás), rresende@unb.br (R.O. Resende), jesanche@ibmcp.upv.es (J.A. Sánchez-Navarro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.031>

0042-6822/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

is represented by the MP of *Cowpea mosaic virus* (CPMV) that forms tubular structures that drastically modify the PD and facilitates the virus passage in the form of virions (Kasteel et al., 1993; van Lent et al., 1990; Wellink and Vankammen, 1989). MPs are commonly found in association with different cell components including cytoskeleton elements, endoplasmic reticulum (ER) or cellular membranes (Heinlein and Epel, 2004; Kormelink et al., 1994; Lucas, 2006; Nelson and Citovsky, 2005; Pallas and Garcia, 2011; Wolf et al., 1989). The MP of TMV, the type member of the 30K family (Melcher, 2000), has been recently proposed to be associated to the cytosolic surface of the ER, without spanning the membrane (Peiro et al., 2014b). It has been proposed that this topology could be the general rule to other members of the 30K family, including the MP of tospovirus, although no data have been reported demonstrating this. In addition to the association with biological membranes, the MPs have been described to require in some instances the cognate nucleocapsid proteins, to allow the transport of specific coat protein (CP) complexes during virus movement (Aparicio et al., 2010; Nagano et al., 1997; Sanchez-Navarro and Bol, 2001; Sanchez-Navarro et al., 2006; Takeda et al., 2004). Viral MPs are not only key players in the virus movement but can have a significant contribution in the symptom development (Garcia and Pallas, 2015) or host susceptibility (Amarí et al., 2012).

Studies on the subcellular localization of tospovirus proteins demonstrated the existence of different sites and forms of aggregation (German et al., 1992; Schmaljohn and Nichol, 2001; Lacorte et al., 2007; Kormelink et al., 2011; Dietzgen et al., 2012). For N protein is observed the formation of dispersed aggregates all over the cell. Similar cytoplasmic aggregates have been previously detected when N and C terminal ends of the GFP were fused to the N protein of TSWV in *Nicotiana benthamiana* leaves (Lacorte et al., 2007). The same type of aggregates were observed in BiFC assay with the N of INSV. Copies of N protein generate multimers in association with viral RNA to form RNP (German et al., 1992; Schmaljohn and Nichol, 2001). NSm expression in plant was studied for two different tospoviruses: the NSm of TSWV associates with ribonucleoprotein complexes (RNPs) located in the tubular structure of PD (Kormelink et al., 2011) meanwhile the NSm of INSV forms aggregates at the cell surface (Dietzgen et al., 2012). In addition, the N and NSm of INSV interact *in vivo*, showing peripheral localization and the formation of aggregates of different sizes, dispersed in the cytoplasm (Dietzgen et al., 2012). The interaction between N and NSm proteins offers a molecular basis for understanding the factors involved in the assembly of viral particles along with its movement (Kormelink et al., 2011; Pappu et al., 2006; Soellick et al., 2000). These observations allow us to predict that a particular viral protein could facilitate the infection caused by another virus that in a natural infection would be partially or totally restricted (Bag et al., 2012).

Interactions among viruses seem to be a common feature in nature. Mixed infections under natural conditions between viral species of the same genus may provide greater genetic diversity, favoring virus infection, genetic reassortment and recombination (Brown et al., 2002; Idris and Brown, 2004; Idris et al., 2008). Mixed infections and genetic reassortments have been also reported for the genus *Tospovirus* (García-Cano et al., 2006; Webster et al., 2011); however, these reports are scarce. A true synergistic interaction was observed between TSWV and the crinivirus *Tomato chlorosis virus* (ToCV), in which the ToCV infection caused the overcoming of resistance in tomato plants by the TSWV (García-Cano et al., 2006). There are also reports of mixed infections between the two tospovirus species: *Iris Yellow Spot Virus* (IYSV) and TSWV are present in 7% of field tested onion plants (Mullis et al., 2004). In this case, the nature and extension of co-infection were tested, indicating that TSWV may facilitate the systemic transport of IYSV in *Datura stramonium*, a host that restricts the movement of IYSV to inoculated leaves (Bag et al., 2012). A more extensive study of interactions

between viral proteins of distinct species or with host proteins may shed light on the nature of multiple and mixed infections and generate a better understanding of potential synergism and/or antagonism processes resulting from tospovirus mixed infections. In this sense, we selected the tospovirus MPs as critical components during virus transport in which compatible interactions with either others MP and/or N proteins could represent a synergistic effect in mixed infections. Also, we selected four biologically different tospovirus species with a narrow (*Bean necrotic mosaic virus*, BeNMV) or a large (TSWV; *Chrysanthemum stem necrosis virus*, CSNV; *Tomato chlorotic spot virus*, TCSV) range of host plants.

In this context, the present study aimed to analyze first, the MP (here after NSm) membrane topology of the four tospovirus species BeNMV, CSNV, TCSV and TSWV and secondly, the capacity of the different NSm to interact with homologous and heterologous tospovirus proteins (NSm and N). Cell fractionation and biochemical treatments assays of the NSm expressed *in planta*, together with the results of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) studies, permit to propose that the four NSm are peripherally associated to the cytosolic face of the ER membranes in living plant cells. Finally, the NSm interactions analysis generated information that can facilitate a better interpretation of viral proteins interactions, strengthening the understanding of mixed infection processes.

Results

NSm protein of tospovirus peripherally associates with membranes in vivo.

In silico analysis of NSm proteins from distinct tospovirus belonging to the American Clade predicted the presence of a hydrophobic region preceded by an aspartate residue (D-motif), in the central region of the protein (Silva et al., 2001). Based on this prediction, and in order to analyze the membrane association of tospovirus NSm in the experimental host *N. benthamiana*, we proceeded to transiently express the NSm fused to the HA epitope, by infiltrating *Agrobacterium tumefaciens* cultures carrying the corresponding pMOG800 35S-NSm: HA plasmids. At three days post-infiltrations, total proteins extracts were centrifuged at 100,000g to generate a membrane-rich fraction that was subjected to the above-described chemical treatments. To identify the type of interaction, we first washed the membrane-rich fraction with sodium carbonate (pH 11.5), a treatment that is known to render microsomes into membranous sheets, releasing soluble luminal proteins (Peremyslov et al., 2004). The results showed that the tospovirus NSm remained associated with the membranous fraction after sodium carbonate treatment (94% for BeNMV NSm and 100% for CSNV, TCSV and TSWV NSm in the pellet fraction; Fig. 1). Next, we washed the membranes with 4 or 7 M urea, a treatment that should release all polypeptides from the membrane, except the integral membrane proteins (Martínez-Gil et al., 2009). Both treatments (4 M and 7 M urea) led to the detection of NSm in the soluble fraction (9–18% and 54–92%, respectively), in contrast to the control experiments performed with the HA-tagged Lep as an integral membrane protein fashion that showed Lep accumulation exclusively in the membranous fractions following these treatments (Fig. 1). These results indicate that the four tospovirus NSm behave as membrane associated proteins rather than being fully integrated membrane proteins.

Membrane association of tospovirus NSm in living plant cells

The above results indicated that the four tospovirus NSm are associated, but not integrated, with the biological membranes. However, these results could not discern in which subcellular compartment the NSm are exposed. To answer this question, we performed a BiFC

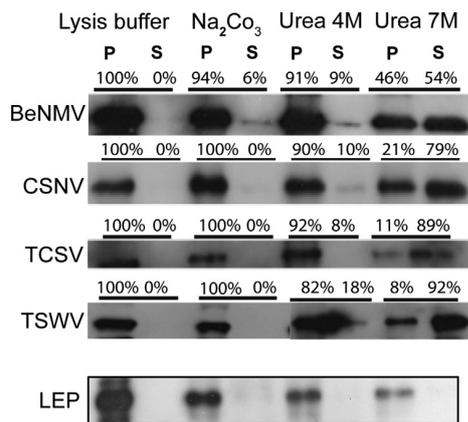


Fig. 1. NSm association with biological membranes. Segregation into membranous and soluble fractions of *in planta* expressed NSm from *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). HA-tagged NSm were expressed in *N. benthamiana* plants by agro-infiltration. Comparable pellet (P) and supernatant (S) fractions obtained from membrane fractions, untreated and after alkaline or urea treatments (4 M or 7 M), were analyzed by Western blot analysis using an anti-HA antibody (Fermentas™). The transmembrane HA-tagged Lep protein was expressed in *N. benthamiana* plants and treated as the NSm. Relative quantification values are presented in percentage.

assay that allowed to discern the subcellular compartments in which the N- and C-termini of the viral NSm are located. This technique relies on the capacity of two non-fluorescent fragments of the EYFP, the N- (N-YFP, 1–154 amino acids) and C-termini (C-YFP, 155–239 amino acids), to interact with each other when they are overexpressed in the same subcellular compartment (Zamyatnin et al., 2006). One EYFP fragment was targeted to the cytosol (C-YFP_{cyt}) or to the ER lumen (C-YFP_{ER}), and it was co-infiltrated with the counterpart N-YFP fragment attached to the N- or C-terminus of the tospovirus NSm (Fig. 2). Reconstitution of the fluorescence-competent EYFP structure indicated the *in vivo* localization of the fused/inserted YFP fragment in the appropriate compartment. As expected, no fluorescence signal was observed when the two EYFP fragments were co-expressed in different subcellular compartments (N-YFP_{cyt}+C-YFP_{ER} or N-YFP_{ER}+C-YFP_{cyt}; Fig. 2B). However, a clear fluorescent signal was observed when the two EYFP fragments were co-expressed in the ER or cytosol (N-YFP_{ER}+C-YFP_{ER} or N-YFP_{cyt}+C-YFP_{cyt}; Fig. 2B). Next, we fused the N-YFP or the C-YFP to the N- or C-terminus of the different tospovirus NSm, and the resultant chimeric proteins were co-expressed with corresponding counterpart targeted to the cytosol (C-YFP_{cyt} or N-YFP_{cyt}) or to the ER lumen (C-YFP_{ER} or N-YFP_{ER}), by infiltrating *N. benthamiana* leaves. Reconstitution of the fluorescence was only observed when the chimeric NSm, carrying the N-YFP fragment fused at the N- or C-termini, were co-expressed with the C-YFP_{cyt} indicating that all NSm were exposed to cytosolic compartment (Fig. 2A and C). The expression of the heterologous NSm was confirmed by Western blot analysis, using specific antibodies that recognize the N- or C-terminus of the EYFP (data not shown).

Together, these results suggest that the four tospovirus NSm were peripherally associated membrane proteins, probably through the central hydrophobic region (Silva et al., 2001) and C-terminal coiled coil domain (Singh et al., 2014) with the full length molecule oriented towards the cytoplasmic face of the biological membranes.

Homologous and heterologous interactions between the NSm and N tospovirus proteins in living plant cells

Before proceeding with the BiFC analysis, we determined the subcellular localization of the NSm and N proteins. For this purpose, we selected the C-terminus of both proteins to fuse the GFP since i), the functionality of the NSm protein is not affected by

the presence of some peptides (HA or the C-terminal 44 amino acids of the MP of *Alfalfa mosaic virus*) at its C-terminus (Peiro et al., 2014a) and ii), the subcellular localization of the N protein was similar with N- or C- terminal fusion of the GFP (Dietzgen et al., 2012; Lacorte et al., 2007). The resultant chimeric proteins were transiently expressed *in planta* by agroinfiltration. The fluorescent signal monitored at 3 dpi revealed a similar localization pattern for all analyzed NSm, located at the cell periphery and in different cell aggregates, which could correspond to PD (Fig. 3A). To confirm that the NSm punctuate pattern corresponds to PDs we labeled callose-rich neck regions of PDs with aniline blue fluorochrome in leaves transiently expressing the NSm:GFP. We found co-localization of the NSm:GFP with callose deposits indicating that the four tospovirus NSm associate with PDs. In contrast, all N localized in clusters of different sizes in the cell cytoplasm (Fig. 3B).

Multimerization of the NSm and N proteins together with the NSm–N interaction has been reported for TSWV (Dietzgen et al., 2012; Soellick et al., 2000; Storms et al., 1995; Uhrig et al., 1999). In this sense, we decided to analyze by BiFC assay, the capacity of the NSm and N proteins to dimerize and to interact to each other *in vivo*, but also if such interactions could occur among proteins of different tospovirus species. Prior to the BiFC analysis, we used the NSm and N proteins of TSWV as positive controls, to reproduce the previously reported dimerization for NSm (Storms et al., 1995) or N (Uhrig et al., 1999) and for the NSm–N interaction (Soellick et al., 2000). We used those proteins to check the best location (N- or C-termini of the protein) to fuse the N-YFP and C-YFP fragments, that will permit reproduce the mentioned interactions *in vivo*. To do this, we proceeded to fuse the N-YFP or C-YFP to the N- or C-terminus of both NSm proteins of TSWV and BeNMV and to the N protein of BeNMV. Transient expression of the different fusion-protein pair combinations was performed by agroinfiltration of *N. benthamiana* leaves (Fig. 4B). For dimer formation, we observed that the N protein does not have preference for the location of the YFP fragment, observing clear fluorescence reconstitution with all fusion-protein combinations analyzed (Fig. 4A). However, NSm dimer formation was more restrictive since fluorescence was observed only in two of the four combinations assayed, corresponding to the fusion-protein pairs: N-YFP:NSm+Nsm:C-YFP and C-YFP:NSm+NSm:N-YFP (Fig. 4A and B). For the NSm–N interaction, we observed reconstitution of the fluorescence only in two of the eight combinations tested, corresponding to the fusion-protein pairs: C-YFP:N+NSm:N-YFP and N:N-YFP+C-YFP:NSm. According to the above results, the constructs N-YFP:NSm+Nsm:C-YFP and N-YFP:N+C-YFP:N were selected for dimer or heterodimer formation of the NSm and N proteins meanwhile the pair C-YFP:N+NSm:N-YFP was selected for the N–NSm interaction (Fig. 4B).

In the BiFC assay addressed to analyze the NSm dimerization, we observed clear fluorescence reconstitution for all NSm proteins (Fig. 5A), indicating that the capacity of tospovirus NSm to form dimers *in vivo* could be a general property of the genus. The fluorescence signal was located at the cell periphery, resembling the results obtained in the subcellular localization, although disperse fluorescence has also been observed in the cytoplasm, being closely located around the chloroplast (data not shown). Also, we analyzed the capacity of the NSm proteins to form heterodimer and a clear fluorescence reconstitution was observed for all combinations, except for the NSm of the BeNMV, which rendered no fluorescence with any of the heterologous NSm proteins (Fig. 5B). Similar negative results were obtained using other fusion combinations (e.g. C-YFP:NSm+NSm:N-YFP; data not shown). Regarding the N protein, strong fluorescence signal reconstitution was observed for all dimer and heterodimer combinations (Fig. 5C and D), reproducing the same fluorescent pattern obtained with the N protein fused to the GFP. No fluorescence was observed when the C-YFP:N fusion proteins were

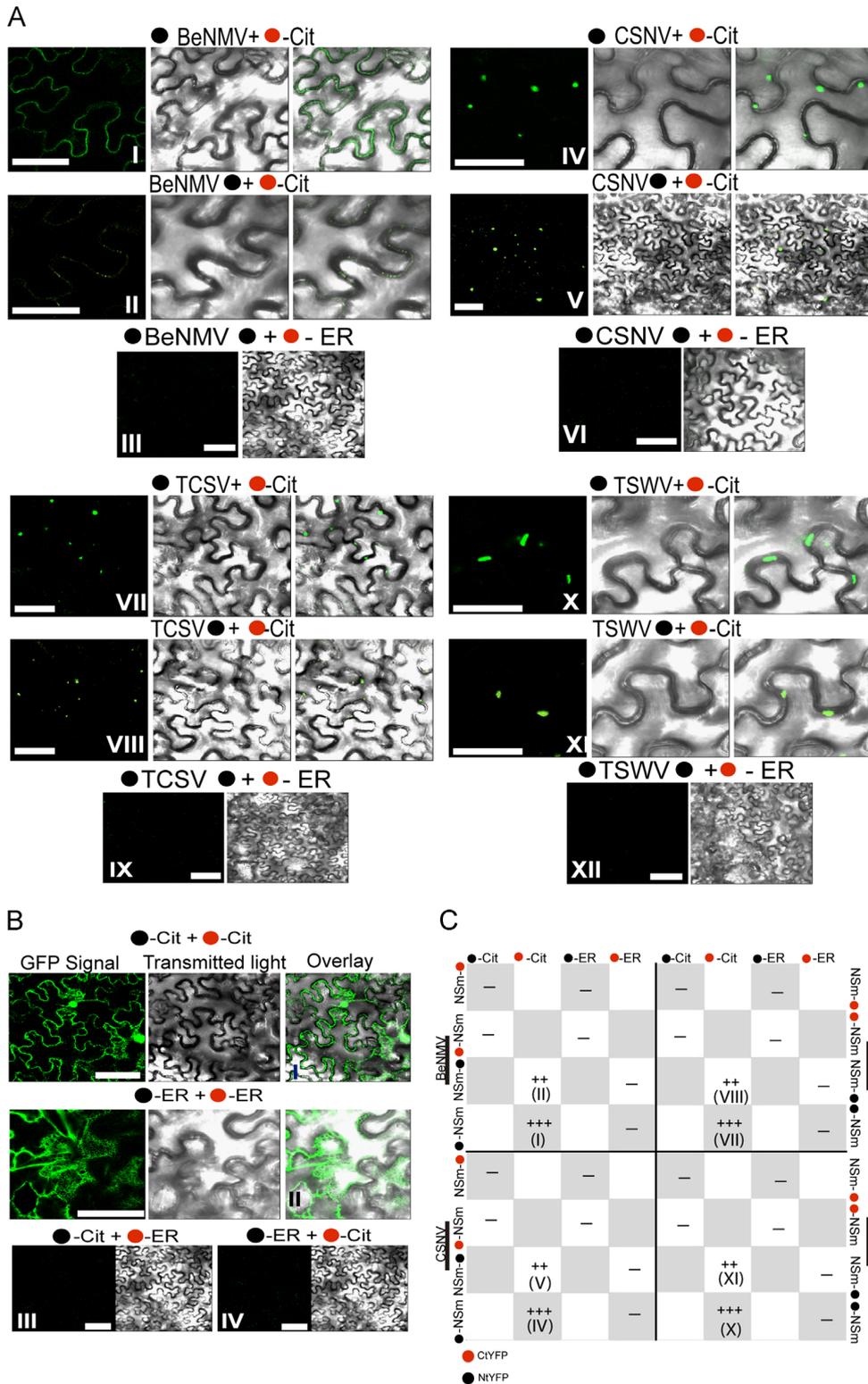


Fig. 2. ER membrane association of tospovirus NSm in living plant cells. (A) Subcellular localization (cytosolic or ER lumen) of the N- and C- termini of the NSm proteins of *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). The NSm proteins carrying the N-terminal (●) or the C-terminal (●) YFP fragments fused at their N-(●/●-NSm) or C-terminus (NSm-●/●) were transiently co-expressed *in planta* with the corresponding complementary YFP fragment addressed to the cytosol (●-Cit or ●-Cit) or to the lumen of the ER (●-ER or ●-ER). Images reveal the topology of the N-terminus (I, IV, VII and X) or the C-terminus (II, V, VIII and XI) of the NSm proteins. Positives and negative controls are indicated in pictures A and B. From left to right, GFP fluorescence, brightfield and overlapping images are shown. (C) The table summarize of analyzed interactions in which symbols -, +, ++ and +++ correspond to the absence, low, medium or high fluorescence signals, respectively. The fluorescence was monitored at 4 days post-infiltration using a confocal Leica TCS SL.

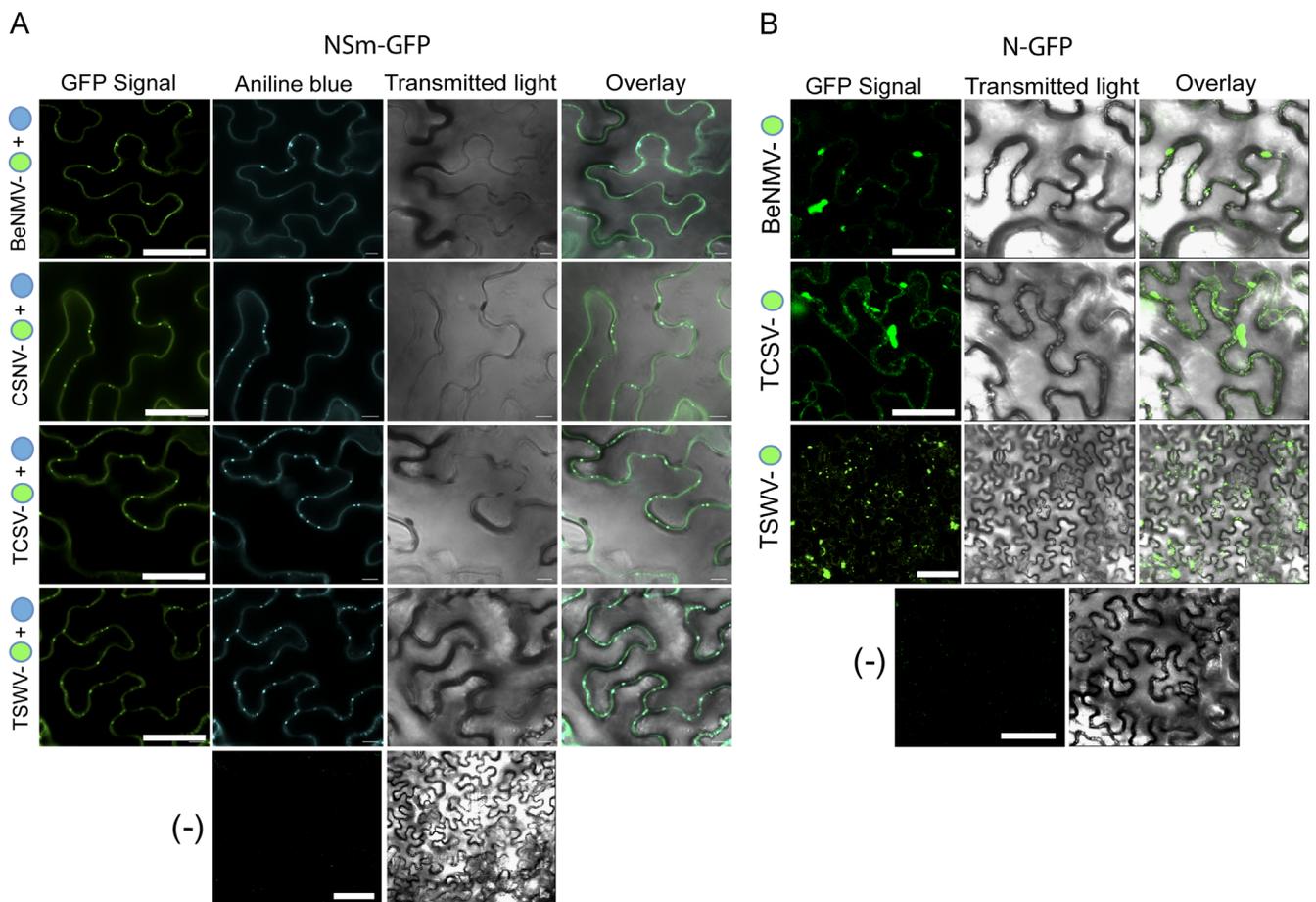


Fig. 3. Subcellular location of NSm (A) and N (B) proteins of *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), carrying the GFP (●) fused at their C-terminus. The fluorescence derived from *N. benthamiana* leaves at 3 days post-infiltration was monitored using a confocal Leica TCS SL. In the case of the NSm proteins, the callose deposits of the infiltrated *N. benthamiana* leaves were stained using aniline blue (●). The NSm proteins and the fluorochrome accumulate in similar punctate patterns at the cell periphery suggesting that the NSm proteins accumulate at PDs. Thick and thin bars correspond to 50 μm and 10 μm , respectively.

co-expressed with the N-YFPcyt (negative control). These results indicated that tospovirus N are more permissible for heterodimer than the NSm.

Finally, we analyzed the NSm–N interaction between proteins of the same (intra-association) or different (inter-association) tospovirus. Reconstitution of the fluorescence was observed in all intra- and inter-association combinations of the NSm and N proteins (Fig. 5F), being consistently more intense between proteins interactions of the same virus (Fig. 5E and F). Diffuse fluorescent signals were observed in all cells analyzed for the NSm–N combinations. No fluorescence was observed when the different fusion proteins were co-expressed with the N-YFPcyt BiFC construct. In all cases, the expression of the corresponding fusion proteins was confirmed by Western blot analysis, using specific antibodies that recognize the N- or C- terminus of the EYFP (data not shown).

Discussion

Tospovirus comprises a highly diverse number of plant-infecting virus species. The species of this genus present a negative stranded genome which has made impossible so far the availability of a reverse genetics tool to study their virus cycle. Therefore, elucidation of tospovirus protein functions has been hampered for decades since the complete genome sequences of TSWV were displayed (Kormelink et al., 1993). In addition, interactions among tospoviruses that are expected to happen in the field in mixed infections are poorly

understood. In the present study, we have selected four tospoviruses, that differ in the range of host plants, and two viral proteins that play a direct role during virus transport (the movement protein – NSm and the nucleocapsid protein – N), to analyze different properties (membrane topology and/or protein–protein interactions), that could give some light to understand the mixed infection process and/or the range of host plants. In addition, subcellular localization of NSm and N was performed.

The membrane topology analysis revealed that movement proteins of four tospoviruses are membrane proteins associated to the peripheral face of the cell membrane. The expression of four tospovirus NSm proteins *in vivo* and the subsequent chemical treatments addressed to remove the protein from the membrane fractions revealed that the protein was at the membrane fraction with 4 M urea but, with a more aggressive urea treatment (7 M), a major proportion of the respective proteins was at the soluble fraction, meanwhile the integral membrane Lep protein remained in the membrane fraction. These results indicate that the four NSm proteins analyzed herein are tightly associated to the biological membranes without being typical integral membrane proteins. Similar observation has been reported recently for the NSm of *Groundnut Bud Necrosis Virus* (GBNV) (Singh et al., 2014), although the authors leave open the possibility that the NSm could be an integral membrane protein. In our case, we propose that NSm proteins are not integrated in the cell membrane, since the more aggressive 7 M urea treatment removes the protein from the membrane fraction. Similar membrane-associated pattern has been reported for other members of

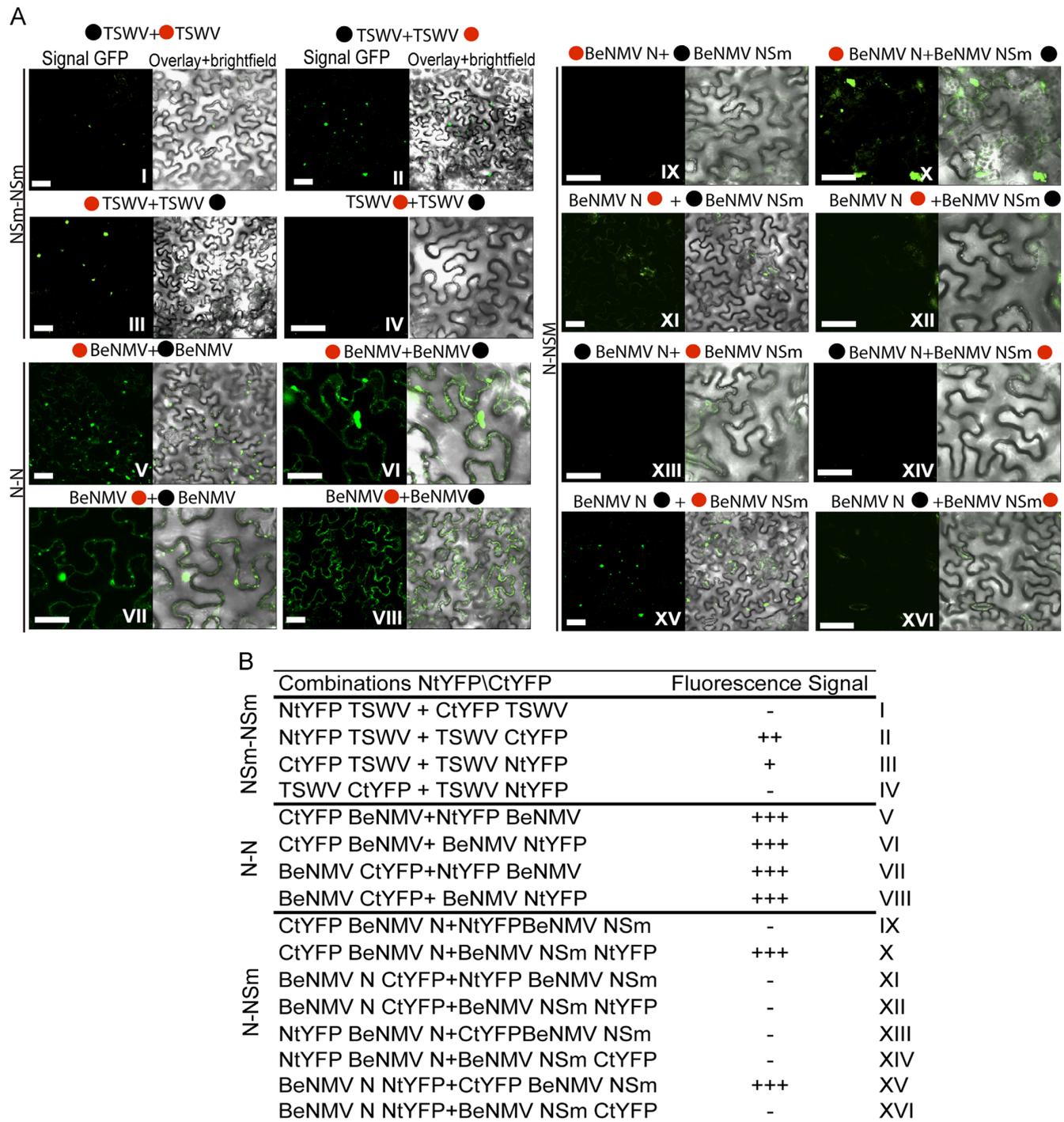


Fig. 4. Determination of the best location to fuse the two fragments of the YFP that will permit analyze the interactions between movement proteins (NSm-NSm), nucleocapsid proteins (N-N) and NSm-N proteins by BiFC. The NSm and/or N proteins, carrying the N terminal (●) or the C-terminal (●) YFP fragments fused at their N (●/●-NSm; ●/●-N) or C-terminus (NSm-●/●; N-●/●), were transiently co-expressed in *N. benthamiana* leaves by agroinfiltration. For the NSm dimerization, we selected the movement protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) meanwhile for the N-N and NSm-N interactions, we selected both proteins from *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV). (A) Confocal microscopy images corresponding to the different fusion protein combinations assayed for the NSm-NSm, N-N and N-NSm interactions. (B) The table summarize of analyzed interactions in which symbols -, +, ++ and +++ correspond to the absence, low, medium or high fluorescence signals, respectively. The fluorescence was monitored at 4 days post-infiltration using a confocal Leica TCS SL. Roman numbers I-XVI correspond to the images shown in A.

the 30K family, including the MP of *Prunus necrotic ringspot virus* (Martínez-Gil et al., 2009) and, more recently, the MP of *Tobacco mosaic virus*, the type member of the 30K family (Melcher, 2000). In this case, the previously reported topology model, as an integral ER membrane protein (Brill et al., 2000), has been modified for a

membrane-associated protein exposed to the cytoplasm compartment (Peiro et al., 2014b). The BiFC analysis, addressed to determine the cellular compartment in which NSm proteins are exposed, revealed that both the N- and C-termini of the four NSm proteins studied are located at the cytoplasm. Interestingly, Singh et al. (2014) have

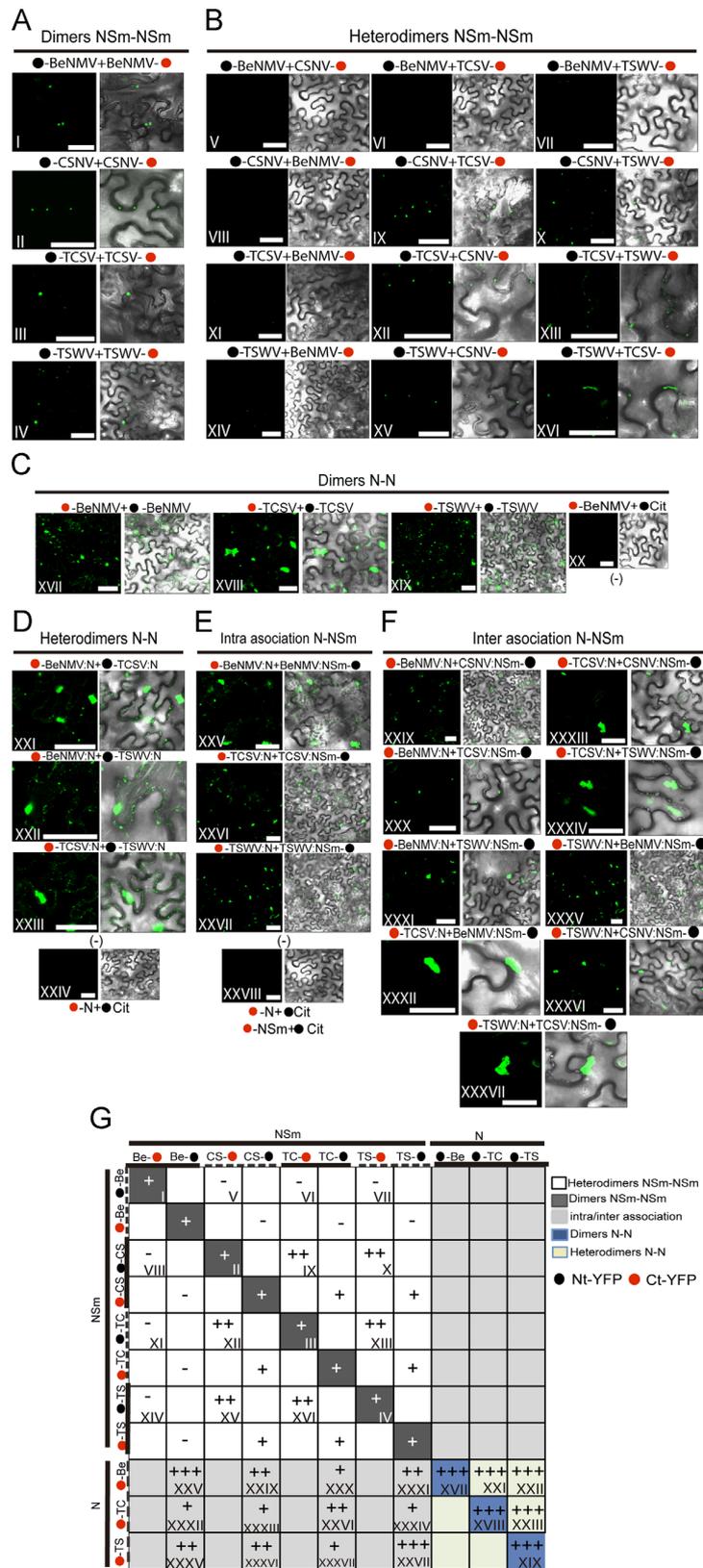


Fig. 5. BiFC analysis of the interaction between movement proteins (NSm) and nucleocapsid proteins (N). Dimers (A, C), heterodimers (B, D) and intra (E) or inter (F) interaction of the NSm and N proteins of the tospovirus species *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) were analyzed by BiFC. The NSm and/or N proteins, carrying the N-terminal (●) or the C-terminal (●) YFP fragments fused at their N- (●/●-NSm; ●/●-N) or C-terminus (NSm-●/●; N-●/●), were transiently co-expressed in *N. benthamiana* leaves by agroinfiltration. Confocal microscopy images corresponding to the different fusion protein combinations are indicated at the top of each image. All images contain two pictures corresponding to the YFP fluorescence alone or plus the brightfield. (G) The table summarizes analyzed interactions in which symbols -, +, ++ and +++ correspond to the absence, low, medium or high fluorescence signals, respectively. The fluorescence was monitored at 4 days post-infiltration using a confocal Leica TCS SL. Roman numbers I–XXXVII correspond to the images shown in A, B, C, D, E and F. Be, CS, TC and TS correspond to BeNMV, CSNV, TCSV and TSWV, respectively. Negative controls correspond to the expression of the NSm and N in combination with Cyt BiFC vectors (numbers XX, XXIV and XXVII). Bars correspond to 50 μm.

proposed that the NSm of GBNV associated to the membrane *via* the C-terminal coiled coil domain. *In silico* analysis revealed a coiled coil domain for the four NSm proteins analyzed (Supplementary Fig. 1), indicating that these C-terminal regions could be the responsible to target the protein to the membrane. These results together with the observation that NSm of tospovirus co-localize with ER (Dietzgen et al., 2012) and the reported hydrophobic domain located around the central region of the protein (Silva et al., 2001) allow us to propose a topological model of interaction of NSm with membrane in which the proteins are intimately associated with the cytosolic face of the ER membranes. This model is in agreement with the topology reported for other members of the 30K family (Laporte et al., 2003; Martínez-Gil et al., 2009; Peiro et al., 2014b). The observation that the secondary structure of the members of the 30K family shares a common core structure (Melcher, 2000) together with the capacity of MPs from nine different genera, to be functionally exchangeable in the same viral system for the local and systemic transport (Fajardo et al., 2013; Peiro et al., 2014b; Sanchez-Navarro et al., 2010; Sanchez-Navarro et al., 2006), supports the idea that the membrane-associated topology could be a general property for all members of the 30K family. This idea permits to argue that the NSm topology could not explain the different host range observed not only between the four tospoviruses analyzed herein but also between members of the 30K family. However, the same topology could be a prerequisite for compatible interactions between different MPs during mix infections.

Mixed infection favors genetic rearrangement of viral species (Roossinck, 1997), and in some cases, potentiates the process of viral infection (Bag et al., 2012; García-Cano et al., 2006). Therefore, here we evaluated the interaction between movement proteins and nucleocapsid proteins of distinct tospovirus species, investigating the dimerization and heterodimerization amongst homologous and heterologous proteins. First, we observed that the localization of the two EYFP BiFC fragments in chimeric NSm and N proteins is an important factor to be considered, at least for the dimerization of NSm and for the NSm–N interaction, suggesting topological constraints for such interactions. We observed dimerization for all NSm and N analyzed herein and also for the NSm–N interactions between proteins of the same virus. Our results, together with the results reported for TSWV (Soellick et al., 2000) and *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (Dietzgen et al., 2012), allow us to infer that such interactions could be extended to the rest of the species within the genus. In the case of the NSm–N interaction, for other MPs of the 30K family it has been shown to specifically interact with the cognate coat protein, *via* the C-terminal region (Aparicio et al., 2006; Carvalho et al., 2003; Sanchez-Navarro et al., 2006; Stavolone et al., 2005). From this observation, we can speculate that the recognition of the virus particles, in the virus assigned to the 30K family, occurs through the MP, probably by the C-terminus, although the specific domain of the NSm protein responsible for such interaction is still unknown. In the case of the MP of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), the interaction between MP and CP is mediated *via* the virion-associated protein and the coiled-coil domain located at the C terminus of the MP (Stavolone et al., 2005). Interesting, all tospovirus NSm analyzed here possess a predicted coiled-coil domain at the C-terminal region, representing a potential region to interact with the N protein. However, the recent observation that the NSm protein of GBNV could associate with membrane *via* the C-terminal coiled coil domain (Singh et al., 2014) would question whether this region could allow both functions.

The BiFC analysis addressed for heterodimers formation between NSm and N proteins revealed that the N proteins were able to form heterodimer between the three (BeNMV–N+TCSV–N, BeNMV–N+TSWV–N and TSWV–N+TCSV–N) analyzed proteins, with the fluorescence signal intensity comparable to that obtained for the homodimer formation. These results indicate that the region responsible for dimer interaction in the N proteins is very compatible, probably due to a common tertiary structure. However, the heterodimer between the NSm proteins revealed compatible interaction

only among TSWV, CSNV and TCSV. In contrast, BeNMV was unable to interact with the other heterologous NSm proteins. Interesting, TSWV, CSNV and TCSV have been grouped in the same clade into ‘New World’ tospoviruses, meanwhile BeNMV belongs to a complete new branch of the American species (de Oliveira et al., 2012; Silva et al., 2001). This observation supports the idea that compatible NSm interaction occurs only amongst viruses that are phylogenetically related. It is worthy to mention that BeNMV presents molecular and biological characteristics that are peculiar and different from the majority of the species in the genera placing it in a new clade of the ‘‘American group’’ (de Oliveira et al., 2012). Also, these results suggest that the NSm of BeNMV could be playing an important role in the low range of host plants reported for this virus.

Finally, we analyzed the heterologous interaction between NSm and N proteins. We observed that all analyzed NSm proteins are able to interact with the three heterologous N proteins assayed, indicating that the NSm does not discriminate between virus particles, including members of the ‘New world’ (TSWV, CSNV, TCSV) grouping in one clade and BeNMV placed in a complete new branch. This observation differs significantly from that reported for other MPs of the 30K family, in which the MPs of AMV, BMV, CMV and PNRSV interact with the cognate CP but not with the heterologous CPs (Aparicio et al., 2010; Nagano et al., 1997; Sanchez-Navarro and Bol, 2001; Sanchez-Navarro et al., 2006; Takeda et al., 2004). These results raise the question whether the capacity of the NSm to interact with heterologous N proteins is a peculiarity of the Tospovirus genus or could be extended to other members of the 30K family. Further analyses will be performed to answer those questions. Considering the mixed infections among tospovirus species, heterologous interaction between movement and nucleocapsid proteins may allow virus synergism, facilitating virus infection and/or evolution.

Conclusions

In summary, we presented data supporting a membrane-associated topology of the NSm proteins, with both the N- and C-termini oriented to the cytosolic face. This model is in agreement with the topology reported for other MPs of the 30K family. In addition, we presented data concerning the capacity of the NSm and N proteins to form homo- and hetero-dimers, an aspect that together with the observation that the NSm interacts with the cognate and heterologous N proteins could give new insight in the biology of the tospoviruses and their interactions in mixed infections.

Materials and methods

DNA manipulation

The movement protein genes of the *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) were amplified from pGEMT-Easy (NSm) vectors (de Oliveira et al., 2012; Silva et al., 2001) using specific primer with the *PciI/NheI* restriction sites. For the CSNV NSm the *BspHI/NheI* restriction sites were selected.

For gene amplification of viral nucleocapsid protein (N), total RNA from leaves of *N. benthamiana* plants infected with BeNMV, TCSV or TSWV viruses was extracted as stated previously (Sambrook et al., 1989). RT-PCR was processed following the manufacturer’s specifications (Invitrogen™) and using specific primers carrying the *NcoI/NheI* (BeNMV and TCSV) or *PciI/NheI* (TSWV) sites.

To fuse the hemagglutinin (HA) sequence at the C-terminus of NSm, the amplified genes were subcloned in the pSK+35S MPTMV:

HA construct (Peiro et al., 2014b), replacing the *Tobacco mosaic virus* (TMV) MP gene. The resultant clones, pSK+35S-NSmBeNMV:HA, pSK+35S-NSmCSNV:HA, pSK+35S-NSmTCSV:HA and pSK+35S-NSmTSWV:HA, contained the corresponding NSm fused to the HA epitope under the control of 35S promoter from *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) and the terminator from the potato proteinase inhibitor II (Popit) (GenBank X04118). Then, the 35S-NSm:HA expression cassettes were subcloned into the pMOG800 binary vector by using the restriction enzyme *XhoI*.

To evaluate the subcellular localization of NSm and N, all the amplified genes were cloned into the vector pSK35S-MPPNRSV:GFP (Herranz et al., 2005) by exchanging the PNRSV MP gene. Then, the expression cassettes were subcloned into the pMOG800 binary vector by using *BamHI* and *XhoI* restriction enzymes.

For the membrane topology and BiFC assays, we proceeded to fuse the N-terminal 154 amino acids of the yellow fluorescent protein sequence (N-YFP) or the C-terminal 84 residues of the YFP (C-YFP) to the N or C terminus of the different proteins. To do this, four constructs derived from the pSK+35S-eGFP-PoPit (Herranz et al., 2005) were made, in which we introduced the N-YFP or the C-YFP at the N or C terminus of the eGFP gene by using the *PstI*/*NcoI* or *NheI*/*XbaI* restriction sites, compatible with the *NcoI* (N terminus of the eGFP) or *NheI* (C-terminus of the eGFP), respectively. The resultant pSK+35S-N-YFP:eGFP-PoPit, pSK+35S C-YFP:eGFP-PoPit, pSK+35S-eGFP:N-YFP-PoPit and pSK+35S-eGFP:C-YFP-PoPit constructs permitted to fuse the N-YFP or the C-YFP at N- or the C-terminus of the foreign gene by replacing the eGFP gene using the *NcoI*/*NheI* restriction sites. All NSm and N genes were cloned in the four constructs and the derived expression cassettes were subcloned in the pMOG800 binary vector by using the restriction enzyme *SacI*.

The expression cassettes, which contained the N- and C-terminal fragments of the EYFP addressed to the endoplasmic reticulum lumen (N-YFPer and C-YFPer), corresponded to the clones pRT-YN-ER and pRT-YC-ER (provided by Dr. Jari P.T. Valkonen, University of Helsinki), (Zamyatnin et al., 2006). These cassettes were subcloned into pMOG800 vector. Binary vectors expressing N- and C-termini of the EYFP addressed to the cytosol (N-YFPcyt and C-YFPcyt) were provided by Dr F. Aparicio (Instituto Biología Molecular y Celular de Plantas “Primo Yúfera”, Valencia, Spain; Aparicio et al., 2006). All DNA manipulations were confirmed by plasmid DNA sequencing.

Subcellular localization of the NSm and N protein in vivo

To visualize the subcellular localization of the NSm and N proteins *in vivo*, the different constructs containing the corresponding protein with the eGFP fused at its C-terminus were transiently expressed *in planta*. To do this, *A. tumefaciens* (strain C58) cultures ($OD_{600}=0.4$) transformed with the corresponding binary plasmids pMOG800 were used to infiltrate *N. benthamiana* plants as it was previously described (Genovés et al., 2011). The plants were kept at 24 °C day–18 °C night, with a 16 h day 8 h night photoperiod. At 2 days post-infiltration, the fluorescence was monitored in a confocal Leica TCS SL ($\lambda_{exc}=488$ nm; $\lambda_{em}=500$ –550 nm).

Callose staining was done as previously described (Simpson et al., 2009). Briefly, leaves were infiltrated with a 2:3 v/v mixture of 0.1% aniline blue (Biosupplies) and 1 M glycerol at pH 9.5. Callose was visualized after 20 min staining using a confocal microscope ($\lambda_{exc}=405$ nm; $\lambda_{em}=410$ –480 nm).

Bimolecular fluorescence complementation assays

In the BiFC assays (Aparicio et al., 2006), addressed to determine the NSm topology and the dimers and heterodimers interaction between the NSm and/or N proteins, all different constructs were transiently expressed *in planta*. To do this, *A. tumefaciens* (strain C58)

cultures ($OD_{600}=0.4$) transformed with the corresponding binary plasmids pMOG800 were used to infiltrate *N. benthamiana* plants as it was previously described (Genovés et al., 2011). The plants were kept at 24 °C day–18 °C night, with a 16 h day 8 h night photoperiod. At 4 days post-infiltration, the fluorescence reconstitution was monitored using the confocal Leica TCS SL ($\lambda_{exc}=488$ nm; $\lambda_{em}=500$ –550 nm).

In the BiFC assay, addressed to characterize the NSm topology, the NSm carrying the N-YFP fused at the N- or C-terminus were transiently expressed with the C-YFP directed to the cytosol (C-YFPcyt) or to the lumen of the ER (C-YFPer). To increase the expression of the NSm and the C-YFP, to allow a better visualization of the fluorescent signal, both protein were co-expressed with the silencing suppressor HcPro from the *Tobacco etch virus*.

For *in vivo* interactions assays, the N-YFP or C-YFP was fused at the N- or C-terminus of the NSm or N proteins. The indicated pair of proteins were transiently expressed *in planta* by agroinfiltration, as described above, monitoring the putative reconstitution of the fluorescence at 4 dpi using the confocal Leica TCS SL ($\lambda_{exc}=488$ nm; $\lambda_{em}=500$ –550 nm).

Expression of the NSm proteins in planta, membrane sedimentation and Western blot assay

N. benthamiana leaves were agroinfiltrated with *A. tumefaciens* (strain C58) cultures transformed with the plasmid pMOG-35S-NSmBeNMV:HA, pMOG-35S-NSmCSNV:HA, pMOG-35S-NSmTCSV:HA or pMOG-35S-NSmTSWV:HA, as described previously (Herranz et al., 2005). After 3 days post-infiltration, the leaves were processed to obtain enriched membranous fractions as described previously (Genovés et al., 2011). The resultant membranous enriched pellet was resuspended in buffer A (20 mM HEPES, pH 6.8/150 mM potassium acetate/250 mM mannitol/1 mM $MgCl_2$ /2.5 μ L of protease inhibitor cocktail for plant cell and tissue extracts – Sigma) and divided into four aliquots for the untreated, alkaline wash or the two urea treatments, as described previously. Membranes were collected by ultracentrifugation (100,000g 20 min 4 °C). All fractions were analyzed by Western-blot in 12% SDS-PAGE gels. The gel was electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes following the manufacturer's instructions (Amersham). The detection of the proteins tagged with the HA epitope was realized by using an anti-HA (Sigma) and a secondary antibody conjugated with the peroxidase (Sigma). The chemiluminescence detection was made using the substrate recommended by Amersham (ECL+ Plus Western Blotting Detection System).

Percentage values of the relative concentration of movement protein associated with membrane or released after the different chemical treatments were measured with the program ImageQuant TL, version 8.1.0.0. Reference value equivalent to 100% was given based on the pixels quantification of the controls treated with lysis buffer.

Acknowledgments

We thank L. Corachán for her excellent technical assistance. This work was supported by Grant BIO2011-25018 from the Spanish granting agency DGICYT, joint Grant 564633/2010-0 CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and Grant 2009/00102-2 from FAP-DF (Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.031>.

References

- Adkins, S., 2000. Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. *Mol. Plant Pathol.* 1, 151–157.
- Amari, K., Vazquez, F., Heinlein, M., 2012. Manipulation of plant host susceptibility: an emerging role for viral movement proteins. *Front. Plant Sci.* 3, 10.
- Aparicio, F., Pallas, V., Sanchez-Navarro, J., 2010. Implication of the C terminus of the Prunus necrotic ringspot virus movement protein in cell-to-cell transport and in its interaction with the coat protein. *J. Gen. Virol.* 91, 1865–1870.
- Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J.A., Pallas, V., 2006. *In vitro* and *in vivo* mapping of the Prunus necrotic ringspot virus coat protein C-terminal dimerization domain by bimolecular fluorescence complementation. *J. Gen. Virol.* 87, 1745–1750.
- Bag, S., Mitter, N., Eid, S., Pappu, H.R., 2012. Complementation between two tospoviruses facilitates the systemic movement of a plant virus silencing suppressor in an otherwise restrictive host. *PLoS One* 7, e44803.
- Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C., Maule, A.J., 2010. Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 1403–1412.
- Brill, L.M., Nunn, R.S., Kahn, T.W., Yeager, M., Beachy, R.N., 2000. Recombinant tobacco mosaic virus movement protein is an RNA-binding, alpha-helical membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7112–7117.
- Brown, J.K., Idris, A.M., Alteri, C., Stenger, D.C., 2002. Emergence of a new cucurbit-infecting begomovirus species capable of forming viable reassortants with related viruses in the squash leaf curl virus cluster. *Phytopathology* 92, 734–742.
- Carvalho, C.M., Wellink, J., Ribeiro, S.G., Goldbach, R.W., Van Lent, J.W., 2003. The C-terminal region of the movement protein of Cowpea mosaic virus is involved in binding to the large but not to the small coat protein. *J. Gen. Virol.* 84, 2271–2277.
- Citovsky, V., Wong, M.L., Shaw, A.L., Prasad, B.V., Zambryski, P., 1992. Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* 4, 397–411.
- de Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., van Poelwijk, F., Peters, D., Goldbach, R., 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 72, 2207–2216.
- de Oliveira, A.S., Melo, F.L., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., Kitajima, E.W., Resende, R.O., 2012. Characterization of bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the genus Tospovirus. *PLoS One* 7, e38634.
- Dickert, F.L., Hayden, O., Bindeus, R., Mann, K.J., Blaas, D., Waigmann, E., 2004. Biomimetic QCM sensors for virus detection-screening of plant sap. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1929–1934.
- Dietzgen, R.G., Martin, K.M., Anderson, G., Goodin, M.M., 2012. In planta localization and interactions of impatiens necrotic spot tospovirus proteins. *J. Gen. Virol.* 93, 2490–2495.
- Fajardo, T.V., Peiro, A., Pallas, V., Sanchez-Navarro, J., 2013. Systemic transport of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family. *J. Gen. Virol.* 94, 677–681.
- García, J.A., Pallas, V., 2015. Viral factors involved in plant pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 11, 21–30.
- García-Cano, E., Resende, R.O., Fernández-Muñoz, R., Moriones, E., 2006. Synergistic interaction between Tomato chlorosis virus and Tomato spotted wilt virus results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology* 96, 1263–1269.
- Genovés, A., Pallas, V., Navarro, J.A., 2011. Contribution of topology determinants of a viral movement protein to its membrane association, intracellular traffic, and viral cell-to-cell movement. *J. Virol.* 85, 7797–7809.
- German, T.L., Ullman, D.E., Moyer, J.W., 1992. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 315–348.
- Hallwass, M., de Oliveira, A.S., de Campos Dianese, E., Lohuis, D., Boiteux, L.S., Inoue-Nagata, A.K., Resende, R.O., Kormelink, R., 2014. The Tomato spotted wilt virus cell-to-cell movement protein (NSm) triggers a hypersensitive response in Sw-5-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional Sw-5b resistance gene copy. *Mol. Plant Pathol.* 9, 871–880.
- Heinlein, M., Epel, B.L., 2004. Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. *Int. Rev. Cytol.* 235, 93–164.
- Herranz, M.C., Sanchez-Navarro, J.A., Aparicio, F., Pallas, V., 2005. Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *J. Virol. Methods* 124, 49–55.
- Idris, A.M., Brown, J.K., 2004. Cotton leaf crumple virus is a distinct western hemisphere begomovirus species with complex evolutionary relationships indicative of recombination and reassortment. *Phytopathology* 94, 1068–1074.
- Idris, A.M., Mills-Lujan, K., Martin, K., Brown, J.K., 2008. Melon chlorotic leaf curl virus: characterization and differential reassortment with closest relatives reveal adaptive virulence in the squash leaf curl virus clade and host shifting by the host-restricted bean calico mosaic virus. *J. Virol.* 82, 1959–1967.
- Kasteel, D., Wellink, J., Verver, J., Van Lent, J., Goldbach, R., van Kammen, A., 1993. The involvement of cowpea mosaic virus M RNA-encoded proteins in tubule formation. *J. Gen. Virol.* 74, 1721–1724.
- Kawakami, S., Watanabe, Y., Beachy, R.N., 2004. Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6291–6296.
- Kormelink, R., de Haan, P., Meurs, C., Peters, D., Goldbach, R., 1993. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *J. Gen. Virol.* 74, 790.
- Kormelink, R., Garcia, M.L., Goodin, M., Sasaya, T., Haenni, A.L., 2011. Negative-strand RNA viruses: the plant-infecting counterparts. *Virus Res.* 162, 184–202.
- Kormelink, R., Storms, M., Van Lent, J., Peters, D., Goldbach, R., 1994. Expression and subcellular location of the NSm protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* 200, 56–65.
- Lacorte, C., Ribeiro, S.G., Lohuis, D., Goldbach, R., Prins, M., 2007. The nucleoprotein of Tomato spotted wilt virus as protein tag for easy purification and enhanced production of recombinant proteins in plants. *Protein. Expr. Purif.* 55, 17–22.
- Laporte, C., Vetter, G., Loudes, A.M., Robinson, D.G., Hillmer, S., Stussi-Garaud, C., Ritzenthaler, C., 2003. Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of Grapevine fanleaf virus movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* 15, 2058–2075.
- Lucas, W.J., 2006. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344, 169–184.
- Martínez-Gil, L., Sánchez-Navarro, J.A., Cruz, A., Pallas, V., Pérez-Gil, J., Mingarro, I., 2009. Plant virus cell-to-cell movement is not dependent on the transmembrane disposition of its movement protein. *J. Virol.* 83, 5535–5543.
- McLean, B.G., Zupan, J., Zambryski, P.C., 1995. Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* 7, 2101–2114.
- Melcher, U., 2000. The '30K' superfamily of viral movement proteins. *J. Gen. Virol.* 81, 257–266.
- Mullis, S.W., Gitaitis, L.J.D., Sherwood, R.D., Csinos, A.C., 2004. First report of *Vidalia* onion (*Allium cepa*) naturally infected with Tomato spotted wilt virus and Iris yellow spot virus (family Bunyaviridae, genus Tospovirus) in Georgia. *Plant Dis.* 1285.
- Nagano, H., Okuno, T., Mise, K., Furusawa, I., 1997. Deletion of the C-terminal 33 amino acids of cucumber mosaic virus movement protein enables a chimeric brome mosaic virus to move from cell to cell. *J. Virol.* 71, 2270–2276.
- Nelson, R.S., Citovsky, V., 2005. Plant viruses. Invaders of cells and pirates of cellular pathways. *Plant Physiol.* 138, 1809–1814.
- Niehl, A., Heinlein, M., 2011. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 75–99.
- Pallas, V., Garcia, J.A., 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J. Gen. Virol.* 92, 2691–2705.
- Pappu, H.R., du Toit, L.J., Schwartz, H.F., Mohan, S.K., 2006. Sequence diversity of the nucleoprotein gene of iris yellow spot virus (genus Tospovirus, family Bunyaviridae) isolates from the western region of the United States. *Arch. Virol.* 151, 1015–1023.
- Pappu, H.R., Jones, R.A., Jain, R.K., 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Res.* 141, 219–236.
- Peiro, A., Canizares, M.C., Rubio, L., Lopez, C., Moriones, E., Aramburu, J., Sanchez-Navarro, J., 2014a. The movement protein (NSm) of Tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the tomato Sw-5 gene-based resistance. *Mol. Plant Pathol.* 15, 802–813.
- Peiro, A., Martínez-Gil, L., Tamborero, S., Pallas, V., Sanchez-Navarro, J.A., Mingarro, I., 2014b. The Tobacco mosaic virus movement protein associates with but does not integrate into biological membranes. *J. Virol.* 88, 3016–3026.
- Peremyslov, V.V., Pan, Y.W., Dolja, V.V., 2004. Movement protein of a closterovirus is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 78, 3704–3709.
- Pouwels, J., van der Velden, T., Willemse, J., Borst, J.W., van Lent, J., Bisseling, T., Wellink, J., 2004. Studies on the origin and structure of tubules made by the movement protein of Cowpea mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 85, 3787–3796.
- Ribeiro, D., Borst, J.W., Goldbach, R., Kormelink, R., 2009. Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. *Virology* 383, 121–130.
- Roossinck, M.J., 1997. Mechanisms of plant virus evolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 191–209.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Sanchez-Navarro, J., Fajardo, T., Zicca, S., Pallas, V., Stalvolone, L., 2010. Caulimoviridae tubule-guided transport is dictated by movement protein properties. *J. Virol.* 84, 4109–4112.
- Sanchez-Navarro, J.A., Bol, J.F., 2001. Role of the alfalfa mosaic virus movement protein and coat protein in virus transport. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 1051–1062.
- Sanchez-Navarro, J.A., Herranz, M.C., Pallas, V., 2006. Cell-to-cell movement of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of Ilar-, bromo-, cucumo-, tobamo- and comoviruses and does not require virion formation. *Virology* 346, 66–73.
- Schmaljohn, C.S., Nichol, S.T., 2001. *Hantaviruses*. Springer, Berlin; London.
- Scholthof, H.B., 2005. Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci.* 10, 376–382.
- Scholthof, K.B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G.D., 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 12, 938–954.
- Silva, M.S., Martins, C.R., Bezerra, I.C., Nagata, T., de Avila, A.C., Resende, R.O., 2001. Sequence diversity of NS(M) movement protein of tospoviruses. *Arch. Virol.* 146, 1267–1281.
- Simpson, C., Thomas, C., Findlay, K., Bayer, E., Maule, A.J., 2009. An Arabidopsis GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. *Plant Cell* 21, 581–594.

- Sin, S.H., McNulty, B.C., Kennedy, G.G., Moyer, J.W., 2005. Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 5168–5173.
- Singh, P., Indi, S.S., Savithri, H.S., 2014. Groundnut bud necrosis virus encoded NSm associates with membranes via its C-terminal domain. *PLoS One* 9, e99370.
- Soellick, T., Uhrig, J.F., Bucher, G.L., Kellmann, J.W., Schreier, P.H., 2000. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2373–2378.
- Stavolone, L., Villani, M.E., Leclerc, D., Hohn, T., 2005. A coiled-coil interaction mediates cauliflower mosaic virus cell-to-cell movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 6219–6224.
- Storms, M.M., Kormelink, R., Peters, D., Van Lent, J.W., Goldbach, R.W., 1995. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214, 485–493.
- Takeda, A., Kaido, M., Okuno, T., Mise, K., 2004. The C terminus of the movement protein of Brome mosaic virus controls the requirement for coat protein in cell-to-cell movement and plays a role in long-distance movement. *J. Gen. Virol.* 85, 1751–1761.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., Okuno, T., 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Lett.* 532, 75–79.
- Uhrig, J.F., Soellick, T.R., Minke, C.J., Philipp, C., Kellmann, J.W., Schreier, P.H., 1999. Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt tospovirus: identification and characterization of two interacting domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 55–60.
- van Lent, J., Wellink, J., Goldbach, R., 1990. Evidence for the involvement of the 58K and 48K proteins in the intercellular movement of cowpea mosaicvirus. *J. Gen. Virol.* 71, 219–223.
- Webster, C.G., Reitz, S.R., Perry, K.L., Adkins, S., 2011. A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. *Virology* 413, 216–225.
- Wellink, J., Vankammen, A., 1989. Cell-to-cell transport of cowpea mosaicvirus requires both the 58K/48K proteins and the capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 70, 2279–2286.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N., Lucas, W.J., 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246, 377–379.
- Zamyatnin, A.A., Solovyev, A.G., Bozhkov, P.V., Valkonen, J.P., Morozov, S.Y., Savenkov, E.I., 2006. Assessment of the integral membrane protein topology in living cells. *Plant J.* 46, 145–154.