



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Estudo da localização subcelular das proteínas p29
e CP de *Pepper ringspot virus* e desenvolvimento de
clone infeccioso de cDNA do vírus

Kelly Barreto Rodrigues

Brasília
2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Estudo da localização subcelular das proteínas p29 e CP
de *Pepper ringspot virus* e desenvolvimento de clone
infeccioso de cDNA do vírus

Kelly Barreto Rodrigues

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília
2014

Tese de autoria de Kelly Barreto Rodrigues, intitulada “Estudo da localização subcelular das proteínas p29 e CP de *Pepper ringspot virus* e desenvolvimento de clone infeccioso de cDNA do vírus”, apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, em 14 de maio de 2014, aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. Tatsuya Nagata
Biologia Celular – UnB (Orientador)

Dra. Anelise Franco Orílio
Biologia Celular – UnB

Prof. Dr. Cícero Nicolini
Fitopatologia – UESPI

Dra. Fernanda Rausch Fernandes
EMBRAPA- Quarentena Vegetal

Dr. Márcio Martinello Sanches
EMBRAPA- Cenargen

Dr. Renato de Oliveira Resende (Suplente)
Biologia Celular - UnB

Brasília
2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade depositada em minhas mãos e por ter me conduzido para mais esta vitória!

Aos meus amados pais José e Valdeci, por todo amor e carinho que sempre me deram, por não me deixarem desanimar nunca, por todo o apoio que me deram, em todas as áreas da minha vida! E obrigada por me darem a vida!!!

Ao meu orientador Dr. Tatsuya Nagata, por mais essa oportunidade, por mais esses quatro anos de confiança e por não ter deixado que eu desistisse desta carreira.

Muito obrigada a todos os meus amigos e colegas de laboratório (por ordem alfabética para não ter briga): Ana (Anita Patos), André, Bruna, Fran, Karol, Kênia, Layssa, Lorena, Raquel, Thaís, aos transitórios (que passaram pelo Lab nesses quatro anos) e a todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho. Perdoem-me se esqueci de alguém. Obrigada por estarem comigo, mesmo nos dias não tão bons...

Agradeço a todos dos laboratórios de Baculovírus e Virologia Vegetal, pela boa companhia e convivência, e pelas boas histórias para contar que nossas festinhas sempre rendem!!! Muito obrigada pela amizade e cooperação de vocês!

Muito obrigada a toda a minha família pela paciência e pelo carinho. Por não se esquecerem de mim nos (muitos) momentos que estive ausente! Tia Cy e tio Adail, muito obrigada pelo meu 'cantinho' no rancho, que continua lá, e por torcerem por mim mesmo estando longe! Às minhas queridas irmãs, Thaíze e Frany, por me oferecerem seus ouvidos e ombros, pernas e braços, para eu ter onde me apoiar! E ao meu querido irmão Gutim, pela compreensão e pelo trabalho que me deu todos esses anos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Universidade de Brasília pela oportunidade e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica pela colaboração.

A todos que de alguma forma me ajudaram e que torceram pela minha vitória!

RESUMO

Pepper ringspot virus (PepRSV) é um tobravírus e foi originalmente isolado no Brasil de plantas de *Capsicum* spp., que apresentavam sintomas de manchas anelares. As partículas são alongadas e rígidas e o seu genoma possui dois segmentos de RNA fita simples e senso positivo. Uma particularidade que o distingue de outros vírus conhecidos é a associação constante de suas partículas com as mitocôndrias do hospedeiro. Estudos preliminares *in silico* da proteína viral p29 de PepRSV sugeriram ser esta a proteína candidata a apresentar alguma interação com mitocôndrias. A capa proteica (CP) é a segunda candidata, por também estar presente na superfície das partículas virais, que se associam com mitocôndrias. Baseando-se nestas premissas, a interação das proteínas virais p29 e CP com a mitocôndria foi estudada, utilizando a estratégia de fusão da proteína-alvo com proteínas fluorescentes GFP ou YFP (*Green/Yellow Fluorescent Protein*), respectivamente, em vetores binários. Estas construções foram agro-inoculadas em folhas de *Nicotiana benthamiana* e as localizações subcelulares destas proteínas foram observadas em microscópio confocal. P29-GFP mostrou localização na periferia das células, provavelmente nos plasmodesmas, e a CP possivelmente no núcleo. Para confirmar a localização de p29 nos plasmodesmas, um experimento de co-localização foi realizado com a proteína 30 K de TMV, conhecida por se localizar no plasmodesma, e a co-localização de p29 e 30 K foi detectada. O desenvolvimento de clones infecciosos é uma estratégia padrão para estudar funções gênicas de vírus de RNA e é de vital importância para a elucidação da interação das proteínas virais com as mitocôndrias. Sendo assim, este trabalho também apresenta como objetivo a obtenção do clone de cDNA infeccioso de PepRSV. Para tanto, o RNA 2 foi clonado em vetor binário obtido a partir de um vetor de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) de TRV contendo o promotor 35S duplicado na região 5' e da ribozima na extremidade 3'. Para a clonagem do RNA 1, o segmento genômico foi dividido em dois fragmentos, que foram clonados em vetores comerciais, sendo então ligados utilizando sítios de enzimas de restrição. Pretende-se que o fragmento correspondente ao RNA 1 seja substituído pelo RNA 2 previamente inserido no VIGS modificado. Este clone infeccioso também poderá ser utilizado como VIGS para estudo básico de funcionamento de genes da planta.

Palavras-chave: tobravírus, *Pepper ringspot virus*, localização subcelular, clone infeccioso.

ABSTRACT

Pepper ringspot virus (PepRSV) is a tobnavirus and was originally isolated from plants of *Capsicum* spp., with ringspot symptoms in Brazil. The particles are elongated and rigid and its genome has two segments of single stranded RNA and positive sense. Unique feature that distinguishes it from other known viruses is the specific and organized association of the virus particles with mitochondria of the host cell. Preliminary *in silico* studies of the viral protein p29 of PepRSV suggested that this is the candidate protein that has some interaction with mitochondria. The coat protein (CP) is the second candidate, since it is also present on the surface of viral particles, which associates with mitochondria. With these assumptions, the interaction of viral proteins p29 and CP with the mitochondria was studied, using the strategy of fusion of the target proteins with fluorescent proteins GFP or YFP (Green / Yellow Fluorescent Protein), respectively, using binary vectors. These constructions were agro-inoculated to *Nicotiana benthamiana* leaves and the location of both fused proteins was observed with confocal laser microscope. P29-GFP was located in periphery of cells, most likely in plasmodesmata, and CP was probably in nuclei. Aiming to confirm the localization of p29 in plasmodesmata, an experiment of co-localization was performed with 30 K protein of TMV, a movement protein well known to be located in plasmodesma, and co-localization of p29 and 30 K was detected. The development of infectious clones is a standard strategy for RNA viruses to study gene functions and will be critical for elucidating the interaction of viral proteins with the mitochondria. Thus, this work also had the objective of obtaining infectious cDNA clone PepRSV. To this end, the RNA 2 was cloned into binary vector obtained from a vector of virus-induced gene silencing (VIGS) of TRV, which contain the dual 35S promoter in the 5' region and the ribozyme in the 3' end. For cloning of RNA 1, the genome segment was divided into two fragments, which were cloned into commercial vectors and then ligated using restriction enzyme sites. Subsequently, the corresponding RNA fragment 1 will be replaced by the RNA 2 previously inserted in the modified VIGS. This infectious clone can also be used as a VIGS for basic studies of gene function in plants.

Key-words: tobnavirus, *Pepper ringspot virus*, subcelular localization, infectious clone.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
CAPÍTULO I – Introdução Geral	3
1 - Os Tobravírus	3
1.1 - <i>Pepper ringspot virus</i>	5
2 - Proteínas de movimento viral	7
3 - Clones infecciosos	9
4 - Objetivos.....	11
4.1 - Objetivos gerais.....	11
CAPÍTULO II - Localização subcelular das proteínas p29 e CP de PepRSV e co-localização de p29 com a proteína 30K de <i>Tobacco mosaic virus</i>	12
1 – Introdução	12
2 - Materiais e métodos	14
2.1 – RT- PCR e clonagem em pENTR 2B.....	14
2.2 - Clonagem em vetor binário pK7F(ou Y)WG2,0	17
2.3 – Obtenção do controle pK7FWG2 Δ ccdB	19
2.4 – Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e inoculação em <i>Nicotiana benthamiana</i> por ATTE (<i>A. tumefaciens</i> transient expression).....	19
2.5 - Agroinoculação das proteínas p29 de PepRSV e 30K de TMV.....	20
2.6 - Marcação da mitocôndria com Mitotracker Red CMXRos	21
2.7 - Análise da expressão das construções por microscopia confocal.....	21
3 – Resultados e discussão	21
3.1 – Confirmação da amplificação dos genes e clonagem em pENTR.....	21
3.2 – Confirmação da clonagem em vetor binário pK7F(ou Y)WG2,0	23
3.3 - Visualização da expressão das proteínas fusionadas p29-GFP e CP-YFP em <i>Nicotiana benthamiana</i> por microscopia confocal.....	24

3.4 – Confirmação da co-localização de p29 de PepRSV com a proteína 30K de TMV no plasmodesma em <i>Nicotiana benthamiana</i> por microscopia confocal.	29
CAPÍTULO III – Construção de clone de cDNA infeccioso de PepRSV	31
1 - Introdução.....	31
2 – Materiais e métodos.....	33
2.1 - Isolado viral e extração de RNA viral.....	34
2.2 – RT-PCR do RNA 2 de PepRSV e clonagem em pGEM –T Easy	34
2.3 – Clonagem do RNA 2 de PepRSV em vetor binário.....	35
2.4 – Síntese do DNA complementar (cDNA) e PCR da região 5´ do RNA1 38	
2.4.1 - Fusão do promotor 35S duplicado de <i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV) com a região 5´ do RNA 1 e clonagem em pGEM-T Easy	40
2.5 - Síntese do DNA complementar (cDNA) e PCR da região 3´ do RNA1	42
2.6 – Obtenção do RNA1 de PepRSV	43
2.8 - Substituição do RNA 2 de PepRSV pelo RNA 1 no vetor pPepRSV-RNA2.....	46
3 - Resultados e Discussão	47
3.1 – Amplificação do RNA 2 de PepRSV e clonagem em vetor binário	47
3.2 - Amplificação do cDNA da região 5´-RNA1 por PCR e clonagem em pGEM-T Easy	49
3.3 - <i>Overlap-extension PCR</i> da sequência do promotor 35S duplicado com 5´-RNA1.....	50
3.4 - Amplificação do cDNA da região 3´-RNA1 por PCR e clonagem no vetor pCR4-TOPO	52
3.5 - Obtenção do RNA1 de PepRSV.....	53
3.6 - Ligação do RNA 1 de PepRSV no vetor pPepRSV-RNA2	56
CAPÍTULO IV – Discussão geral e perspectivas	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO I – Artigo submetido (em análise)	73

CAPÍTULO I – Introdução Geral

1 – Os Tobravírus

O gênero *Tobravirus* é composto por apenas três espécies, *Pepper ringspot virus* (PepRSV), *Tobacco rattle virus* (TRV) e *Pea early-browning virus* (PEBV) (Harrison, 1973; Robinson & Harrison, 1989a, b; Robinson, 2005), e são naturalmente transmitidos por nematoides do gênero *Trichodorus* (Ploeg *et al.*, 1993; Taylor & Brown, 1997).

TRV, espécie tipo do gênero *Tobravirus*, tem ampla ocorrência geográfica (Europa, América do Norte e Central, Nova Zelândia, Austrália, China e Japão), e pode infectar grande número de espécies de plantas, causando danos econômicos em tabaco, batata e bulbos ornamentais. PEBV foi encontrado na Europa Ocidental, especialmente na Holanda e Reino Unido, e infecta principalmente leguminosas, incluindo ervilha e feijão. PepRSV, que tem sido descrito apenas no Brasil (Kitajima e Costa, 1969; Macfarlane, 1999; Adams *et al.*, 2012) provoca doença principalmente em tomate e pimenta (MacFarlane, 1999).

As partículas virais dos tobravírus (Figura 1) são alongadas e rígidas e o seu genoma possui dois segmentos de RNA (RNA 1 e RNA 2), ambos de fita simples e sentido positivo, que são encapsidados separadamente (Kitajima *et al.*, 1969; Harrison e Robinson, 1978; Bergh *et al.*, 1985). As moléculas de RNA1 são semelhantes em tamanho, variando de 6791 a 7073 nucleotídeos (nts), e possuem uma organização gênica conservada, porém com similaridade nucleotídica limitada entre os três vírus (58-65%). No entanto, diferentes isolados da mesma espécie viral apresentam elevada identidade de sequência (Sudarshana e Berger, 1998; MacFarlane, 1999).

O RNA 1 dos tobravírus possui três ORFs: a ORF1 codifica as proteínas de replicação viral, sendo a metiltransferase/helicase a subunidade menor da replicase (136 kDa) e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) a subunidade maior (195 kDa) (Hamilton *et al.*, 1987; Koonin, 1991), sendo expressa devido ao mecanismo de *read-through* (ou supressão) do códon de terminação do gene da helicase; a ORF2 codifica uma proteína de 29 kDa (p29

ou P1a), possível proteína de movimento (Hamilton e Baulcombe, 1989), e a ORF3 um possível supressor de silenciamento gênico de 12 kDa (p12 ou P1b) (Jaubert *et al.*, 2011).

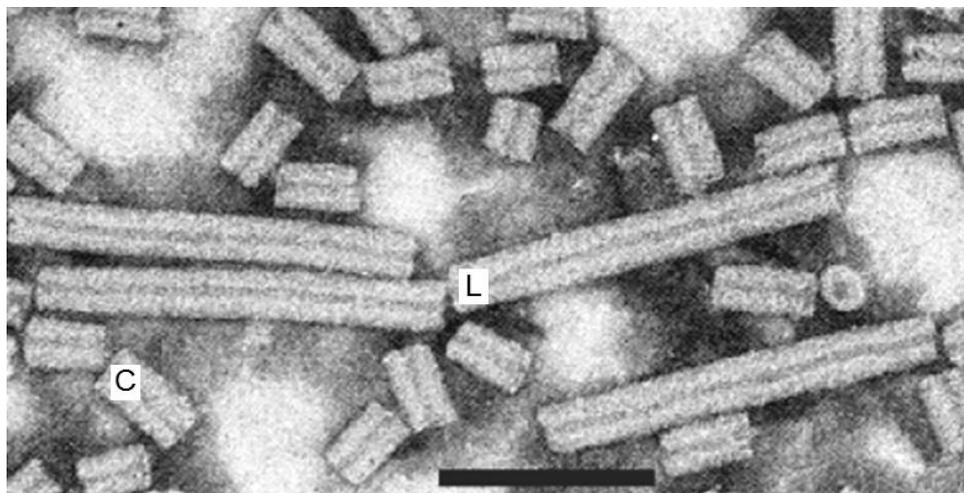


Figura 1 - Micrografia mostrando as partículas de PepRSV associadas às mitocôndrias. M=mitocôndria, L= partícula longa do PepRSV, C= partícula curta do PepRSV (Gaspar *et al.*, 1984).

Em contraste com o RNA1, estudos de hibridação mostraram que o RNA 2 de diferentes isolados da mesma espécie viral tem muito pouca identidade de sequência de nucleotídeos (Robinson e Harrison, 1985a). O RNA 2 possui uma única sequência aberta de leitura (ORF), que corresponde ao gene da capa proteica viral (CP), também chamada proteína 2a. O RNA 2 pode, ainda, codificar mais duas proteínas não estruturais, 2b e 2c, localizadas *downstream* da CP, que estão envolvidas no processo de transmissão por nematoides (Ploeg *et al.*, 1993; MacFarlane *et al.*, 1995, 1996; Hernández *et al.*, 1997). Entretanto, o isolado de PepRSV de Campinas (CAM) não possui esses genes em seu RNA 2 (Bergh *et al.*, 1985). Estudos indicam que pelo menos a presença da proteína 2b é essencial para a transmissão do vírus por nematoides (Hernández *et al.*, 1996; MacFarlane, 1999; Visser *et al.*, 1999; Vassilakos *et al.*, 2001).

Na natureza, muitas moléculas do RNA 2 de tobavirus são derivadas de recombinações com RNA 1, particularmente na extremidade 3', que podem conter sequências codificantes e não codificantes derivadas do segmento do RNA 1 (Hamilton *et al.*, 1987; MacFarlane, 1997; Crosslin *et al.*, 2003). A região 3' do único isolado de PepRSV sequenciado até então (isolado CAM),

apresenta possui pouco mais que 450 nucleotídeos (nts) recombinantes do RNA 1. No entanto, essa região pode chegar a mais de 1 kb, como ocorre com o RNA 2 de TRV (Bergh *et al.*, 1985).

Recentemente, duas novas sequências do RNA 2 de PepRSV de dois novos isolados (Lavrinha e Pivo4) foram sequenciadas e comparadas com a sequências do único isolado obtido até então (Campinas). O RNA 2 do isolado Lavrinha apresenta tamanho de 2044 nts, enquanto que Pivo4 é menor, com 1877 nts., ambos maiores que o isolado CAM (1799 nts) (Batista *et al.*, 2014).

1.1 – *Pepper ringspot virus*

PepRSV foi originalmente isolado no Brasil (Campinas, São Paulo), na década de 60 (Kitajima *et al.*, 1969) de plantas de *Capsicum* spp., que apresentavam sintomas de manchas anelares nas folhas e partículas virais típicos de tobrovírus, sendo então considerado como uma estirpe de TRV (Kitajima *et al.*, 1969; Harrison e Robinson, 1986; MacFarlane, 1999; Robinson, 2005). Entretanto, a posterior análise da sua sequência genômica revelou ser um vírus distinto de TRV (Robinson e Harrison, 1985; Bergh *et al.*, 1985).

O RNA 1 de PepRSV apresenta 6828 bases (referência no NCBI: NC003669; 1993) e é mais longo que o RNA 2 (referência no NCBI: NC003670), que apresenta 1799 bases (Bergh *et al.*, 1985) (Figura 2).

As duas moléculas de RNA genômico de PepRSV apresentam *cap* na extremidade 5' e uma estrutura do tipo t-RNA (RNA transportador) na extremidade 3'. O RNA 2 tem uma característica incomum, pois a extremidade 5' contém dois conjuntos diferentes de repetição direta em *tandem* de 2x119 nucleotídeos (nts) e 2x76 nts na sequência líder da extremidade 5' (antes do códon de iniciação). O RNA 2 possui uma única sequência aberta de leitura (ORF), que corresponde ao gene da capa proteica viral (CP), também chamada proteína 2a. Os 459 nucleotídeos da extremidade 3' do RNA 2 são idênticos à extremidade 3' do RNA 1 (Bergh *et al.*, 1985). Essas características incomuns dificultam sobremaneira os procedimentos de clonagem genômica.

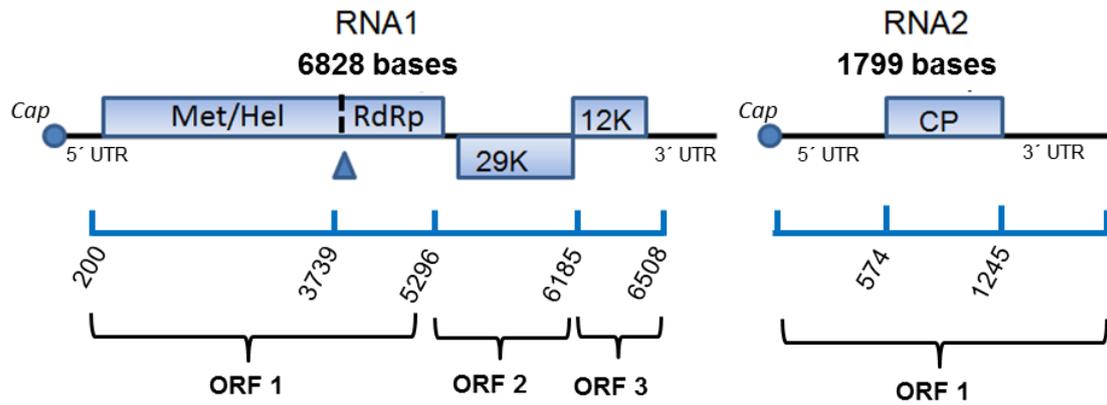


Figura 2 - Representação esquemática do mapa genômico de PepRSV. O RNA 1 possui 6828 bases e codifica as subunidades pequena e grande (por *read-through* ribossomal) da replicase, a possível proteína de movimento célula-a-célula (p29) e o possível supressor de silenciamento gênico (12K). O RNA 2 apresenta 1799 bases e codifica a proteína capsial (CP). Met = Metiltransferase, Hel = Helicase, RdRp = RNA polimerase dependente de RNA, Δ = *read-through*. A escala indica o número de bases.

Uma particularidade que distingue PepRSV de outros vírus conhecidos é a associação constante de suas partículas com as mitocôndrias do hospedeiro, e pode ser observada em microscópio eletrônico: as partículas ficam agregadas na membrana externa de mitocôndrias (Figura 3), às vezes somente a partícula longa (RNA 1; Kitajima & Costa, 1969), em outras, ambas as partículas (RNA 1 e RNA 2; Gaspar *et al.*, 1984).

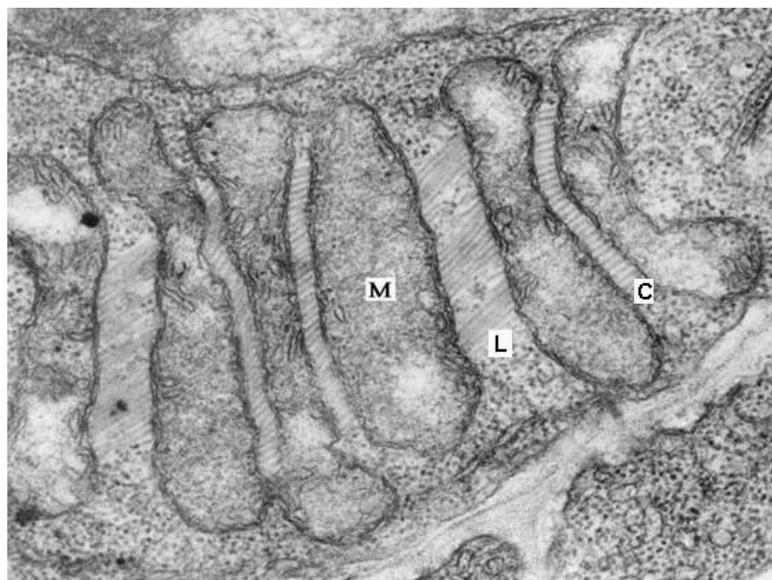


Figura 3 – Visualização em microscópio eletrônico das partículas de *Pepper ringspot virus* negativamente contrastadas com 2% fosfotungstato. O segmento maior (L) corresponde ao RNA 1, e o menor (C) corresponde ao RNA 2. Barra = 100 nm. Adaptado de: <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=347&figno=07>.

Outros vírus também podem apresentar esse tipo de associação, como *Henbane mosaic virus* (gênero *Potyvirus*) (Kitajima & Lovisolo, 1972) e *Broad bean wilt virus* (gênero *Fabavirus*) (Hull e Plaskitt, 1974), no entanto sua associação não é tão específica e constante como observado com PepRSV. Uma associação similar foi observada nos vírus *Cymbidium ringspot virus* (gênero *Tombusvirus*) (Russo e Martelli, 1981) e *Beet yellow stunt virus* (gênero *Closterovirus*) (Esau, 1979), porém nas cristas das mitocôndrias.

2 – Proteínas de movimento viral

Vírus de plantas geralmente possuem proteínas de movimento (MP-*movement proteins*) que são essenciais para o movimento intracelular do vírus e disseminação sistêmica (Lucas, 2006; Taliansky *et al.*, 2008). Devido à presença da parede celular rígida em plantas, esses vírus só podem disseminar para as células vizinhas através dos plasmodesmas (PD), que são canais citoplasmáticos que penetram a parede celular, dando continuidade citoplásmica entre as células adjacentes.

As proteínas de movimento conhecidas podem ser divididas em quatro superfamílias: os produtos das *triple gene block*, como por exemplo dos gêneros potexvírus e carlavírus; as MPs dos timovírus; as proteínas menores que 10 kDa codificadas pelos carmovírus e alguns geminivírus; e a “superfamília 30 kDa”, relacionadas com a MP 30 kDa de *Tobacco mosaic virus* (TMV) MP.

Os primeiros estudos sobre plasmodesma criaram um consenso que apenas moléculas menores que 1 kDa conseguiam passar passivamente por estes canais (Tucker, 1982; Goodwin, 1983; Erwee e Goodwin, 1985; Terry e Robards, 1987; Burnell, 1988). No entanto, trabalhos posteriores mostraram que sondas fluorescentes, como GFP (*green fluorescent protein*), com tamanho molecular de até 50 kDa, conseguiam passar através do PD (Oparka *et al.*, 1999; Fisher e Cash-Clark, 2000; Lucas e Lee, 2004).

Ainda assim, as partículas e genomas virais são muito grandes para se moverem passivamente pelo PD. Dessa forma, para que ocorra o movimento

viral, os vírus de planta com genoma de RNA desenvolveram dois principais mecanismos para possibilitar o movimento viral célula-a-célula.

O primeiro, exemplificado pelo *Tobacco mosaic virus* (TMV), a MP codificada pelo vírus se associa ao retículo endoplasmático (RE) e membrana plasmática da célula vegetal, e posteriormente se localizam no PD, modificando-o para aumentar o tamanho de limite de exclusão (SEL), possibilitando a passagem intercelular do complexo ribonucleoproteico (isto é, o RNA viral, a MP e complexos adicionais de replicação viral) (Tomenius *et al.*, 1987; Wolf *et al.*, 1989; Ding *et al.*, 1992; McLean *et al.*, 1995; Kawakami *et al.*, 2004; Schoelz *et al.*, 2011). Neste mecanismo, a CP do TMV é dispensável para o movimento célula-a-célula através do plasmodesma.

No segundo mecanismo, exemplificado pelo *Cowpea mosaic virus* (CPMV), a MP forma estruturas tubulares que atravessam o plasmodesma, através dos quais os vírions se movem para as células vizinhas. Neste modelo, a CP viral é necessária para CPMV.

Grande parte do conhecimento sobre movimento viral em plantas é proveniente de estudos pioneiros com TMV, um vírus de RNA sentido positivo que, como a maioria dos vírus pertencentes a esse grupo, se replica no citoplasma da célula infectada (Deom *et al.*, 1987; Wolf *et al.*, 1989; Citovsky *et al.*, 1990; 1992; Ding *et al.*, 1992). Trabalhos anteriores forneceram evidências de que a proteína 30 K de TMV facilita o movimento do vírus no hospedeiro, ligando-se a ácidos nucleicos (Citovsky *et al.*, 1990; Citovsky *et al.*, 1992; Kiselyova *et al.*, 2001) e transportando o complexo viral para e através do plasmodesma (Tomenius *et al.*, 1987; Wolf *et al.*, 1989).

Portanto, a MP de TMV é amplamente conhecida por se localizar no plasmodesma (Deom *et al.*, 1990; Atkins *et al.*, 1991; Melcher, 2000; Heinlein *et al.*, 2008), sendo então utilizada como um marcador desta estrutura e, conseqüentemente, de proteínas funcionalmente semelhantes a ela.

3 - Clones infecciosos

Clones de cDNA infecciosos de vírus de RNA são ferramentas muito utilizadas para estudos básicos de replicação viral e interações vírus-hospedeiro. Desde a década de 80, há relatos de clones infecciosos de RNA de vírus de plantas, sendo a construção de um clone de transcritos de cDNA infeccioso (o cDNA é transcrito *in vitro* e então é inoculado) de *Brome mosaic virus* (BMV) (Ahlquist *et al.*, 1984) um marco para o desenvolvimento de clones infecciosos de vírus vegetal. A partir de então, muitos desses vírus tem sido adaptados como ferramentas biotecnológicas (Boyer e Haenni, 1994; Yusibov *et al.* 1999; Marillonet *et al.* 2005; Lindbo 2007), e vem sendo utilizados como vetores virais para expressão de proteínas exógenas, para estudos de genética reversa de funções gênicas e como indutores de silenciamento gênico (*Virus-induced gene silencing*; VIGS) (Liu *et al.*, 2002; Brigneti *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005; Nagamatsu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010).

Existem duas estratégias para o desenvolvimento de clones infecciosos. Na primeira, o cDNA viral, proveniente da transcrição reversa do RNA genômico, é clonado sob o comando do promotor da RNA polimerase de bacteriófagos, seguindo-se à transcrição *in vitro*, que origina transcritos que serão diretamente inoculados em plantas suscetíveis; a segunda metodologia emprega a clonagem do cDNA viral, sob o comando do promotor 35S de *Cauliflower mosaic virus*, que será reconhecido pela polimerase da planta, gerando clones que serão inoculados nas plantas via *Agrobacterium tumefaciens* (clones agroinfecciosos). Esta última metodologia, comparada à primeira, geralmente requer mais passos para a clonagem devido ao tamanho das construções plasmidiais resultantes. O cDNA viral, cujo tamanho é normalmente superior a 6 kb (Zaccomer *et al.*, 1995), é clonado em vetores binários, que costumam ter mais de 10 kb (Murai, 2013), resultando em plasmídeos grandes e instáveis. Porém, nesta metodologia, não há necessidade da síntese de transcritos, apresentando maior facilidade de manipulação e inoculação, uma vez que a manipulação de bactérias requer menos cuidados comparada à de transcritos.

Algumas dificuldades para o desenvolvimento de clone infeccioso de vírus de RNA são relatadas por Boyer e Haenni (1994), como: dificuldade de

manipular o RNA, não ser possível amplificar o genoma de alguns vírus em uma única fita de cDNA devido à presença de estruturas secundárias complexas no gRNA (RNA genômico); heterogeneidade de transcritos e incorporação de mutações nas 5' e 3' UTRs (*untranslated regions*), que podem afetar significativamente a infectividade do clone. A síntese de RNAs na região 5' UTR pode ser iniciada corretamente, pois são sintetizados a partir de cDNAs ligados ao promotor transcricional, mas a terminação da transcrição é realizada usando o plasmídeo linearizado como molde, o que pode gerar transcritos contendo inserções de nucleotídeos não virais na região 3'UTR (Dzianott e Bujarski, 1989). Uma estratégia para contornar este problema é a inserção de um sítio de restrição logo após o último nucleotídeo viral, restando poucos ou nenhum nucleotídeo não viral (*run-off*), ou ainda a adição de sequência de ribozima (RNA com atividade autocatalítica) na região 3' terminal (Dzianott e Bujarski, 1989; Pyle, 1993).

Turpen e colaboradores (1993) foram os primeiros a descrever um método para transferir o cDNA viral para células de plantas utilizando *A. tumefaciens*, que continha o vetor binário carregando o cDNA do genoma de TMV (*Tobacco mosaic virus*). Diversos vírus vegetais, além do TRV, já foram convertidos em vetores virais, como *Potato virus X* (PVX) (Chapman *et al.*, 1992), *Alfalfa mosaic virus* (AMV) (Sanchez-Navarro *et al.*, 2001), *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Sudarshana *et al.*, 2006), e seu uso vem sendo ampliado, podendo ser utilizados para VIGS, estudos de função gênica de vírus, produção de proteínas recombinantes funcionais, incluindo vacinas, antígenos e enzimas (Chapman *et al.*, 1992; Gopinath *et al.*, 2000; Sanchez-Navarro *et al.*, 2001; Gleba *et al.*, 2005; Musiychuk *et al.*, 2007; Fujiki *et al.*, 2008).

4 – Objetivos

4.1 – Objetivos gerais

- 1 - Determinar a localização subcelular das proteínas virais p29 e CP e sua possível localização em relação às mitocôndrias, utilizando microscópio confocal;
- 2 – Confirmar se p29 de PepRSV co-localiza no plasmodesma com a proteína 30K de TMV;
- 3 – Construção de clone de cDNA infeccioso do RNA 1 e RNA 2 de PepRSV.

CAPÍTULO II - Localização subcelular das proteínas p29 e CP de PepRSV e co-localização de p29 com a proteína 30K de *Tobacco mosaic virus* (TMV)

1 – Introdução

Uma característica marcante do PepRSV é a agregação de suas partículas virais na membrana externa das mitocôndrias (Kitajima e Costa, 1969). Esta associação é bem ordenada, mas as características biológicas e físico-químicas dessa interação não são elucidadas.

Estudos preliminares realizados *in silico* (dados não publicados) sugeriram que a proteína viral p29 do PepRSV possui peptídeo sinal para a mitocôndria, revelando uma possível interação dessa proteína na sua localização celular (www.bioapps.rit.albany.edu/MITOPRED/). Um alinhamento realizado entre as proteínas p29 de PepRSV com a proteína p29 de outro tobavírus, o *Tobacco rattle virus* (TRV), revelou uma similaridade entre essas duas proteínas (identidade de aminoácidos de 60%) (Figura 4). Apesar da analogia, a proteína p29 de TRV não possui o peptídeo sinal para a mitocôndria, não havendo também relatos sobre a associação de partícula viral e mitocôndrias.

SeqA Name	Len(aa)	SeqB Name	Len(aa)	Score
1 gi 20178601 ref NP_620035.1	256	2 gi 260908105 gb ACX54060.1	252	59

PLEASE NOTE: Some scores may be missing from the above table if the alignment was done using multiple CPU mode. Please check the output

Alignment

```

Pepper ringspot virus      MENDKSLVALKKKTFELSNFSLGSEVLFVDQKRKRPKYFHRRRQVVLNN 50
Tobacco rattle virus      ME-DKSLATLKKKTFEVSFKFSNLGAIELFVDGRRKRPKYFHRRTVLNH 49
** ***:*****:***:***:***** :*****:***:

Pepper ringspot virus      VAGSLTEHKLGAFKVEDVGRIKSYAFLRIVAIQLVVSSHLPDTPGHLQV 100
Tobacco rattle virus      VGGKSEHKLDVFDQRDYKMIKSYAFLKIVGVQLVVTSHLPADTPGFIQI 99
*.* :****.*. * *****:***:****:**** ***:**

Pepper ringspot virus      DILDTRLTDGRKKNKVLQRFMKACDNTSLIQYKFDYCVSTSENADLWH 150
Tobacco rattle virus      DLLDSRLTEKRKKGKTIQRFKARACDNCNSVAQYKVEYSISTQENVLDVWK 149
**:*:***: ***.*:*** *:*** *: ***:**:*: ***:

Pepper ringspot virus      IGTVATGVPVVDGCFPPFVEMSLIIVATDSTTRLNPEELNSTDYLEGDFS 200
Tobacco rattle virus      VGCISEGVPVCDGTYPFSIEVSLIIVATDSTRLNVEELNSSDYIEGDFT 199
:* : : **** * :***:***** ** ***:**:*:***:

Pepper ringspot virus      DQSQFEYMSLNQVKAKAIDVKFKGEYVPKLRQDRNLASLEKIPQSIVKA 250
Tobacco rattle virus      DQEVFGEFMSLKQVEMKTIKAKYDGPYRPATTKPKSLLSSED----VKG 244
**.* **:*:***:***: ***:**:* * * : : * * * **

Pepper ringspot virus      ASIKKK-- 256
Tobacco rattle virus      ASKKNSS 252
** ***:

```

Figura 4 - Alinhamento das sequências peptídicas de p29 de PepRSV e de TRV. O peptídeo sinal para a mitocôndria está sublinhado em vermelho.

Uma hipótese a ser considerada é que a capa proteica (CP) esteja envolvida na interação com as mitocôndrias, uma vez que as partículas virais encontram-se associadas à superfície destas. A proteína p29 de PepRSV (referência no NCBI: NC003669), análoga à proteína de movimento célula-célula de TRV (referência no NCBI: ACX54060.1), também está presente na superfície das mitocôndrias, porém esta proteína pode estar associada a mitocôndria devido a um peptídeo sinal para esta organela, identificado por análises *in silico*. Assim sendo, é bem provável que ocorra uma associação da CP com p29, possibilitando a interação desta com a membrana externa da mitocôndria, uma vez que CP não possui sinalização para a mitocôndria. Também é possível que essa co-localização de CP e p29 nas mitocôndrias só ocorra se ambas estiverem presentes na mesma célula. Por isso as proteínas p29 e CP foram selecionadas como as primeiras a serem avaliadas para o estudo dos genes virais relacionados com a interação partícula viral-mitocôndria, sendo provável que a proteína p29 apresente co-localização com as mitocôndrias.

Dentro dos tobnavírus, a proteína p29 de TRV foi demonstrada como sendo análoga à proteína de movimento 30K de TMV (Mushegian e Koonin,

1993). Além disso, experimentos de micro injeção com MP-TMV (Wolf *et al.*, 1989) e p29-TRV (Derrick *et al.*, 1992) mostraram que ambas as MPs possuem a capacidade de aumentar o tamanho do limite de exclusão do plasmodesma. Como as proteínas de p29 de PepRSV e TRV possuem certa similaridade, é bem possível que a proteína p29 de PepRSV também exerça função de proteína de movimento viral, possivelmente se localizando no plasmodesma.

Dessa forma, este capítulo tem por objetivo observar a (co) localização entre mitocôndria, p29 e CP de PepRSV utilizando microscópio confocal, para estudos da interação de PepRSV em células de *N. benthamiana*, buscando por evidências que expliquem a associação das partículas virais de PepRSV com as mitocôndrias. Além disso, pretende-se confirmar a co-localização de p29 de PepRSV com a 30K de TMV no plasmodesma, por microscopia confocal, em células de *N. benthamiana*, visando demonstrar que a p29 é funcionalmente análoga à 30K, sendo, portanto, a MP do vírus.

2 - Materiais e métodos

A associação das partículas virais de PepRSV com mitocôndrias é uma característica marcante desse vírus. No entanto, o motivo ou o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não estão esclarecidos. Para tentar elucidar algum desses acontecimentos, as proteínas virais que se apresentam na superfície das mitocôndrias, p29 e CP, foram clonadas em vetor binário com proteínas fluorescentes fusionadas para visualização em microscópio confocal.

2.1 – RT- PCR e clonagem em pENTR 2B

O isolado de PepRSV (CAM) de Campinas, São Paulo (Kitajima *et al.*, 1969), foi mantido em casa-de-vegetação a partir de inoculações mecânicas em plantas de *Nicotiana benthamiana* e estocado em freezer a -80 °C. A transcrição reversa foi efetuada partindo-se de RNAs totais extraídos de plantas infectadas utilizando “Plant RNA Reagent” (Invitrogen), conforme instruções do fabricante e um *primer* reverso (p29 Rev ou CP Rev) (Tabela 1). A enzima “Superscript III” (Invitrogen) foi utilizada nesta reação de transcrição reversa (RT) para a síntese do DNA complementar (cDNA), de acordo com o protocolo do fabricante, com ajuste da temperatura da reação para 52°C.

Para a PCR, foi utilizada a polimerase termoestável de alta fidelidade “Vent DNA Polymerase” (New England Biolabs - NEB). O tamanho esperado dos produtos de PCR utilizando os *primers* da Tabela 1 é de 768 pb (p29) e de 672 pb (CP) (Figura 5). Para as amplificações de p29 e CP, foram utilizados 2,5 µL de Tampão ThermoPol 10X (NEB), 0,5 µL de MgSO₄ (50 mM), 2,5 µL de dNTP (2,5 mM)(Thermo Scientific), 1 µL de cDNA, 1 µL do *primer* senso e 1 µL do *primer* antisenso (Tabela 1), na concentração 0,4 µM e 0,1 µL de “Vent DNA Polymerase” (2,0 U/µL), ajustando-se o volume final para 25 µL. Esta reação foi submetida à pré-desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento a 53 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 10 min.

A amplificação de pENTR 2B (2700 pb) tem o objetivo de sincronizar o quadro aberto de leitura após a subclonagem por “LR Clonase” (Invitrogen) em pK7FWG2,0 ou pK7YWG2,0. Para a amplificação de pENTR 2B, foi utilizado 2,5 µL de Tampão ThermoPol 10X (NEB), 0,5 µL de MgSO₄ (50 mM), 2,5 µL de dNTP (2,5 mM)(Thermo Scientific), 1 µL de vetor diluído na proporção 1:10, 1 µL do *primer* senso e 1 µL do *primer* antisenso (Tabela 1), na concentração 0,4 µM e 0,1 µL de “Vent DNA Polymerase” (2,0 U/µL), ajustando-se o volume final para 25 µL. Esta reação foi submetida à pré-desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento a 53 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 3 min, e extensão final a 72 °C por 10 min.

Tabela 1 - *Primers* utilizados nas reações de PCR para a amplificação de p29, CP e pENTR 2B. Os nucleotídeos em negrito correspondem às sequências das extremidades do genoma viral.

Nome do primer	Sequência (5' → 3')
p29 For	AACA ATGGAGAACGATAAGTCGTTAGT
p29 Rev	TTTTTCTTTATGCTTGCCGCT
CP For	AACA ATGGCAATGTACGACGACGAAT
CP Rev	ACTTCCAGAAGTTGGAGGAGC
pENTR For	GACCCAGCTTTCTGTACAAA
pENTR Rev	AGCCTGCTTTTTTGTACAAAAGT

Em seguida, as reações foram purificadas por meio de eluição a partir de gel de agarose 0,8% corado com violeta cristal (40 µg/mL), utilizando-se o kit “Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). Após a eluição, apenas os insertos (CP e p29) foram fosforilados utilizando-se 0,5 µL da enzima “T4 Polynucleotide Kinase PNK” (NEB), sendo posteriormente ligados ao vetor pENTR 2B (Figura 5), previamente preparado por PCR e eluído a partir de gel de agarose. *Escherichia coli*, cepa DH5α foram transformadas com estas construções. O sequenciamento dos possíveis clones de pENTR 2B contendo os insertos foi realizado pela Macrogen (Coréia do Sul).

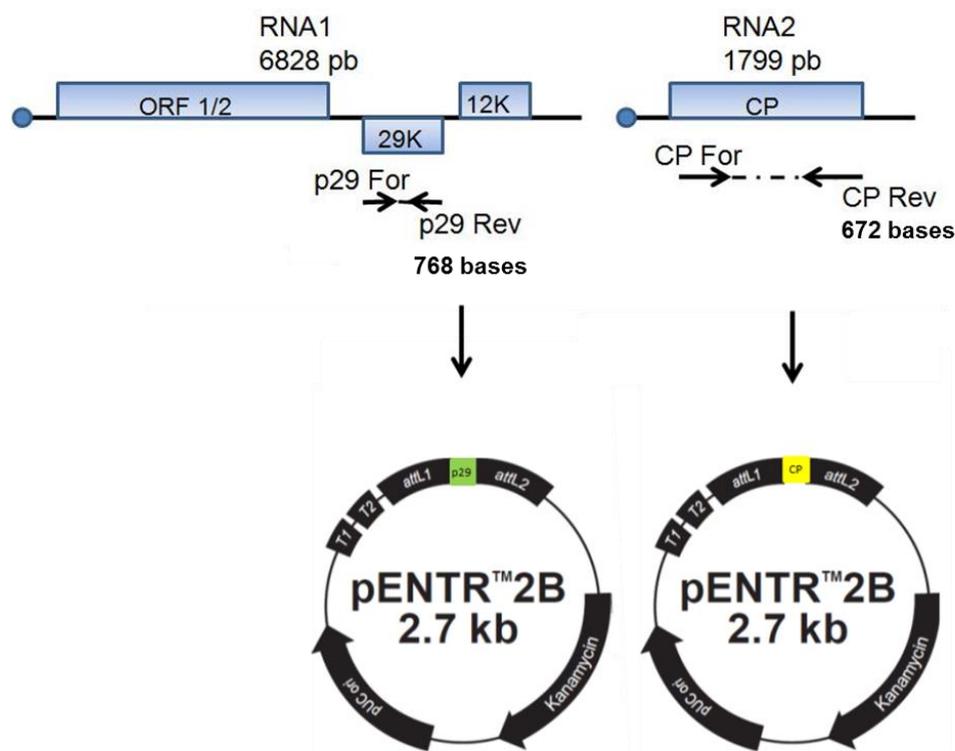


Figura 5 - Mapa genômico de PepRSV e as regiões genômicas amplificadas por RT-PCR e clonadas em pENTR 2B, na região adjacente ao gene *ccdB*. O tamanho dos genes não está em escala.

Os resultados de sequenciamento foram organizados utilizando os programas do Staden Package (Staden *et al.*, 1996) e a identidade dos genes foi confirmada pela comparação com sequências disponíveis em bancos de dados pelo Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

2.2 - Clonagem em vetor binário pK7F(ou Y)WG2,0

A clonagem em vetor binário foi realizada utilizando o sistema Gateway® (Invitrogen). Este sistema baseia-se na clonagem por meio de reação sítio-específica. O fragmento de DNA de interesse é clonado primeiro em um plasmídeo denominado doador (neste trabalho, o pENTR 2B). Subsequentemente, o fragmento de DNA flanqueado por dois sítios de recombinação sítio-específica (*attL1* e *attL2*) no plasmídeo doador é precisamente transferido para o vetor de expressão por reação de recombinação sítio-específica. O vetor de expressão possui sítios correspondentes (*attR1* e *attR2*) para que ocorra a recombinação (Figura 6).

Uma grande vantagem desse sistema é que, uma vez que o fragmento de DNA foi clonado no plasmídeo doador, a transferência deste para o vetor de expressão não requer o uso das tradicionais enzimas de restrição e ligação para clonagem, mas uma única solução de mistura de enzimas (LR Clonase II), que catalisa todo processo de transferência.

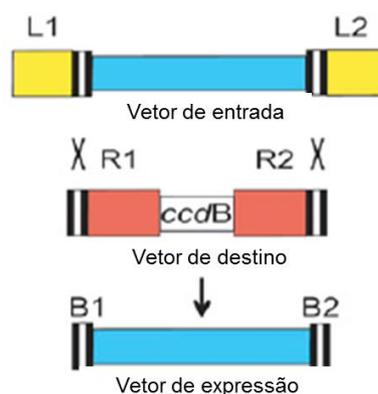


Figura 6 - Representação esquemática dos locais *att* e da reação de recombinação Gateway. Em uma reação LR *Clonase*, os sítios *attL* do vetor de entrada (pENTR 2B) recombinam com os sítios *attR* correspondentes do vetor de destino (pK7F(Y)WG2,0) para se obter *attB* em um novo vetor de expressão (Adaptado de Karimi *et al.*, 2007).

Após a confirmação da clonagem em pENTR 2B, os clones contendo p29 e CP foram recombinados, utilizando-se a enzima “LR Clonase II”, nos vetores binários pK7FWG2,0 e pK7YWG2,0 (Figura 7-A), gerando as construções p29-GFP e CP-YFP (Figura 7- B e C, respectivamente).

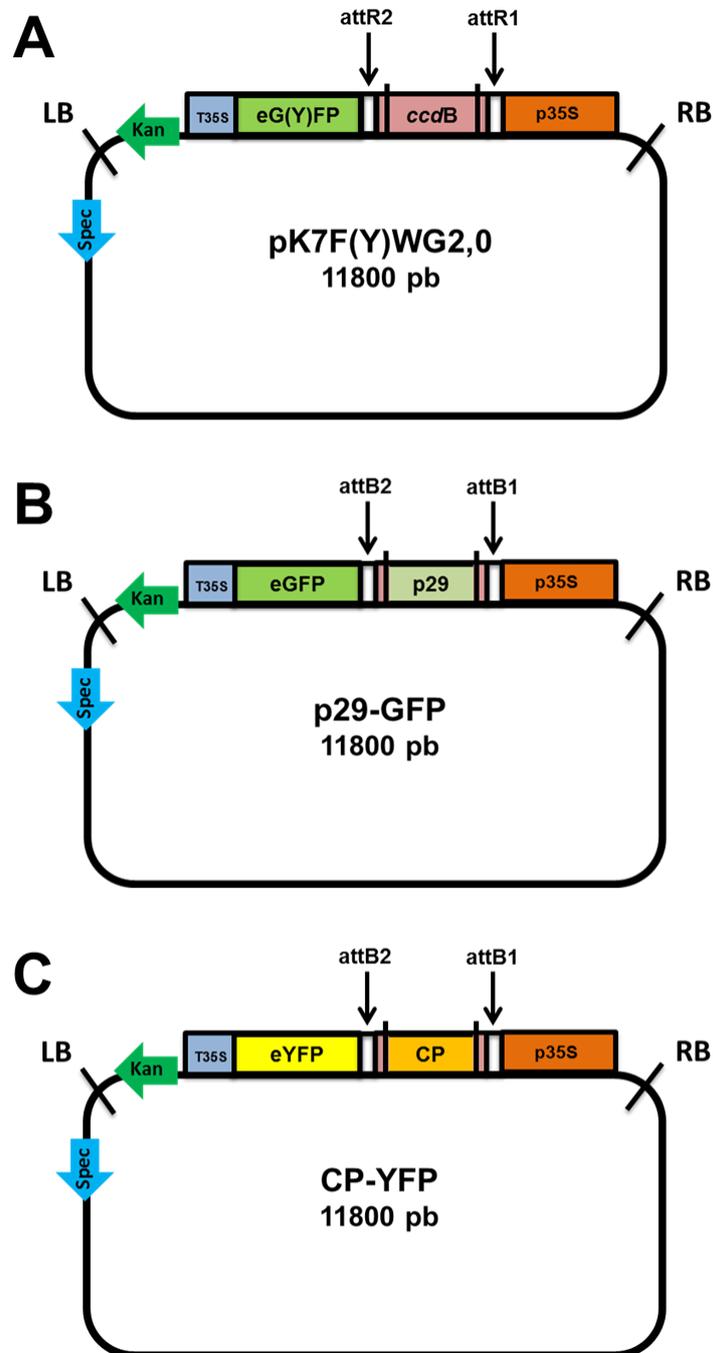


Figura 7 - Representação esquemática do mapa genético do pK7F(Y)WG2,0 (A), com a proteína p29 fusionada à região N-terminal da proteína fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) (B), e com a proteína CP fusionada à região N-terminal de proteína fluorescente YFP (*yellow fluorescent protein*) (C). p35S = promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), ccdB = proteína cito-tóxica ccdB, eG(Y)FP = enhanced GFP ou YFP. T35S = Terminador 35S do CaMV. attR1 e attR2 = regiões de recombinação com LR clonase. Kan= resistência a canamicina (com promotor eucariótico), Spec= resistência a espectinomicina (com promotor procariótico).

2.3 – Obtenção do controle pK7FWG2Δ*ccdB*

Como controle de expressão de GFP, foi utilizado o vetor pK7FWG2,0 de onde foi retirado, por PCR, o gene *ccdB*, permitindo assim o crescimento deste em *E. coli* cepa DH5α, uma vez que este gene produz uma toxina que inibe a divisão celular por meio do bloqueio da DNA girase, uma importante enzima na replicação do DNA, sendo letal para todas as bactérias que não possuem o gene *ccdA*, que forma um complexo com esta toxina, impedindo sua atuação.

Para a obtenção deste controle (vetor pK7FWG2,0 sem fusão expressando GFP), foram utilizados os *primers* senso pK7FW-*ccdB* 5´ - CTGCAGGTCGACTAGAATAGTAAA - 3´ e antisenso pK7FW-*ccdB* 5´ - AACAAATGGTGAGCAAGGGCGAG - 3´. Nesta reação, foram utilizados 5 µL de Tampão LongAmp 5X (NEB), 3 µL de dNTP (2,5 mM)(Thermo Scientific), 1 µL de vetor pK7FWG2,0 diluído na proporção 1:10, 1 µL do *primer* senso e 1 µL do *primer* antisenso, na concentração final de 0,4 µM e 1 µL de “LongAmp DNA Polymerase” (2,5 U/µL) (NEB), ajustando-se o volume final para 25 µL. Esta reação foi submetida à pré-desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento a 60 °C por 30 s, extensão a 65 °C por 11 min, e extensão final a 65 °C por 15 min.

Assim, após a PCR, o fragmento resultante foi fosforilado utilizando-se 0,5 µL da enzima “T4 Polynucleotide Kinase PNK” (NEB). A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos e depois a 65°C por 10 minutos, para inativar a quinase. Foi então realizada a ligação, utilizando a enzima “T4 DNA Ligase” (NEB) e *E. coli*, cepa DH5α, foram transformadas com esta ligação, dando origem ao vetor pK7FWG2Δ*ccdB*.

2.4 – Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* e inoculação em *Nicotiana benthamiana* por ATTE (*A. tumefaciens* transient expression)

Após a confirmação destas clonagens por PCR e por sequenciamento, os plasmídeos recombinantes foram purificados e *Agrobacterium tumefaciens*, cepa GV3101 foram transformadas por eletroporação. Os clones desejados foram selecionados utilizando espectinomicina (50 µg/mL) e rifampicina (50 µg/mL). A transformação da agrobactéria com a construção foi confirmada por

PCR de colônia utilizando os *primers forward* e *reverse* dos insertos, com exceção do controle, onde foram utilizados *primers* específicos para GFP.

Após a confirmação, as agrobactérias transformantes foram crescidas *overnight* em 3 mL de meio de cultura líquida. Para a indução, estes inóculos foram centrifugados a 4000 x g por 10 min e ressuspensos em 2 mL de tampão contendo 10 mM de MgCl₂, 1 mM de MES suplementado com 200 µM de acetoseringona (Bucher *et al.*, 2003). As agrobactérias transformantes foram agroinoculadas na parte abaxial de folhas jovens de *N. benthamiana* (4 semanas) por infiltração utilizando seringa sem agulha. Diferentes concentrações bacterianas foram testadas (0.5, 1.0 e 2.0), sendo que o melhor resultado de expressão foi obtido quando utilizada a concentração bacteriana de 1.0 em OD₆₀₀. Para cada construção (p29-GFP, CP-YFP, co-inoculação e pK7FWG2Δ*ccdB*) foram utilizadas 6 plantas de *N. benthamiana*, sendo que apenas as duas folhas mais jovens foram agroinfiltradas. Este ensaio foi reproduzido cinco vezes, sempre utilizando 6 plantas em cada reprodução.

A expressão das proteínas fluorescentes em microscópio confocal foi monitorada a cada 24 h, seguindo-se até 96 h, quando esta diminuiu consideravelmente, impossibilitando sua visualização. O pico de expressão então identificado foi 48 horas pós-inoculação.

2.5 - Agroinoculação das proteínas p29 de PepRSV e 30K de TMV

Para este experimento, o gene da proteína de movimento 30 K de TMV foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pCBNoAx_MPTMV-GFP (Prokhnovsky *et al.*, 2005), e fusionada à região N-terminal do gene de CFP (*cyan fluorescent protein*) (Clontech), previamente inserido entre o promotor 35S e o terminador NOS do vetor pMDC32 (Avisar *et al.*, 2008). Também foi utilizada a construção p29-GFP previamente descrita. A co-infiltração foi realizada utilizando-se misturas de quantidades iguais de agrobactérias obtidas a partir de culturas crescidas com cada uma das construções. A indução e a agroinoculação foram realizadas conforme descrito no item 2.4.

2.6 - Marcação da mitocôndria com Mitotracker Red CMXRos

MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes) é um corante vermelho-fluorescente que cora mitocôndrias em células vivas, sendo sua acumulação dependente do potencial de membrana. O MitoTracker se acumula nas mitocôndrias ativas e permanece nelas, mesmo que seja necessário tratar as células com aldeído ou outros fixadores, ao contrário de outros corante usuais (como a Rodamina 123), que são facilmente lavados da célula assim que as mitocôndrias perdem seu potencial de membrana.

Para visualizar as mitocôndrias, procedeu-se à infiltração do MitoTracker (concentração final 100 nM), utilizando uma seringa sem a agulha, na parte abaxial de folhas de *N. benthamiana*.

2.7 - Análise da expressão das construções por microscopia confocal

Pedaços das folhas inoculadas (dois pedaços de cada folha agroinoculada) foram visualizados utilizando microscópio confocal a laser Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems), com a lente objetiva 40X de imersão em óleo. As amostras foram colocadas sobre a lâmina com a parte abaxial para cima, uma vez que este confocal é de campo invertido, onde adicionou-se aproximadamente 20 µL de água destilada e colocou-se a lamínula sobre a amostra, que foi fixada com esmalte. Os lasers Diodo, Argônio e HeNe 633 foram usados para visualização. Para capturar as imagens, foram utilizadas as seguintes excitações e emissões dos lasers, respectivamente: GFP (488 nm e 525 nm); YFP (514 nm e 594 nm); CFP (420 nm e 480 nm); MitoTracker (579 e 599 nm). Para os cloroplastos, que autofluorescem em vermelho, foi utilizada a excitação a 630 nm e a luz emitida foi capturada a 670 nm.

3 – Resultados e discussão

3.1 – Confirmação da amplificação dos genes e clonagem em pENTR

Inicialmente, foram feitas PCRs para amplificar os genes da CP e p29 de PepRSV e do vetor pENTR 2B. A avaliação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) confirmou a amplificação dos fragmentos de DNA de tamanho esperado, aproximadamente 650 pb para CP, 750 pb para p29 e 2.700 pb para o vetor pENTR 2B (Figura 8-A).

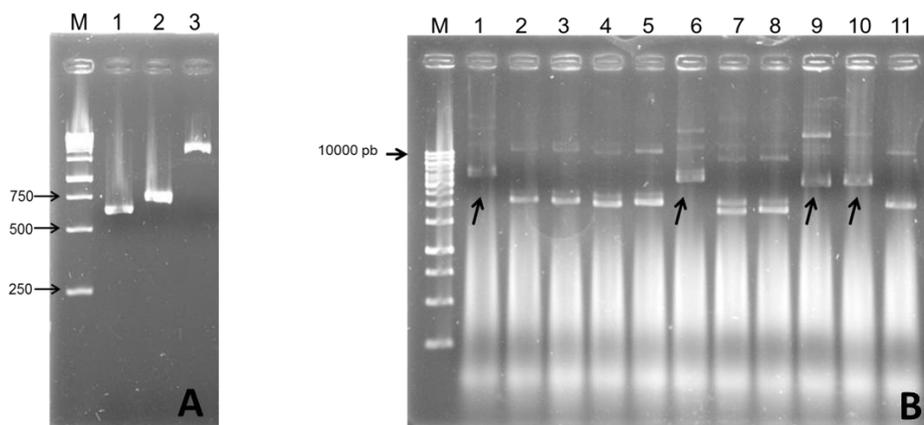


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando em (A)- produtos da amplificação por PCR de CP e p29 de PepRSV e do vetor pENTR 2B. 1- Produto da PCR da capa utilizando os *primers* CP For e CP Rev; 2- Produto da PCR da proteína de movimento p29 utilizando os *primers* p29 For e p29 Rev. 3- Produto da PCR do vetor pENTR 2B utilizando os *primers* pENTR For e pENTR Rev. Em (B)- Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o resultado da extração de DNA plasmidial do vetor pENTR 2B ligado aos produtos de PCR de p29 e CP. M - Marcador de tamanho molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas). Poços 1 a 6- vetor pENTR 2B ligado a p29. Poços 7 a 11- vetor pENTR 2B ligado a CP. As setas indicam as amostras selecionadas para confirmação da clonagem por PCR.

Após a PCR, os fragmentos de DNA amplificados foram eluídos a partir do gel de agarose, ligados ao vetor pENTR 2B e bactérias *E. coli*, cepa DH5 α foram transformadas por eletroporação. Seis colônias de *E. coli* carregando a construção p29+pENTR e cinco com CP+pENTR foram selecionadas para a extração de DNA plasmidial, que foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 8-B). As setas mostram os clones que foram selecionados para confirmação por PCR e, posteriormente, por sequenciamento.

Para a PCR, foram utilizados os *primers* senso de pENTR 2B, que anela em *attL1* (99 pb), em combinação com o *primer* antisenso de cada inserto. Assim, pode-se confirmar tanto a presença do inserto no vetor, quanto sua orientação. Dessa forma, obteve-se os fragmentos de tamanho esperado, sendo 867 pb para p29 e 768 pb para CP (Figura 9), devido à adição da região *attL1* de pENTR 2B. Após a confirmação por PCR, esses possíveis clones foram também confirmados por sequenciamento.

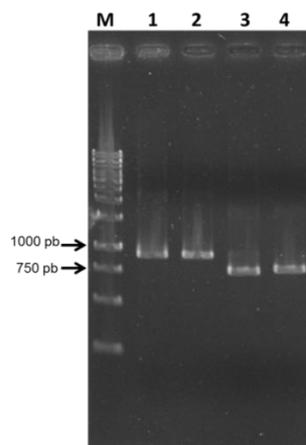


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando em M - Marcador de tamanho molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Poços 1 e 2- produtos da PCR utilizando os *primers* pENTR for e p29 rev, obtendo-se a banda esperada de aproximadamente 860 pb. Poços 3 e 4- produtos da PCR utilizando os *primers* pENTR for e CP rev, obtendo-se a banda de tamanho esperado (760 pb).

3.2 – Confirmação da clonagem em vetor binário pK7F(ou Y)WG2,0

Os clones de p29+pENTR e CP+pENTR, confirmados por PCR e, posteriormente, por sequenciamento (dados não mostrados), foram clonados nos vetores binários pK7FWG2 e pK7YWG2, respectivamente, utilizando o sistema Gateway® (Invitrogen) previamente descrito. *E. coli*, cepa DH5α foram transformadas com estas construções. Várias colônias de cada construção (pK7F+p29 e pK7Y+CP) foram obtidas, das quais foram feitas as extrações de DNA plasmidial (Figura 10, A e B, respectivamente).

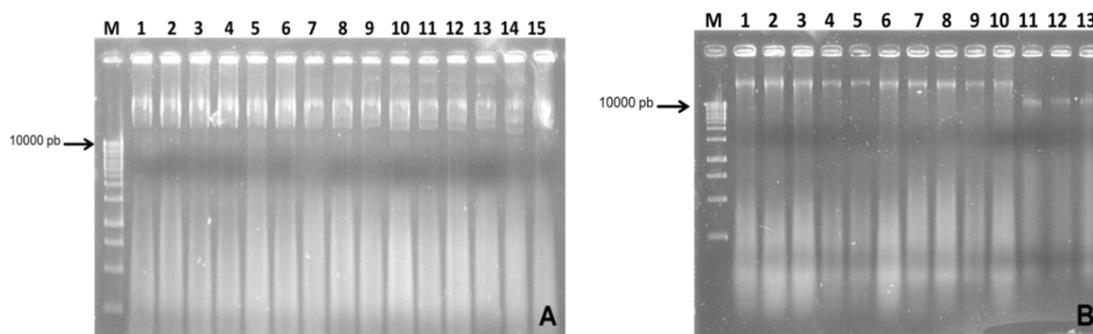


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1 % mostrando o resultado da extração de DNA plasmidial de pK7F+p29 (A, poços 1 a 15) e pK7Y+CP (B, poços 1 a 13). M - Marcador de tamanho molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

Estes clones foram primeiramente confirmados por PCR, utilizando os *primers* senso e antisenso dos insertos, obtendo-se o resultado esperado para p29 (760 pb) e para CP (660 pb), mostrado na Figura 11, A e B, respectivamente. Cinco destes clones foram confirmados por sequenciamento

também. Dois clones positivos de cada construção foram então transfectados em *Agrobacterium tumefaciens*, cepa GV3101.

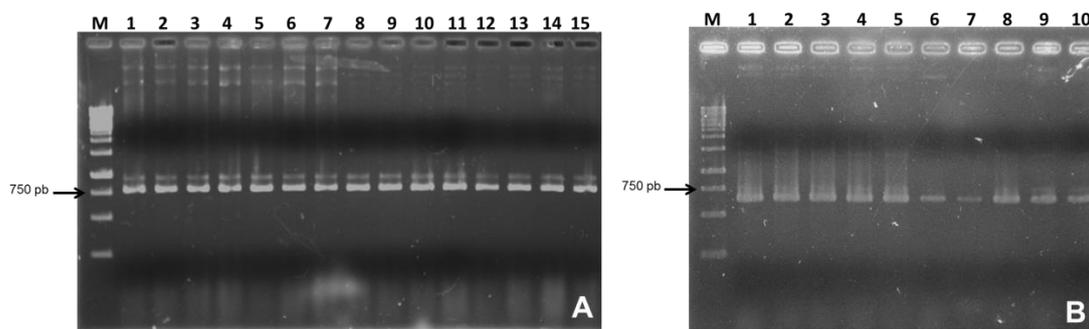


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando em M - Marcador de tamanho molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas); (A), poços 1 a 15 - confirmação por PCR das clonagens de p29 no vetor pK7FWG2,0 e (B), poços 1 a 10- confirmação por PCR das clonagens CP em pK7YWG2,0. Para ambas as reações foram utilizados os *primers forward* e *reverse* específico de cada gene.

3.3 - Visualização da expressão das proteínas fusionadas p29-GFP e CP-YFP em *Nicotiana benthamiana* por microscopia confocal.

Para confirmar que as construções estavam presentes na agrobactéria, foi feita a extração de DNA plasmidial de várias colônias de *A. tumefaciens* transformadas com as construções pK7F+p29 e pK7Y+CP, e deste material foi feita PCR utilizando os *primers forward* e *reverse* dos insertos. O resultado da PCR foi a obtenção dos fragmentos de DNA do tamanho esperado (Figura 12), conforme citado anteriormente. Porém, para verificar se proteínas fusionadas seriam expressas, procedeu-se à agroinfiltração em folhas de *N. benthamiana* para visualização da localização em microscópio confocal.

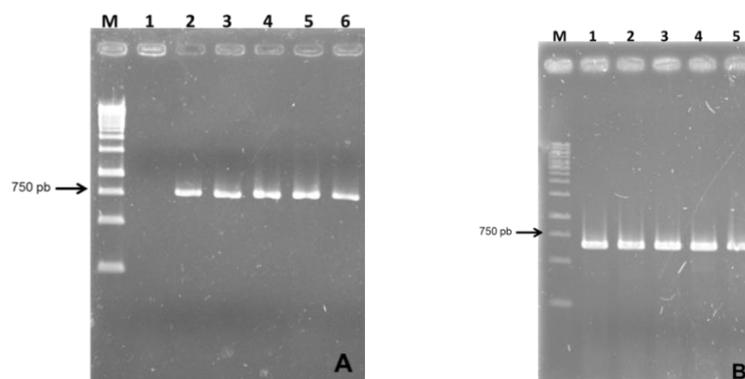


Figura 12- Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os produtos de PCR que confirmam a obtenção dos clones em *Agrobacterium tumefaciens*, cepa GV3101. (A) pK7F+p29 e (B) pK7Y+CP, sendo os tamanhos esperados das amplificações de aproximadamente 760 pb e 660 pb, respectivamente. M - Marcador de tamanho molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

O pico de expressão das proteínas fusionadas foi detectado em microscópio confocal 48 horas pós-infiltração (Figura 13). Como controle, foi utilizado a expressão da proteína GFP do vetor binário modificado pK7FWG2 Δ ccdB (Figura 13-A), conforme descrito no item 2.3. Quando não estão fusionadas, as proteínas fluorescentes mostram localização dispersa no citoplasma e também no núcleo devido ao seu pequeno tamanho (Tanz *et al.*, 2013). As imagens dos cloroplastos foram captadas para mostrar sua disposição no citoplasma (Figura 13, B-II, C-II e D-III). As imagens do campo claro (Figura 13, painéis B-III e C-III) foram adquiridas para auxiliar na identificação da localização das fluorescências na célula.

Na figura 13-B, pode-se visualizar a expressão de p29-GFP, que se mostrou como pontos fluorescentes próximos à parede celular (painéis I e IV). A célula vegetal possui vacúolo muito grande, e empurra o citosol para a periferia da célula. Isso foi visualizado pela posição dos cloroplastos nas células observadas, que se encontram próximos à parede celular. No entanto, a localização da p29-GFP mostrou-se mais próxima da parede celular do que cloroplastos, possivelmente no PD. Esta mesma localização foi visualizada nas folhas agroinoculadas em todas as repetições do experimento. Esta localização é similar à de outras proteínas de movimento (Oparka *et al.*, 1996; McGavin *et al.*, 2012; Padgett *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2013). Como p29 não possui domínio transmembrânico (dados não mostrados), é provável que p29 não ancore na membrana plasmática. Além disso, a fluorescência de p29-GFP é diferente daquela do controle, que se mostra difusa no citoplasma e núcleo (Figura 13-A, I e II), típica da expressão de GFP (Tanz *et al.*, 2013).

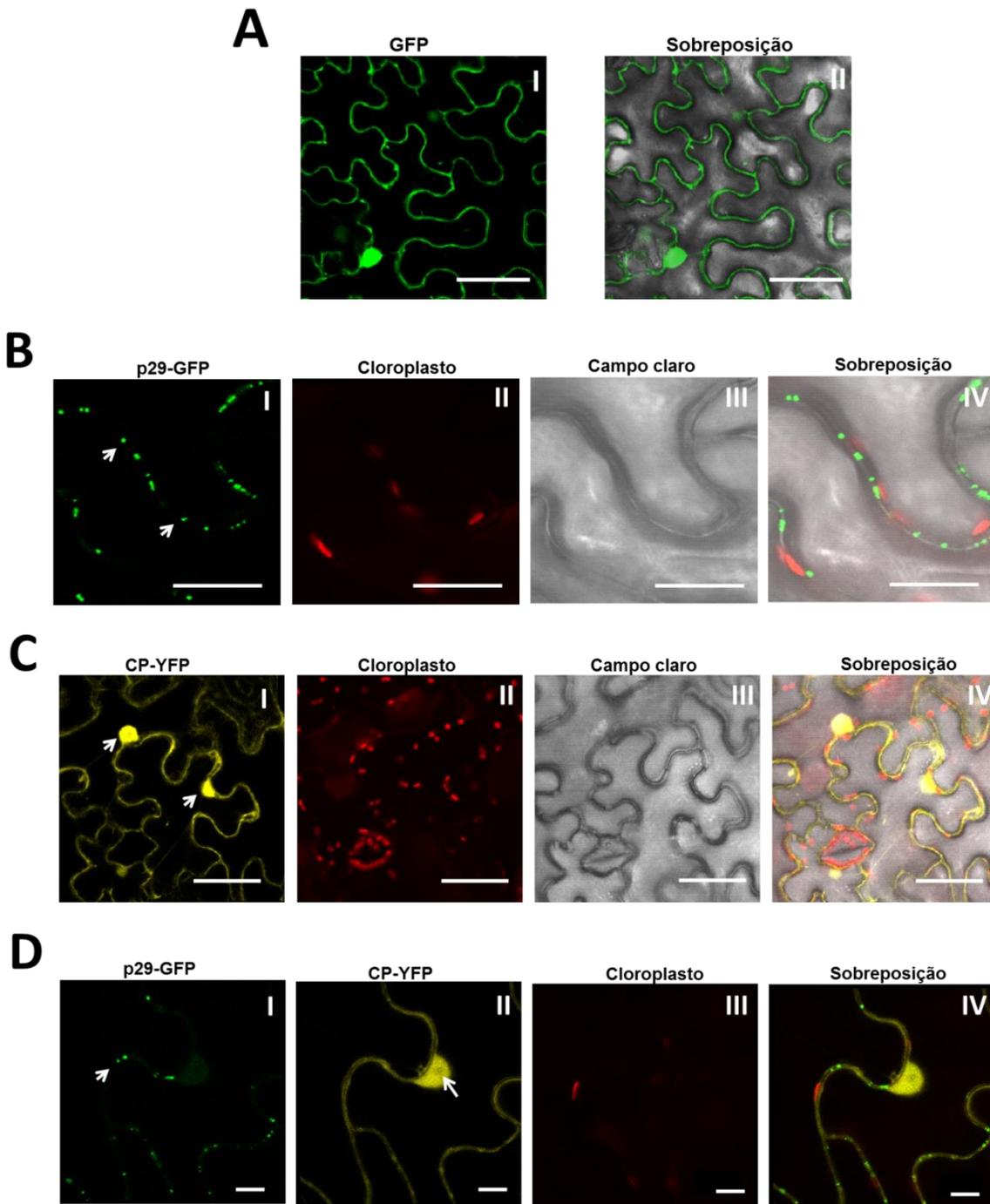


Figura 13 - Análise da expressão de p29-GFP e CP-YFP por microscopia confocal a laser em folhas de *N. benthamiana* 48 horas pós-agroinfiltração. A- controle positivo expressando GFP (barra=50 μ M). B- Expressão da construção pK7FWG2,0 fusionado à proteína p29, mostrando-se como pontos na membrana (setas) Barras=25 μ M. C- Expressão da construção pK7YWG2,0 fusionado à capa protéica, mostrando fluorescência de YFP no núcleo (setas) Barras=50 μ M. D- Co-inoculação de ambas construções (Barras=10 μ M), mostrando que não há mudança na localização da fluorescência.

Em CP-YFP (Figura 13, painéis C-I e C-IV), a fluorescência parece estar localizada no núcleo e citosol. Esta mesma localização foi visualizada nas folhas agroinoculadas em todas as repetições do experimento. Análises de localização subcelular feitas *in silico*, utilizando os programas, BaCellLo (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/pred.htm>), MultiLoc (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/>) e pTARGET (<http://golgi.unmc.edu/ptarget/>), mostraram que CP de PepRSV possui sinalização para o núcleo. Mas há também a possibilidade da fluorescência no núcleo ser resultado da expressão de YFP apenas, uma vez que as imagens adquiridas de CP-YFP muito se assemelham às do controle (Figura 13-A, painéis I e II).

Para podermos constatar se p29 ou CP, estando presentes na mesma célula, são capazes de influenciar na localização uma da outra, estas construções foram co-inoculadas. O resultado esperado era que p29 ou CP, ou ambas, mudariam sua localização inicial e se co-localizassem no citoplasma, sugerindo um direcionamento para a mitocôndria. Para tanto, o corante fluorescente para mitocôndria MitoTracker Red (Invitrogen) foi infiltrado em folhas de *N. benthamiana*, previamente co-infiltradas com estas construções. Porém, as tentativas de visualização das mitocôndrias com este corante não foram bem sucedidas, pois houve excesso de fluorescência e muito *background*, inclusive dos cloroplastos, não sendo possível visualizar a organela especificamente.

Ainda assim, as fluorescências da co-inoculação de p29-GFP e CP-YFP foram capturadas, primeiro separadamente, com seus respectivos lasers (Figura 13 D, painéis I e II), para mostrar que cada construção inoculada está emitindo fluorescência e que estas não são provenientes de emissões cruzadas (*cross-talk*), devido à proximidade de excitação e emissão dos lasers, e depois juntas. Porém, não houve co-localização no citoplasma e nem redirecionamento das localizações (Figura 13 D, painel IV). Uma possível explicação é que a localização das proteínas possa ter sido alterada devido à fusão com proteínas fluorescentes.

Apesar de serem amplamente utilizadas em estudos de determinação subcelular, sabe-se que as proteínas fluorescentes (PF), quando fusionadas nas regiões terminais da proteína de interesse, podem interferir na expressão e

localização desta dentro da célula (Ghazala *et al.*, 2008). Conforme revisado por Tanz e colaboradores (2013), PF fusionadas na região N-terminal da proteína pode interferir nos sinais de localização com plastídeos e mitocôndrias, e há a possibilidade de abolir peptídeos sinais para retículo endoplasmático (ER). Uma estratégia que poderá ser utilizada para minimizar este efeito de fusão com proteínas fluorescentes é o uso de construções para agroinoculação das proteínas p29 e CP em vetores binários, porém sem fusão com proteínas fluorescentes, realizando imunomarcagem com anticorpos específicos em folhas de plantas inoculadas com as construções.

Outra estratégia é a imunomarcagem de plantas inoculadas mecanicamente com a partícula viral, uma vez que conseguimos produzir um anticorpo policlonal para a CP e o anticorpo contra a p29 foi gentilmente cedido pelo Dr. José Osmar Gaspar (UNESP- São José do Rio Preto). Além disso, foi obtido acesso a dois protocolos otimizados para a infiltração da resina específica para imunomarcagem LR-Gold (*Electron Microscopy Sciences - EMS*), pois o protocolo utilizado para processamento de material para visualização em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) não deram certo até agora.

Uma hipótese a ser considerada, ainda, é que a mitocôndria seria o local de replicação de PepRSV. Para vírus de RNA senso positivo, uma característica comum é a associação de seu complexo replicativo com rearranjos de membranas intracelulares do hospedeiro (Kopek *et al.*, 2007).

Até o momento, as organelas como lisossomos para os togavírus, cloroplastos para os tymovírus e potyvírus, os peroxissomos para os tombusvírus, o retículo endoplasmático para os potyvírus, tobamovírus, tombusvírus, comovírus, flavivírus e as mitocôndrias para os nodavírus foram identificadas como os locais de replicação desses vírus de RNA (Carette *et al.*, 2002; McCartney *et al.*, 2005; Ahlquist, 2006; Jonczyk *et al.*, 2007; Kopeck *et al.*, 2007; Wei & Wang, 2008; Welsch *et al.*, 2009; Ishibashi *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2010). Para os tobavírus, o local de replicação viral ainda não foi elucidado. Portanto, a associação de partículas virais do PepRSV com as mitocôndrias sugere ser esta a organela o local mais provável de replicação e montagem das partículas.

3.4 – Confirmação da co-localização de p29 de PepRSV com a proteína 30K de TMV no plasmodesma em *Nicotiana benthamiana* por microscopia confocal.

Os dados gerados com o experimento de localização subcelular sugerem que p29 de PepRSV está localizada na parede celular, um padrão de localização que as proteínas de movimento normalmente possuem devido ao seu direcionamento para o plasmodesma. A partir desse resultado, foi realizado um experimento para comparar a localização de p29 com a proteína 30K de TMV, que é uma proteína bem caracterizada como sendo de movimento e que se localiza no plasmodesma.

Na figura 14-A, é possível ver em detalhes a localização de p29 em ambos os lados da parede celular, apresentando-se como dois pontos fluorescentes de tamanho similar, típico de localização no PD. Sinais fluorescentes da expressão de cada construção foram capturados separadamente, com os respectivos canais (p29-GFP e MPTMV-CFP), e podem ser visualizadas sobrepostas com o campo claro (Fig. 14, B e C, respectivamente). Como esperado, a fluorescência de p29-GFP mostrou distribuição similar à de MPs virais no PD (Padgett *et al.* 1996; Oparka *et al.*, 1996).

A sobreposição das imagens de p29-GFP e MPTMV-CFP mostrou pontos amarelados (a fluorescência azul de CFP foi digitalmente alterada para cor vermelha para melhor visualização das imagens sobrepostas), confirmando a co-localização (Fig. 14-D, setas). No entanto, muitos pontos não co-localizaram, o que indica que estas proteínas possuem características comuns, mas que são diferentes em alguns aspectos. Por exemplo, sabe-se que a 30 K de TMV possui domínios transmembrânicos que interagem com a membrana do retículo endoplasmático (RE) para a formação do complexo de replicação viral (Fujiki *et al.*, 2006), enquanto que p29 de PepRSV, não possui domínio transmembrânico.

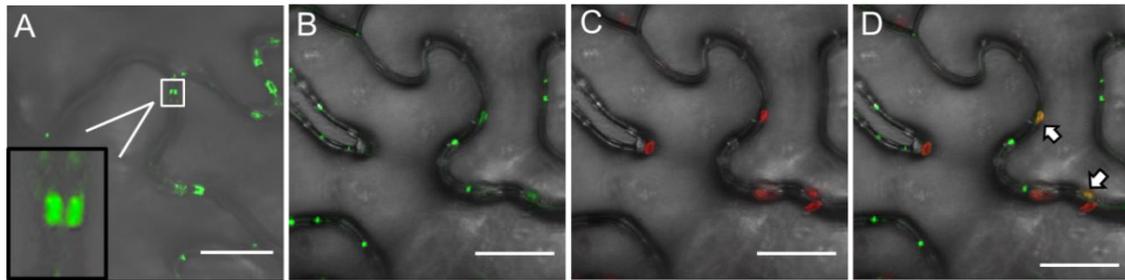


Figura 14 - Localização subcelular de p29-GFP e MPTMV-CFP em folhas de *N. benthamiana*. (A) Localização detalhada de p29-GFP na parede celular, mostrando dois pontos de tamanho similar, um de cada lado da parede, indicando possível localização no plasmodesma (Barra=10 μ M). As construções co-inoculadas foram visualizadas separadamente, somente com o filtro para GFP (B) e para CFP (C) (a cor foi mudada digitalmente para fluorescência vermelha). O painel (D) mostra a sobreposição dos painéis (B) e (C), onde pode ser visualizado pontos amarelos (setas) indicando a co-localização de p29-GFP e MPTMV-CFP (a cor foi alterada digitalmente para fluorescência vermelha) (Barras= 25 μ M para os painéis B, C e D).

Apesar das proteínas não terem sido visualizadas conforme esperado nos experimentos de co-localização, o resultado obtido da localização subcelular de p29 foi muito revelador, pois até então não existia um estudo experimental que mostrasse qualquer característica relacionada à provável função desta proteína. De acordo com os resultados apresentados, a acumulação de p29 no PD é uma característica típica de proteína de movimento viral. No entanto, a natureza da interação das partículas virais de PepRSV com mitocôndrias permanece sem resposta.

CAPÍTULO III – Construção de clone de cDNA infeccioso de PepRSV

1 - Introdução

O clone infeccioso de vírus de RNA é uma ferramenta muito importante para o estudo da interação vírus-hospedeiro. Além disso, a organização genômica dos tobavírus os tornam atrativos ao seu desenvolvimento como vetor viral, que são vírus modificados, a partir de um clone infeccioso, pela inserção de uma sequência heteróloga, resultando em um replicon capaz de se manter e replicar em uma célula hospedeira. Como o RNA 1 codifica todas as proteínas necessárias para a replicação e disseminação do vírus na planta, o RNA 2, que codifica a CP e algumas proteínas não estruturais, pode ser manipulado sem que se corra o risco de interromper o movimento viral, comprometendo o estabelecimento da infecção sistêmica (MacFarlane e Popovich, 2000). Além disso, não produzem sintomas muito severos, permitindo o uso como vetor de VIGS e a avaliação da expressão do gene exógeno (Ratcliff, 2001).

Vetores de expressão baseados no RNA 2 dos tobavírus já foram desenvolvidos (MacFarlane e Popovich, 2000). O RNA 2 de TRV e PEBV possuem, além do gene que codifica a CP (2a), outros dois genes não estruturais (2b e 2c), que estão associados a transmissão por nematoides (Ploeg *et al.*, 1993; MacFarlane *et al.*, 1995, 1996; Hernández *et al.*, 1997). No entanto, PepRSV (CAM) não possui estes genes, sendo possivelmente a região C-terminal da CP, que se estende para fora da superfície da partícula viral (Brierley *et al.*, 1993), que provavelmente pode garantir a transmissão por nematoides (Mayo *et al.*, 1994).

Dentre os tobavírus, o vetor viral de TRV, em particular, é um dos mais utilizados, pois tem uma ampla gama de hospedeiros, o que permite que ele seja utilizado em muitas espécies de plantas. Além disso, induz silenciamento gênico (VIGS) e a infecção é relativamente uniforme em tecidos ao longo da planta, inclusive em pontos de crescimento, o que significa que a infecção pode

se espalhar por divisão celular, bem como por transporte em longa distância (Ratcliff *et al.*, 2001).

Hamilton e Baulcombe (1989) desenvolveram um clone infeccioso do RNA 1 de TRV (isolado SYM) por transcrição *in vitro*, sob o comando do promotor P_m de *Escherichia coli*, seguindo a abordagem utilizada por Ahlquist e Janda (1984) para *Brome mosaic virus*. O transcrito de TRV mostrou-se infeccioso, no entanto, para a obtenção dos clones, o cDNA foi reconstruído pela realização de nove reações de sobreposição utilizando sítios de enzimas de restrição na região de sobreposição, uma vez que as tentativas de recuperar o cDNA do RNA 1 completo não foram bem sucedidas (Hamilton e Baulcombe 1989).

O primeiro clone agroinfectivo de TRV, desenvolvido por Ratcliff, em 2001, consiste em dois plasmídeos binários, pBINTRA6 e pTV00, contendo o cDNAs do RNA 1 e RNA 2 de TRV, respectivamente, sob o controle do promotor 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e do terminador *nopaline synthase* (TNos). Na construção de TRV-RNA 2, os genes não estruturais foram substituídos por um sítio múltiplo de clonagem (MCS), para a inserção de sequências de genes alvo para VIGS. No entanto, para a estabilidade do RNA 1, um íntron proveniente de *Arabidopsis thaliana* foi inserido na ORF da polimerase, provavelmente interrompendo a expressão de um gene tóxico para *E. coli* (Yamshchikov *et al.*, 2000).

Em 2002, Liu e colaboradores também clonaram os RNAs 1 e 2 de TRV em vetores binários (pYL44 e pCAMBIA0390, respectivamente), originando os VIGS pTRV1 e pTRV2. No entanto estes possuíam promotor 35S duplicado na extremidade 5' e a ribozima do satélite de *Subterranean clover mosaic virus* (SCMV) foi adicionada na extremidade 3'. Como os vetores binários utilizados foram estáveis em *E. coli*, não houve a necessidade da inserção de íntron no RNA 1.

Diversos trabalhos utilizaram os dois VIGS baseados em TRV (Lu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005; Senthil-Kumar *et al.*, 2007; Takabatake *et al.*, 2007; Dubreuil *et al.*, 2009), e a eficiência destes foi comparada em espécies de batata (Brigneti *et al.*, 2004), quanto à capacidade de indução do

silenciamento do gene fitoeno desaturase (PDS), que é essencial para a produção de carotenoides que protege as plantas de branqueamento. Segundo o estudo, há uma diferença qualitativa em relação à uniformidade do silenciamento de PDS, sendo que o vetor com promotor 35S duplicado e ribozima (pTRV 1 e pTRV2) foi capaz de induzir o silenciamento em áreas um pouco maiores. Quando foram feitas inoculações misturando o RNA 1 de um VIGS com o RNA 2 do outro, a combinação que continha o pTRV2 apresentou sintomas mais fortes, o que sugere um nível mais alto de expressão viral.

Entretanto, o TRV é um vírus quarentenário, ainda não relatado no Brasil, restringindo o seu manuseio neste País. Sendo o PepRSV um vírus exclusivamente brasileiro e por apresentar características adequadas ao desenvolvimento de um vetor viral, este trabalho visa o desenvolvimento de um cDNA infeccioso de PepRSV construído em vetor binário, possibilitando seu uso como vetor viral. Este clone infeccioso será uma ferramenta muito útil para elucidar a interação das partículas virais com a membrana mitocondrial, além de, futuramente, poder ser utilizado como um vetor de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) para estudo básico de funcionamento gênico e de interação planta-patógeno.

2 – Materiais e métodos

Uma vez que a amplificação do cDNA do RNA 1 completo de PepRSV não foi bem sucedida (dados de trabalhos anteriores), esta nova estratégia propõe a obtenção do clone infeccioso em duas etapas: primeiro, clonar RNA 2 em vetor binário; segundo, clonar o RNA 1 no *backbone* do vetor binário contendo o RNA 2, aproveitando o sítio da enzima de restrição *PacI* existente na região 3'. Para isso, o RNA 1 será preparado por RT-PCR, e o genoma dividido em dois fragmentos, com um região de sobreposição no meio. Estes fragmentos de cDNA genômico serão clonados em vetor TA para sequenciamento. Após juntar estes dois fragmentos (por PCR de fusão ou ligação sítio-específica), este será subclonado no *backbone* (já existente) de TRV contendo o RNA 2 de PepRSV e a ribozima de *Subterranean clover mottle virus satellite* (SCMV). O resultado final será a obtenção de um clone infeccioso do RNA de PepRSV.

2.1 - Isolado viral e extração de RNA viral

O isolado de PepRSV de Campinas (CAM), São Paulo, foi isolado de plantas de *Capsicum chinense* (Kitajima *et al.*, 1969), inoculado mecanicamente em plantas de *Nicotiana benthamiana* e estocado no freezer - 80 °C. Para recuperar o isolado viral, as plantas de *N. benthamiana* inoculadas foram mantidas em casa de vegetação da Universidade de Brasília (UnB).

Partículas virais de PepRSV foram semi-purificadas a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas com o isolado PepRSV (CAM), conforme método já descrito (Dusi & Carvalho, 1988). Após duas semanas de inoculação, as folhas infectadas por PepRSV foram coletadas e um total de 40 g foram trituradas no liquidificador contendo 200 mL de tampão fosfato de potássio gelado (50 mM, pH 7,2). A solução foi coada com 4 camadas de gaze e centrifugada a 5000 x g por 30 min. O sobrenadante foi colhido e aplicado em colchão de sacarose 20%, que foi centrifugado a 30000 x g por 1 hora. O *pellet* foi ressuspenso em 2 mL de tampão fosfato. A extração de RNA foi realizada utilizando-se o kit comercial “Trizol LS Reagent” (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

2.2 – RT-PCR do RNA 2 de PepRSV e clonagem em pGEM –T Easy

A reação de transcrição reversa (RT) para a síntese do cDNA foi realizada utilizando o *primer* antisenso HDV Half+PepRSV-R1-3’Rev-2 (Tabela 3), na concentração final de 2,5 µM, e a enzima “Superscript III” (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante, com ajuste da temperatura da reação para 52°C. Em seguida, essa reação foi submetida à incubação a 70°C por 15 minutos, para a inativação da ação enzimática. O cDNA foi então tratado com 1 µL de RNase H (20 U/µL) (Invitrogen), e incubado a 37°C por 20 minutos, para fragmentar as moléculas de RNA ligadas ao cDNA.

Para a PCR foram utilizados os *primers* senso 35S + PepRSV RNA-2 5’Cloning For (Tabela 3) e o antisenso foi o mesmo utilizado na RT, e a enzima “LongAmp Taq DNA Polymerase” (New England Biolabs). Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados por meio de eluição a partir de gel de agarose 0,8% corado com violeta cristal (40 µg/mL), utilizando-se o kit “Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). Estes fragmentos purificados foram

então clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega). Possíveis clones foram analisados por padrão de restrição com a enzima EcoRI e selecionados para confirmação por sequenciamento.

2.3 – Clonagem do RNA 2 de PepRSV em vetor binário

A inserção do fragmento do RNA2 no vetor pCAMBIA modificado foi realizada por *overlap-extension PCR*. O plasmídeo pTRV2-MCS, o qual o *backbone* (pCAMBIA 0390) foi utilizado para a clonagem de PepRSV, é um vetor viral comercial e foi adquirido pelo site <http://www.arabidopsis.org/abrc/>. Este vetor viral é utilizado como um vetor de indução de silenciamento gênico (*Virus Induced Gene Silencing*; VIGS). O vetor possui o RNA 2 do *Tobacco rattle virus*, promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) duplicado e ribozima do satélite de *Subterranean clover mosaic virus* (SCMV) em plasmídeo binário o pCAMBIA 0390, que possui gene de seleção bacteriana para canamicina, regiões *left* e *right border*, que flanqueiam a região de interesse que será transferida para a planta via agrobactéria, e terminador da nopalina sintase (TNos) (Figura 15).

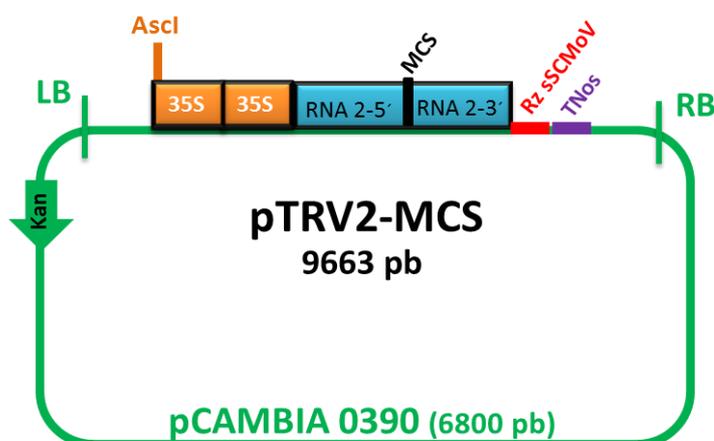


Figura 15 - Representação do vetor de indução de silenciamento gênico pTRV2-MCS. Este vetor contém o RNA 2 de *Tobacco rattle virus*, que apresenta um sítio múltiplo de clonagem (MCS) em sua sequência; Ribozima originária do satélite *Subterranean clover mosaic virus*; Terminador nopalina sintase; Gene de resistência bacteriana à canamicina; Promotor duplicado 35S de CaMV; Borda direita (RB) e borda esquerda (LB) de recombinação.

Para realizar a *overlap-extension PCR*, primeiro é necessário amplificar cada fragmento com *primers* que irão adicionar em cada sequência uma extremidade comum, que é compartilhada e forma uma região de sobreposição que serve como iniciadora para a polimerase. Dessa forma, foi realizada a PCR

para amplificar o pCAMBIA 0390 mantendo a região que contem o sítio de *Ascl* e o promotor 35S duplicado, na extremidade 5' e a região da ribozima de SCMV na extremidade 3' (Figura 16-A), com os *primers* senso PepRSV_Ribo_pCAM_For e P35S-3'Rev (Tabela 2). Para adicionar a região de complementariedade (parte da sequência da ribozima) no RNA 2 de PepRSV (Figura 16-B), foi realizada uma PCR utilizando os *primers* senso PepRSV RNA-2 For e antisenso PepRSV_Ribo_RNA2 Rev (Tabela 2), utilizando como molde o clone previamente obtido em pGEM - T Easy (item 2.2).

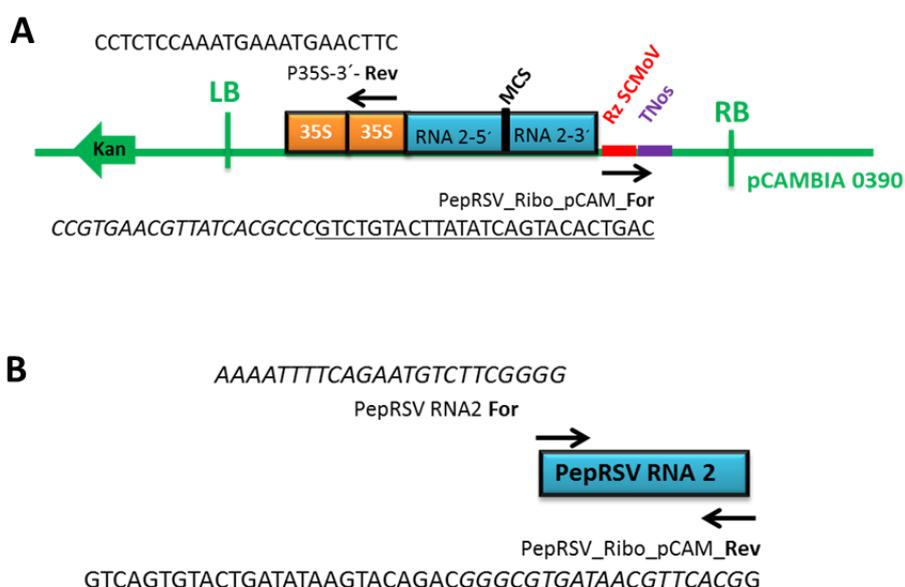


Figura 16 - Representação esquemática da posição dos *primers* para amplificar os fragmentos para a *overlap-extension PCR*. A - posicionamento dos *primers* para amplificar o vetor pCAMBIA 0390 mantendo a região que contem o sítio de *Ascl* e o promotor 35S duplicado, na extremidade 5' e a região da ribozima de SCMV na extremidade 3'; B – posicionamento dos *primers* utilizados para adicionar a região de complementariedade (parte da sequência da ribozima) no RNA 2 de PepRSV.

Os fragmentos de pCAMBIA 0390 e RNA 2 de PepRSV, produtos da reação descrita acima, foram purificados a partir de gel de agarose utilizando o kit “Gel Band Purification” (GE Healthcare). Após a purificação, estes foram usados como molde para a reação *overlap-extension PCR*, na qual ambas as sequências compartilham uma extremidade comum, neste caso, parte da sequência da ribozima, que fazem sobreposição que serve como iniciadora para a polimerase. A clonagem por *overlap-extension PCR* foi realizada em duas etapas: a primeira, na qual não são utilizados *primers*, porque as regiões de complementariedade, adicionadas previamente pelos *primers*

PepRSV_Ribo_pCAM_For e PepRSV_Ribo_RNA2 Rev, já servem de iniciadoras, foram utilizados 100 ng de cada fragmento purificado (pCAMBIA 0390 e RNA 2), 10 µL de Tampão HF 5X (NEB), 3 µL de dNTP (2,5 mM) (Thermo Scientific) e 1 µL de “Phusion *Taq* DNA Polymerase” (2,0 U/µL) (NEB), sendo o volume final ajustado para 25 µL. A reação foi submetida à pré-desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 12 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 53 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 8 min, e extensão final a 72 °C por 10 min.

Tabela 2 – Lista de *primers* utilizados para a RT-PCR do RNA 2 de PepRSV, amplificação do *backbone* do VIGS pTRV2-MCS e clonagem em pCAMBIA 0390.

	Primer	Sequência (5' → 3')
I	P35S-3' Rev	<u>CCTCTCCAAATGAAATGAACTTC</u>
II	PepRSV_Ribo_pCAM_For	CCGTGAACGTTATCACGCCCGTCTGTACTTATATCAGTACACTGAC
III	PepRSV_Ribo_RNA2_Rev	<u>GTCAGTGTACTGATATAAGTACAGACGGGCGTGATAACGTTACGG</u>
IV	PepRSV RNA2 For	AAAATTTTCAGAATGTCTTCGGGG
V	3'RNA1-Trip-For	GCGGTGTCGGTCGAGATT
VI	3'RNA1-Trip-Rev	CATAAGGCAGCATCAGTCACAAA

A sequência nucleotídica sublinhada (I) é referente à sequência do promotor 35S de CaMV; em (II) e (III), os nucleotídeos sublinhados correspondem às âncoras de ribozima de SCMV. Os nucleotídeos em negrito são sequências das extremidades do genoma viral.

Na segunda etapa, foi utilizado como molde 5 µL desta primeira reação, e os *primers* senso PepRSV-RNA2 For e antisenso P35S-3' Rev (Tabela 2), gerando um fragmento de PCR constituído do *backbone* de pCAMBIA 0390, promotor 35S duplicado, RNA 2 de PepRSV e ribozima de SCMV (Figura 17). As concentrações dos demais reagentes foram ajustadas para um volume final de 50 µL. O programa utilizado foi o mesmo que o da primeira etapa, porém foram realizados 20 ciclos e a temperatura de anelamento foi elevada para 55°C.

Em seguida, o produto de PCR correspondente à fusão foi eluído, utilizando o kit “QIAEX II Gel Extraction” (Qiagen, Hilden, Alemanha),

fosforilado com “T4 Polynucleotide Kinase PNK” (NEB) e circularizado com “T4 DNA Ligase” (NEB), ambas as reações realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Após a circularização, *E. coli*, cepa DH5 α foram transformadas por eletroporação com esta construção, originando o plasmídeo pPepRSV-RNA2 (Figura 17). Os possíveis clones foram selecionados por padrão de restrição com a enzima *Ascl* e seis foram confirmados por sequenciamento.

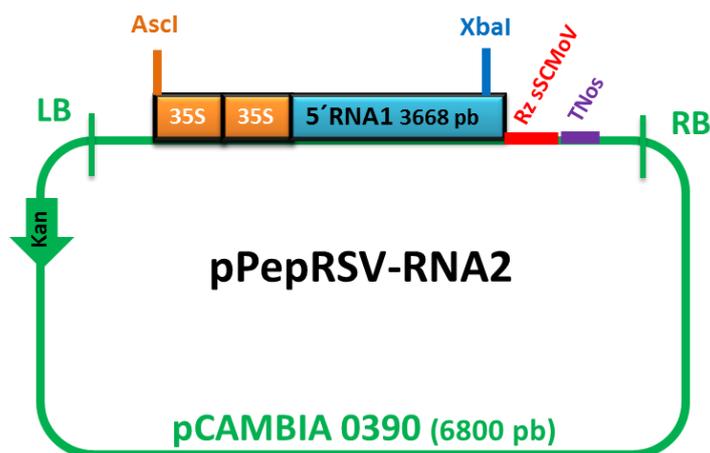


Figura 17 - Clone infeccioso pPepRSV-RNA2, derivada do VIGS pTRV2-MCS, contendo o RNA 2 de PepRSV, ribozima originária do satélite *Subterranean clover mosaic virus*, terminador nopalina sintase (TNos), gene de resistência bacteriana à canamicina, promotor duplicado 35S de CaMV, borda direita (RB) e borda esquerda (LB) de recombinação.

2.4 – Síntese do DNA complementar (cDNA) e PCR da região 5' do RNA1

Denomina-se aqui região 5' do RNA 1 a parte da sequência compreendida entre o primeiro nucleotídeo da extremidade 5' do RNA 1 viral até 3668 pb, região onde está presente um sítio de restrição da enzima *Xba*I, que poderá ser utilizado nos processos subsequentes de clonagem. Para a síntese do cDNA, foi utilizado o *primer* antisenso PepRSV-R1-5' Rev-2 (Tabela 3), na concentração final de 2,5 μ M. A reação de transcrição foi realizada utilizando a enzima “Superscript III” (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante, com ajuste da temperatura da reação para 52°C. Em seguida, essa reação foi submetida à incubação a 70°C por 15 minutos, para a inativação da ação enzimática. O cDNA foi então tratado com 1 μ L de RNase H (20 U/ μ L) (Invitrogen), sendo incubado a 37°C por 20 minutos, para fragmentar as moléculas de RNA molde do cDNA.

Para a amplificação da região 5'- RNA 1 por PCR, foi utilizado o *primer* senso 35S+PepRSV-R1-5'Cl (Tabela 3) e o mesmo *primer* antisenso já

descrito para a RT (PepRSV-R1-5' Rev-2) (Figura 18), porém na concentração final de 0,4 μ M. Este *primer* senso contém uma parte da sequência do promotor 35S de CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), que será necessária para a realização da *overlap-extension PCR*, uma reação em que as sequências a serem fusionadas compartilham uma extremidade comum que se sobrepõem e serve como iniciadora para a polimerase. Esta reação irá fusionar o promotor 35S antes do início da sequência de 5' - RNA 1.

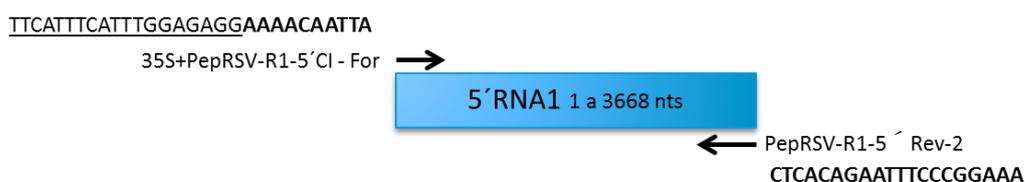


Figura 18 – Esquema mostrando a posição dos *primers* para amplificar a região 5' do RNA 1 de PepRSV, que compreende os nucleotídeos 1 a 3668 da sequência viral. Os nucleotídeos sublinhados no *primer* For corresponde à sequência do promotor 35S de CaMV.

Para a PCR, foram utilizados 5 μ L de Tampão HF 5X (NEB), 3,0 μ L de dNTP (2,5 mM)(Thermo Scientific) e 0,25 μ L de “Phusion *Taq* DNA Polymerase” (2,0 U/ μ L) (NEB), ajustando-se o volume final para 25 μ L. Esta reação foi submetida à pré-desnaturação a 98°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 98 °C por 15 s, anelamento a 52 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 4 min, e extensão final a 72 °C por 10 min.

Após a confirmação da amplificação da região 5' do RNA 1, o fragmento foi purificado por meio de eluição a partir de gel de agarose 0,8% corado com violeta cristal (40 μ g/mL), utilizando-se o kit “Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). Este fragmento foi então ligado ao vetor pGEM-T Easy, e *E. coli*, cepa DH5 α , foram transformadas com esta ligação, dando origem à construção 5'-RNA1-pGEM.

Tabela 3 - Lista de *primers* utilizados para a RT-PCR das regiões 5' e 3' do RNA 1 de PepRSV e para a amplificação e fusão da sequência do promotor 35S de CaMV.

	Primer	Sequência (5' → 3')
I	HDV Half+PepRSV-R1-3' Rev-2	<u>GCTGGGACCATGCCGGCCGGGCGTGATAACGTTACAG</u>
II	35S + PepRSV RNA-2 5' Cloning For	<u>AGTTCATTTTCATTTGGAGAGGAAAATTTTCAGAATGTCTTCG</u>
III	PepRSV-R1-5' Rev-2	CTCACAGAATTTCCCGGAAA
IV	35S+PepRSV-R1-5' CI - For	<u>TTCATTTTCATTTGGAGAGGAAAACAATTA</u>
V	PepRSV1-3_Rev-SpeI	TTT <i>actag</i> TGCCAAATGCCGAAACCTAAA
VI	PepRSV-RNA1-3' For	GACAGGAGTACAGAATCGTGG
VII	pRAPS_35Sx2 For	ATGACCATGATTACGCCAAG
VIII	35S-PepRSV_RNA1 Rev	TTCAAATATTCTAATTGTTTTCTCTCCAAATGAAATGA

Os nucleotídeos em negrito são sequências das extremidades do genoma viral, com exceção de (VII), que corresponde ao início da sequência, antes do sítio de *Ascl*, do vetor pRAPS. Os nucleotídeos sublinhados correspondem às âncoras de ribozima de HDV em (I) e do promotor 35S de CaMV em (II), (IV) e (VIII). As letras minúsculas em itálico em (V), representa o sítio para a enzima de restrição *SpeI*.

2.4.1 - Fusão do promotor 35S duplicado de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) com a região 5' do RNA 1 e clonagem em pGEM-T Easy

Primeiramente, a sequência do promotor 35S duplicado foi amplificada utilizando-se os *primers* pRAPS_35Sx2 For e 35S-PepRSV_RNA1 Rev (Tabela 3). O vetor pRAPS, que contém o promotor 35S duplicado em sua sequência e o sítio para a enzima de restrição *Ascl*, foi utilizado como molde. Para esta reação, foram utilizados 5 µL de Tampão HF 5X (NEB), 3,0 µL de dNTP (2,5 mM)(Thermo Scientific) e 0,25 µL de “Phusion *Taq* DNA Polymerase” (2 U/µL) (NEB), 1 µL de cada *primer*, ajustando-se o volume final para 25 µL. Esta reação foi submetida à pré-desnaturação a 98°C por 2 min, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 98 °C por 15 s, anelamento a 52 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 10 min.

A amplificação de fragmentos de DNA do promotor 35S duplicado (aproximadamente 800 pb), foi confirmada por eletroforese em gel de agarose

e os fragmentos de DNA foram purificados por meio de eluição, utilizando-se o kit “Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare).

Após a obtenção dos dois fragmentos purificados e quantificados, a *overlap-extension PCR* foi então realizada. Para a primeira reação, foram utilizados 3,5 µL de 5´-RNA1-pGEM (100 ng), 2 µL do 35S (100 ng), 5 µL de Tampão HF 5X (NEB), 3 µL de dNTP (2,5 mM) (Thermo Scientific) e 1 µL de “Phusion *Taq* DNA Polymerase” (2,0 U/µL) (NEB), sendo o volume final ajustado para 25 µL. A reação foi submetida à pré-desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 12 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 53 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 4 min 30 s, e extensão final a 72 °C por 10 min.

Na segunda etapa, foi utilizado como molde 5 µL desta primeira reação, e os *primers* senso pRAPS_35Sx2 For e antisenso PepRSV-R1-5´Rev-2 (Tabela 3) (Figura 19). As concentrações dos demais reagentes foram ajustadas para um volume final de 50 µL. O programa utilizado foi o mesmo que o da primeira etapa, porém foram realizados 20 ciclos, e a temperatura de anelamento foi elevada para 55°C. O tamanho esperado do fragmento fusionado era de aproximadamente 4300 pb.

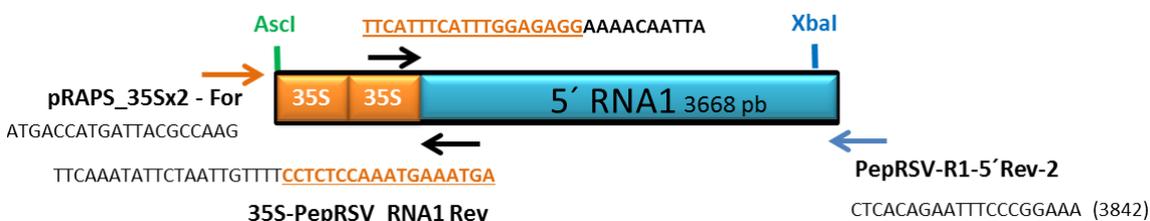


Figura 19 – Esquema da posição dos primers para realizar a amplificação do promotor 35S duplicado e para a fusão deste na região 5´RNA1. Os primers utilizados para a fusão estão representados pela setas cor laranja (For) e azul (Rev). Os nucleotídeos destacados em laranja corresponde à sequência do promotor 35S que foi adicionada para que ocorra a sobreposição e fusão dos fragmentos.

A fusão 35S-5´RNA1 foi ligado ao vetor pGEM-T Easy e *E. coli*, cepa Stb14, foram transformadas com esta ligação, dando origem à construção 35S-5´RNA1-pGEM (Figura 20). Os possíveis clones foram confirmados primeiro por padrão de restrição e, posteriormente, por sequenciamento.

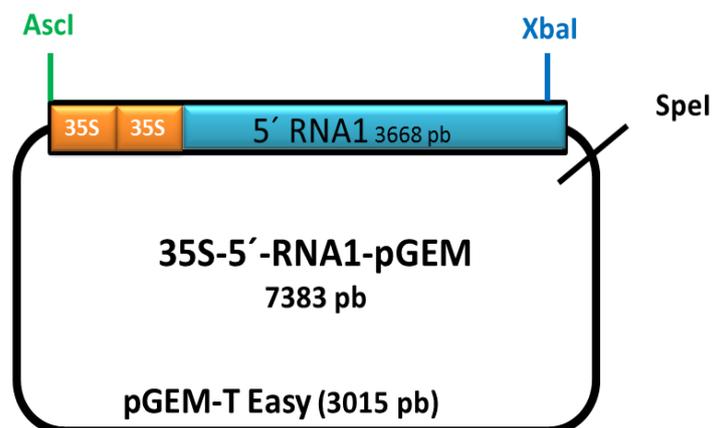


Figura 20 – Representação do vetor originado após a ligação do fragmento fusionado 35S-5'RNA1 em pGEM-T Easy, denominado 35S-5'-RNA1-pGEM.

2.5 - Síntese do DNA complementar (cDNA) e PCR da região 3' do RNA1

A região aqui denominada 3' do RNA 1 compreende os nucleotídeos entre aproximadamente 3660 pb até o final da extremidade 3' do vírus, em 6828 pb. A transcrição reversa (RT) para a síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o *primer* antisense PepRSV1-3_Rev_SpeI (Tabela 3), na concentração final de 2,5 μ M. O sítio para a enzima de restrição SpeI será inserido para posterior ligação desta região 3'- RNA 1 com a 5'- RNA 1 no vetor de pGEM-T Easy. A enzima “Superscript III” (Invitrogen) foi utilizada nesta reação, de acordo com o protocolo do fabricante, com ajuste da temperatura da reação para 52°C.

Para a amplificação da região 3'-RNA1, foi utilizado o primer senso PepRSV-RNA1-3' (Tabela 3) e o primer antisense utilizado na RT (PepRSV1-3_Rev_SpeI) (Figura 21), também na concentração 0,4 μ M. Para as PCRs, foi utilizada a enzima “LongAmp *Taq* DNA Polymerase” (NEB).



Figura 21 - Esquema da posição dos primers para realizar a amplificação da região 3' RNA 1 de PepRSV, que corresponde aos nucleotídeos 3660 à 6828.

A amplificação dos fragmentos foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. Após a confirmação, as reações foram purificadas por meio de eluição

a partir de gel de agarose 0,8% corado com violeta cristal (40 µg/mL), utilizando-se o kit “Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare).

Várias tentativas de clonagem do cDNA do 3´- RNA 1 no vetor pGEM-T Easy foram realizadas, no entanto, nenhuma dos possíveis clones obtidos apresentaram o padrão de restrição esperado. Por isso, a clonagem do 3´-RNA 1 foi realizada utilizando o vetor pCR4-TOPO (Invitrogen). Para a transformação em *E. coli*, foram utilizadas as cepas DH5α, Stbl4 e DH10B, originando a construção 3´-RNA1-TOPO (Figura 22). Os possíveis clones também foram confirmados por padrão de digestão por enzima de restrição e sequenciamento (Macrogen-Coréia).

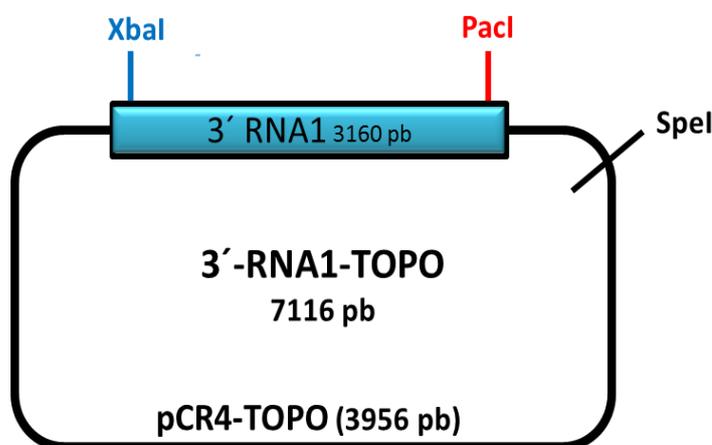


Figura 22 - Representação do vetor originado após a ligação do fragmento 3´-RNA 1 no vetor pCR4-TOPO, denominado 3´-RNA1-TOPO.

2.6 – Obtenção do RNA1 de PepRSV

Para a recuperação do RNA 1, foram utilizadas duas estratégias: uma utilizando enzimas de restrição e ligação e outra por *overlap-extension PCR*, na qual a região de sobreposição entre os fragmentos é de aproximadamente 240 pb, e inclui o sítio de restrição de XbaI.

Para realizar a primeira estratégia, o fragmento 35S- 5´ RNA 1 foi digerido com duas enzimas de restrição, SpeI (no vetor plasmidial pGEM-T Easy) e XbaI (que já existe na sequência viral), e em seguida foi desfosforilado com CIP (*Calf Intestinal Phosphatase*) (NEB), segundo instruções do fabricante. Para o fragmento 3´- RNA 1, as enzimas utilizadas foram XbaI (já existe na sequência) e SpeI. Este último foi inserido no *primer* antisense por PCR, mas também está presente nos vetores de clonagem.

Na sequência 3'-terminal dos RNA 1 e RNA 2 existe naturalmente um sítio de restrição para *PacI*, que será utilizado na transferência do RNA 1 para o vetor binário previamente digerido com as enzimas *AsclI* e *PacI*, removendo assim o RNA 2 de PepRSV. Ao subclonar o RNA 1 neste vetor binário, nos referimos ao RNA 1 como quase completo. Isso porque o sítio de *PacI*, que existe naturalmente na sequência do vírus e será utilizado na clonagem, corta na posição 6527-6531 do RNA1, ou seja, quando este for digerido com *PacI* para substituir o RNA 2 vetor pPepRSV-RNA2, aproximadamente 300 pb da sequência será excluída. Porém, como a região 3'-terminal do RNA 2 é idêntica à região 3'-terminal do RNA 1 (459 nucleotídeos, Figura 23, A), o fragmento da sequência ausente no RNA 1 será complementada pela mesma região do RNA 2 que irá permanecer no *backbone* de pCAMBIA (Figura 23, B).

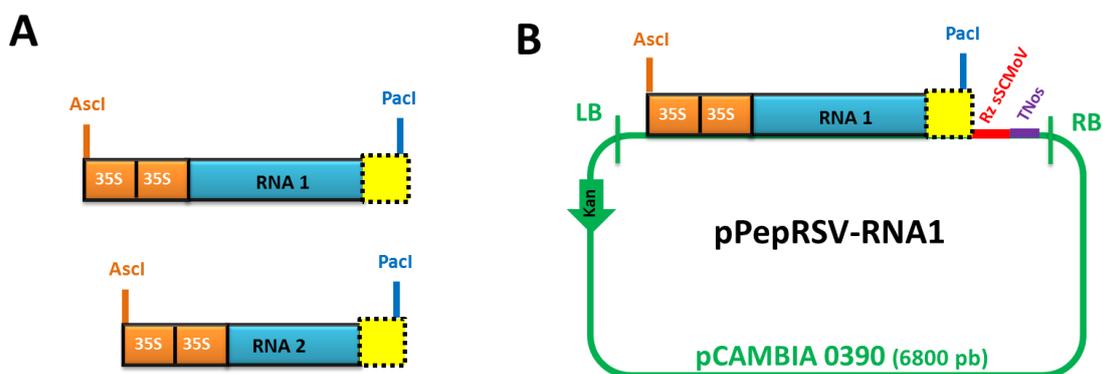


Figura 23 - Representação esquemática da região genômica de PepRSV que será clonada no vetor pPepRSV-RNA2. (A) Região de 459 nts que se sobrepõem (amarelo) na região 3'-terminal do RNA 1 e do RNA 2. Em (B), representação esquemática da construção do clone infeccioso após a substituição do RNA 2 pelo RNA 1, mostrando em amarelo a região do RNA 2 que permanecerá em pPepRSV-RNA1 após a digestão com *PacI*.

Os fragmentos resultantes da digestão de 3'- RNA 1 e pCR4-TOPO possuem tamanhos muito próximos, e por isso a eletroforese para esta eluição foi submetida a uma corrente de 50 V, ao invés de 100 V que normalmente é usada. Isso faz com que os produtos da digestão migrem mais devagar, fazendo com que as bandas fiquem um pouco mais distantes uma da outra.

Após o tratamento com as respectivas enzimas, as bandas resultantes das digestões foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com violeta cristal (40 µg/mL) e purificados utilizando o kit comercial "Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare). Após a quantificação do DNA

eluído, os fragmentos purificados foram ligados utilizando a enzima “T4 DNA Ligase” (NEB) e transferidos por eletroporação em *E. coli*, cepa DH10B.

Para a segunda estratégia de *overlap-extension PCR*, ambas as construções precisam ser amplificadas por PCR com uma nova combinação de *primers* específicos, que irão adicionar aos fragmentos a extremidade em comum que será compartilhada pelas sequências. Para tanto, o plasmídeo 35S-5´RNA1-pGEM foi usado como molde para a PCR de 35S- 5´ RNA1, que foi realizada com os *primers* senso pRAPS_35Sx2 e antisenso PepRSV-R1-5´Rev-2 foram utilizados. Para gerar o novo fragmento de 3´- RNA 1, foi utilizada a combinação de *primers* PepRSV-RNA1-3´ senso e PepRSV1-3_Rev-SpeI antisenso, sendo o plasmídeo 3´-RNA 1-TOPO o molde (Figura 24). Para as reações, foi utilizada a enzima Phusion Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific).

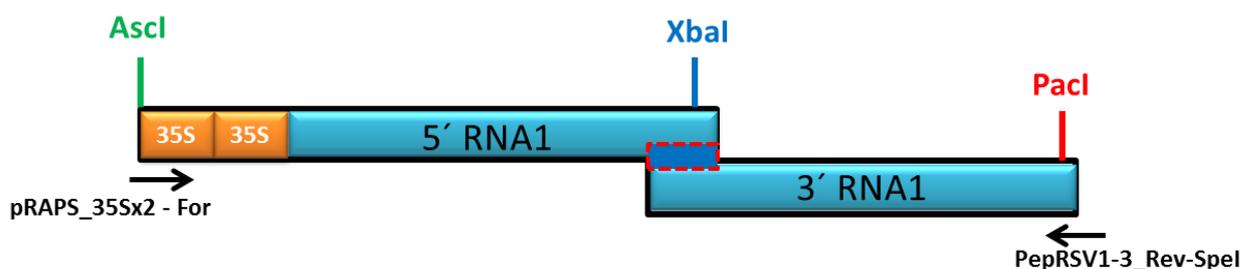


Figura 24 - Representação esquemática da *overlap-extension* das regiões 35S-5´-RNA1 com a região 3´-RNA1. O pontilhado em vermelho representa a região em que os terminais das duas construções se sobrepõem.

Após as ampliações, ambos os fragmentos de PCR foram purificados a partir de gel de agarose 0,8% corado com violeta cristal (40 µg/mL) e eluídos utilizando o kit comercial “Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare).

Para a fusão por *overlap-extension PCR*, aproximadamente 100 ng de cada fragmento foram misturados à 5 µL de Tampão HF 5X (NEB), 3,0 µL de dNTP (2,5 mM)(Thermo Scientific) e 0,25 µL de “Phusion Taq DNA Polymerase” (2 U/µL) (Thermo Scientific), ajustando-se o final volume para 25 µL. Esta primeira reação foi submetida à pré-desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 12 ciclos de desnaturação a 98 °C por 15 s, anelamento a 52 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 5 min, e extensão final a 72 °C por 10 min. Na segunda etapa, foi utilizado como molde 5 µL desta primeira reação, 2 µL do

primer senso pRAPS_35Sx2 For, 2 µL do primer antisenso PepRSV1-3_Rev-Spel (Tabela 3), 10 µL de Tampão HF 5X (NEB), 4,0 µL de dNTP (2,5 mM)(Thermo Scientific) e 0,5 µL de Phusion Taq DNA polymerase (2 U/µL), ajustando-se o volume final para 50 µL. O programa utilizado foi o mesmo que o da primeira etapa, porém foram realizados 20 ciclos e a temperatura de anelamento utilizada foi de 57°C.

Após a fusão, o fragmento, de aproximadamente 6800 pb, foi purificado por meio de eluição e ligado no vetor pGem-T Easy. Após a ligação, *E. coli*, cepa DH10B, foram transformadas e as colônias resultantes foram analisadas por padrão de restrição e por sequenciamento.

2.8 - Substituição do RNA 2 de PepRSV pelo RNA 1 no vetor pPepRSV-RNA2

O RNA1 de PepRSV será digerido com duas enzimas de restrição, AscI e PacI, e o fragmento, de aproximadamente 6800 pb, será purificado utilizando-se o kit “Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). O vetor pPepRSV-RNA2 também será digerido com as mesmas enzimas, desfosforilado e purificado conforme já descrito para o RNA 1. A ligação será realizada utilizando a enzima “T4 DNA Ligase” (NEB) e *E. coli*, cepas DH10B e Stbl4 (Invitrogen) serão transformadas por eletroporação.

Os clones obtidos deverão ter um tamanho de aproximadamente 15 kb (7600 pb do *backbone* do vetor pPepRSV sem o RNA2 e 6800 pb do RNA1 completo de PepRSV), e serão confirmados por padrão de digestão com enzimas de restrição e sequenciamento por *primer-walking*. Após a confirmação, os clones positivos serão transferidos em *Agrobacterium tumefaciens*, cepa GV3101, e agroinfiltrados em plantas de *N. benthamiana*.

Caso apareçam sintomas em folhas não agroinfiltradas, o que já é um indício da infectividade do clone, outros experimentos serão realizados para detectar a presença do RNA 1 na planta, como testes sorológicos e visualização das partículas virais em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). Com a confirmação da obtenção do clone, o gene da enzima fitoenol desaturase (PDS) será clonado no clone infeccioso do RNA 2 de PepRSV (vetor pTRV-RNA2), e esta construção será co-inoculada com o RNA1 de

PepRSV, para avaliação quanto à capacidade de indução do silenciamento do gene PDS e viabilidade da utilização deste clone como VIGS.

3 - Resultados e Discussão

3.1 – Amplificação do RNA 2 de PepRSV e clonagem em vetor binário

O cDNA do RNA 2 de PepRSV foi amplificado por RT-PCR a partir da extração do RNA total do vírus. O tamanho esperado do fragmento de DNA obtido da PCR era de aproximadamente 1800 pb, conforme pode ser visto na Figura 25-A.

Após a purificação, este fragmento foi clonado no vetor pGEM-T Easy, gerando a construção RNA2-pGEM. Alguns clones foram selecionados para serem confirmados por digestão com a enzima de restrição EcoRI, e posteriormente foram confirmados por sequenciamento.

Primeiramente, foi realizada uma PCR para amplificação do vetor binário pCAMBIA 0390, a partir do VIGS pTRV2-MCS. O tamanho esperado para o fragmento amplificado é de aproximadamente 8000 pb (6800 do vetor pCAMBIA 0390 e 800 pb do promotor 35S duplicado), conforme pode ser visto na Figura 25-B.

Para a fusão dos fragmentos do vetor pCAMBIA 0390 com o RNA 2 de PepRSV, foi realizada uma reação de *overlapping-extension* PCR, obtendo-se um fragmento a aproximadamente 10000 pb, correspondente ao backbone do vetor viral pTRV2-MCS (pCAMBIA 0390) (6800 pb), o promotor 35S duplicado (800 pb) e ao RNA 2 de PepRSV (1800 pb) (Figura 25-C).

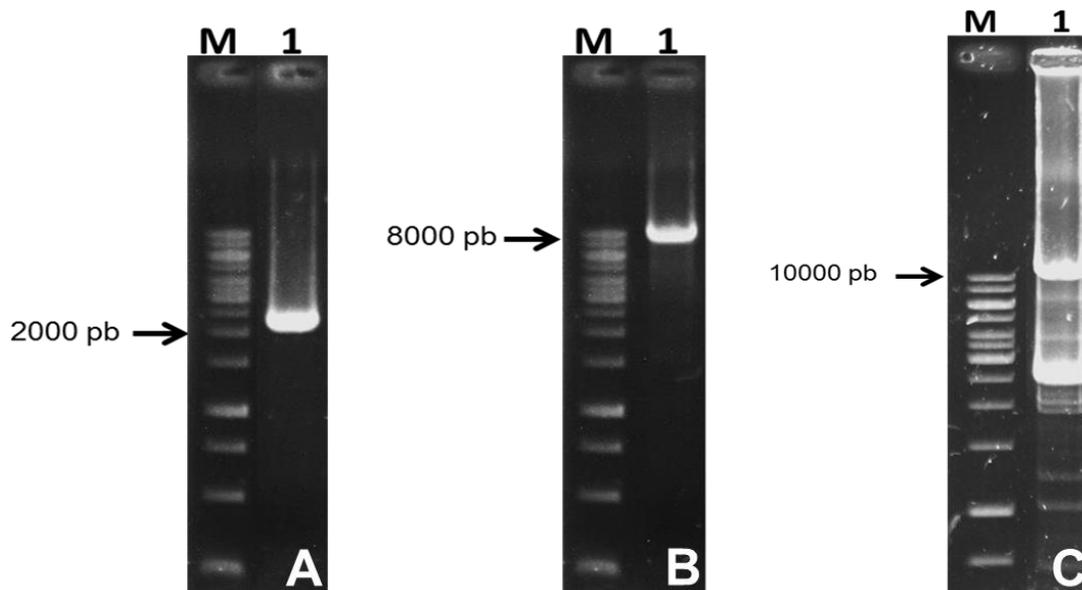


Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando em (A) - amplificação por PCR do RNA 2 de PepRSV; (B) - amplificação por PCR do *backbone* de pCAMBIA 0390 com 35S duplicado e com a ribozima de SCMV; (C) - resultado da *overlapping-extension PCR* com o tamanho correspondente à fusão pCAMBIA 0390 modificado com o RNA 2. M- Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Após a PCR, o fragmento correspondente à fusão foi circularizado e transformado em *E. coli*, cepa DH5 α , dando origem ao vetor pPepRSV-RNA2. Após a extração de DNA plasmidial, duas colônias (Figura 26-A, setas) foram analisadas por padrão de restrição com a enzima de restrição *Ascl*.

Conforme pode ser visto na Figura 26-B, a digestão com a enzima de restrição *Ascl* linearizou o vetor (poços 2 e 4), como era esperado, uma vez que há apenas um sítio para esta enzima localizado antes da sequência do promotor 35S duplicado. Assim, o tamanho esperado do vetor linearizado era de aproximadamente 10000 pb.

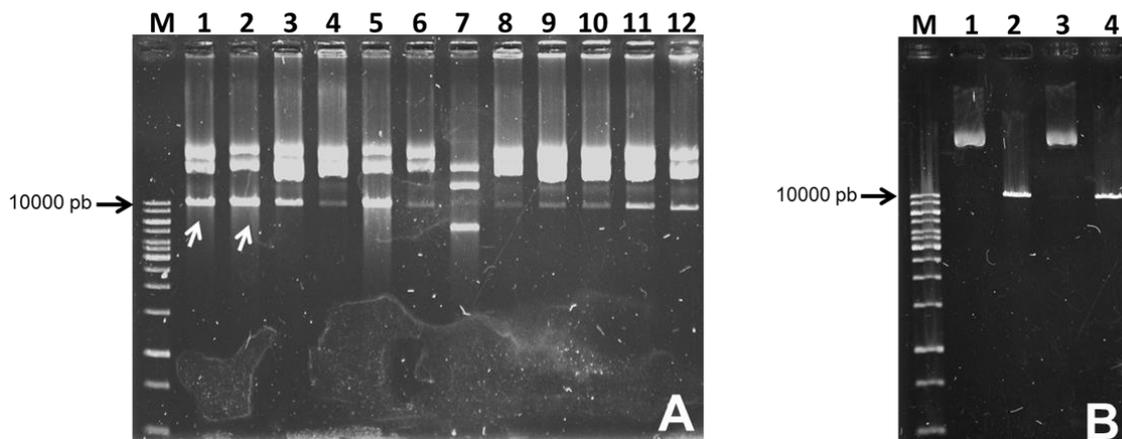


Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose 1%. (A) - Extração de DNA plasmidial do vetor pPepRSV-RNA2. Apenas as colônias 1 e 2 (poços 1 e 2, setas) foram escolhidas para serem analisadas por padrão de digestão; (B) - Análise do padrão de restrição de pPepRSV-RNA 2 com *Ascl*. Poços 1 e 3- colônias 1 e 2 não digeridas, respectivamente; Poços 2 e 4- colônias 1 e 2 digeridas com *Ascl*, respectivamente, mostrando uma única banda na altura de 10 kb, conforme esperado. M- Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

3.2 - Amplificação do cDNA da região 5'-RNA1 por PCR e clonagem em pGEM-T Easy

O cDNA de PepRSV foi utilizado como molde para a amplificação por PCR da região 5', que compreende os nucleotídeos 1 a 3661 (Figura 26), gerando o fragmento 5'-RNA1.

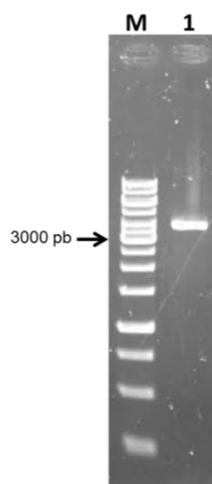


Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose 1%. Amplificação da região 5'-RNA1 do cDNA de PepRSV, com tamanho aproximado de 3600 pb. M- Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Após a purificação, este fragmento foi clonado no vetor pGEM-T Easy, gerando a construção 5'-RNA1-pGEM. Dezesesseis clones foram selecionados para confirmação por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, mas apenas dois apresentaram o padrão de restrição esperado (Figura 27, setas),

mostrando dois fragmentos nos tamanhos esperados de 3000 pb, correspondente ao vetor e outro com aproximadamente 3600 pb (5'-RNA1).

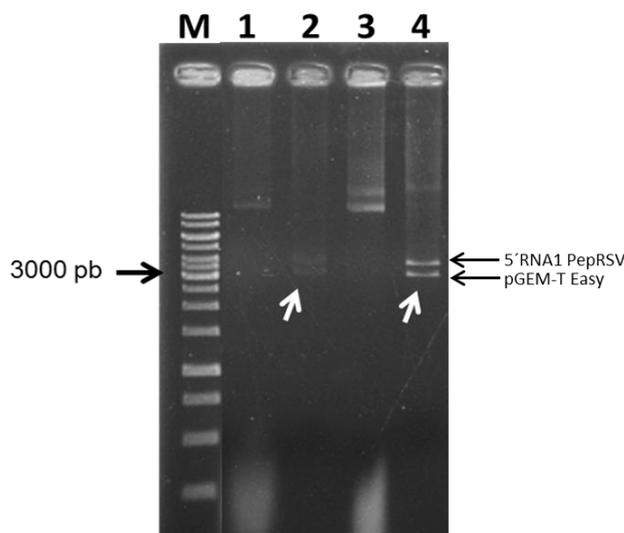


Figura 28 - Perfil de restrição dos clones 5'-RNA1-pGEM com EcoRI. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os possíveis clones positivos. Extração de DNA plasmidial de 5'-RNA1-pGEM colônia 25 não digerido e não digerido (poços 1 e 2, respectivamente); Poços 3 e 4 – Extração de DNA plasmidial do 5'-RNA1-pGEM colônia 26 não digerido e digerido, respectivamente. M - marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

3.3 - *Overlap-extension PCR* da sequência do promotor 35S duplicado com 5'-RNA1

Após a confirmação por sequenciamento, o clone 26 de 5'-RNA1-pGEM (Figura 28, poço 3) foi selecionado para ser fusionado ao promotor 35S duplicado de CaMV, que foi amplificado por PCR (Figura 29-A), obtendo-se um fragmento de aproximadamente 800 pb. A reação de *overlap-extension PCR* foi então realizada, conforme descrito no item 2.3, dando origem à construção 35S-5'-RNA1-pGEM, que foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (Figura 29-B), e posteriormente clonada no vetor pGEM-T Easy. *E. coli*, cepas Stb14 e DH5 α foram transformadas com esta construção por eletroporação.

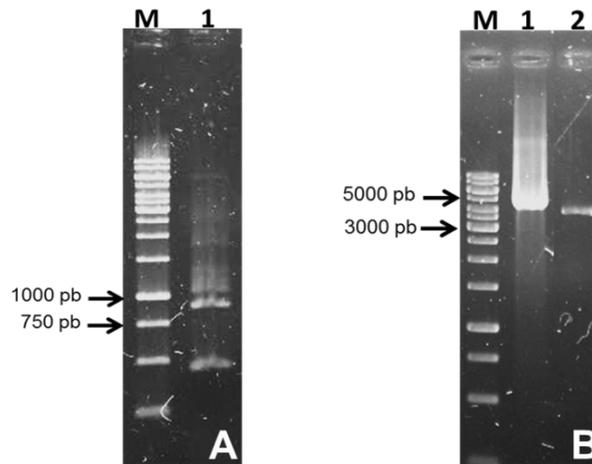


Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a PCR do promotor 35S duplicado, com tamanho aproximado de 800 pb (A). Em (B) - confirmação da reação de *overlap-extension*. Poço 1- PCR da fusão do promotor 35S+5'RNA1 de PepRSV apresentando o tamanho esperado da fusão de aproximadamente 4500 pb; Poço 2- PCR de 5'RNA1 sem fusionar. M- Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Após a extração de DNA plasmidial, uma colônia (Figura 30-A, seta) foi analisada por padrão de restrição com as enzimas *Ascl* e *XbaI*. O tamanho esperado do fragmento, quando digeridos apenas com uma das enzimas, que deve linearizar a construção, era de aproximadamente 7400 pb (3600 do 5'RNA1, 800 pb do promotor 35S duplicado e mais 3000 pb do vetor de clonagem pGEM). A digestão dupla gerou dois fragmentos, um de 3000 pb (pGEM) e outro com o restante da construção (acima de 4000 pb), conforme mostrado na Figura 30-B. Dois clones foram confirmados por sequenciamento por *primer-walking*.

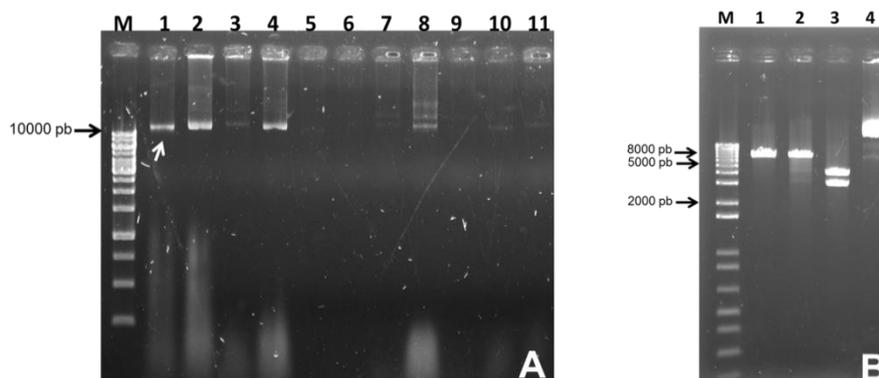


Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose 1%. (A) – Poços 1 a 11 - Extração de DNA plasmidial da fusão 35S-5'RNA1 -pGEM transformada em *Stbl4*. Apenas a colônia 1 (poço 1, seta) foi escolhida para ser confirmada por padrão de digestão. (B) - Padrão de restrição da construção 35S-5'RNA1 com *Ascl* e *XbaI*. Poço 1 – digestão com *Ascl*; Poço 2 – digestão com *XbaI*; poço 3 – digestão dupla com *Ascl* e *XbaI* e poço 4 - Extração de DNA plasmidial da colônia 1 não digerida. M - Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

3.4 - Amplificação do cDNA da região 3'-RNA1 por PCR e clonagem no vetor pCR4-TOPO

O cDNA de PepRSV foi utilizado como molde para a amplificação por PCR da região 3', que compreende os nucleotídeos 3661 a 6886, gerando o fragmento 3'-RNA1, com aproximadamente 3200 pb (Figura 31).

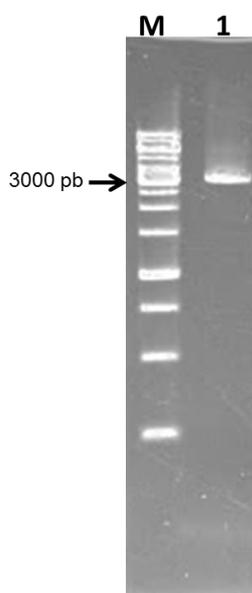


Figura 31 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a amplificação por PCR da região 3' do RNA1 de PepRSV, com o tamanho esperado de aproximadamente 3200 pb. M- Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Para a obtenção de clones de 3'-RNA1-TOPO, três diferentes cepas de *E. coli* (DH5 α , Stbl4 e DH10B), foram transformadas com esta construção. Apenas a transformação em DH10B, crescida a 28°C durante 24h, originou clones que apresentaram padrão (Figura 32-A) para análise por restrição (Figura 32-B). As extrações de DNA plasmidial provenientes das colônias das outras cepas, principalmente as de DH5 α crescidas a 37°C, se apresentavam muito baixas, com tamanho menor que 10000 pb, quando analisadas por eletroforese. Quando era realizada análise por padrão de restrição com EcoRI, não se observava a presença do inserto 3'-RNA1 (dados não mostrados). Este mesmo problema foi observado ao se tentar clonar esta construção no vetor pGEM-T Easy, porém a análise de restrição era feita utilizando a enzima SpeI, para linearizar o vetor, uma vez que 3'-RNA 1 tem praticamente o mesmo tamanho de pGEM-T Easy (3000 pb cada).

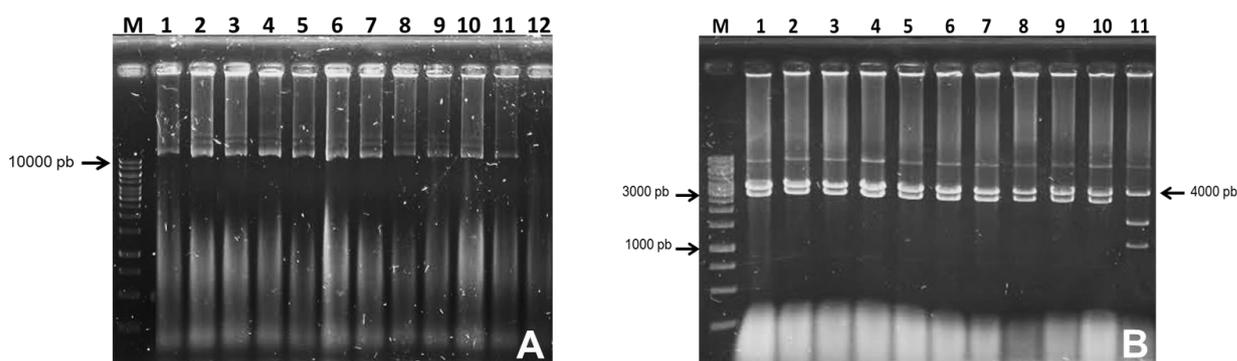


Figura 32 - Eletroforese em gel de agarose 1%. (A) - poços 1 a 11 - Extração de DNA plasmidial de 3'-RNA1-TOPO. (B) - poços 1 a 11- Digestão teste da construção 3'RNA1-TOPO com EcoRI. M- Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Dez, dos onze clones, apresentaram o padrão de restrição esperado (3000 pb do 3'-RNA 1 e 4000 pb do vetor pCR4-TOPO), quando digeridas com EcoRI. Dois clones (Figura 32, poços 1 e 2) foram selecionadas para serem sequenciadas.

3.5 - Obtenção do RNA1 de PepRSV

Para ligar as regiões 5' e 3' do RNA 1 de PepRSV, cada construção foi submetida à digestão dupla com as enzimas de restrição XbaI e SpeI. O resultado esperado é a linearização de 35S-5'-RNA1-pGEM (o fragmento liberado é muito pequeno, aproximadamente 100 pb) e a liberação do fragmento de 3'-RNA1 com os respectivos sítios para a ligação (Figura 33).

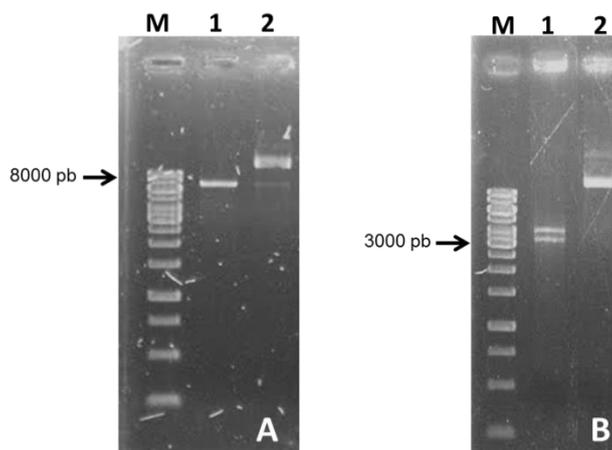


Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando padrão de restrição com as enzimas SpeI e XbaI. (A) – Digestão dupla de 35S-5'-RNA1-pGEM (poço 1) e não digerido (poço 2); (B) - Digestão dupla da construção 3'-RNA1-TOPO (poço 1) e não digerido (poço 2). M- Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Após a digestão, os fragmentos foram eluídos e quantificados (Figura 34, A e B) sendo então ligados e *E. coli*, cepas DH5 α e Stb14 foram transformadas por eletroporação. Porém, após a extração de DNA plasmidial, nenhum dos possíveis clones apresentou o padrão de restrição esperado quando digeridas com as enzimas *Ascl* e *Pacl*, que estão presentes na extremidade inicial do 35S-5'-RNA 1 e na extremidade final de 3'RNA 1, respectivamente, e deveria, portanto, liberar um fragmento com tamanho correspondente ao RNA 1 completo de PepRSV (6800 pb).

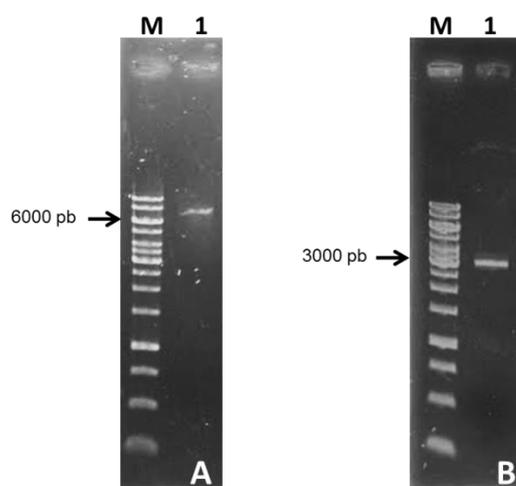


Figura 34 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando as quantificações dos fragmentos eluídos de (A) - 35S-5'-RNA1 (poço 1) e (B) - 3'-RNA1-TOPO (poço 1). M- Marcador de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Como o sequenciamento do fragmento 35S-5'RNA1-pGEM já havia sido analisado e os sítios das enzimas de restrição estavam confirmados, uma possível explicação para este resultado estaria na quantidade de DNA utilizada na ligação, que seria insuficiente. Então procedeu-se a otimização do protocolo de ligação, concentrando o DNA das amostras e utilizando diferentes proporções vetor:inserto. Porém, até o momento, não se obteve nenhum clone com o padrão esperado.

Simultaneamente à obtenção desses resultados, foi analisado o sequenciamento de oito clones da construção 3'-RNA1-TOPO, que revelou a troca de um nucleotídeo (de G para A) (Figura 35), na posição 3740 pb da sequência, ou seja, na região da RdRp, resultando na substituição do aminoácido triptofano (W) (TGG) para um stop códon (TGA) (Figura 36). Com

este resultado, todas as tentativas de clonagem, inclusive a *overlap-extension* PCR, foram interrompidas.

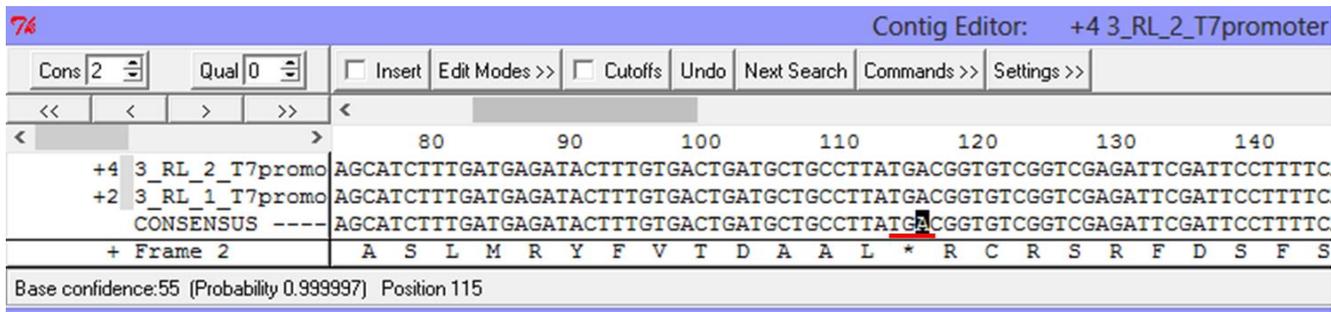


Figura 35 - Análise da sequência pelo programa Staden Package, mostrando sublinhado em vermelho o nucleotídeo trocado, gerando o stop códon.

A solução encontrada para contornar este problema foi a realização de uma nova PCR para garantir a inserção do nucleotídeo correto, utilizando o plasmídeo já existente 3'-RNA1-TOPO como molde. Os *primers* utilizados encontram-se na Tabela 3 (3'RNA 1 – Trip-For e 3'RNA 1 – Trip-Rev).

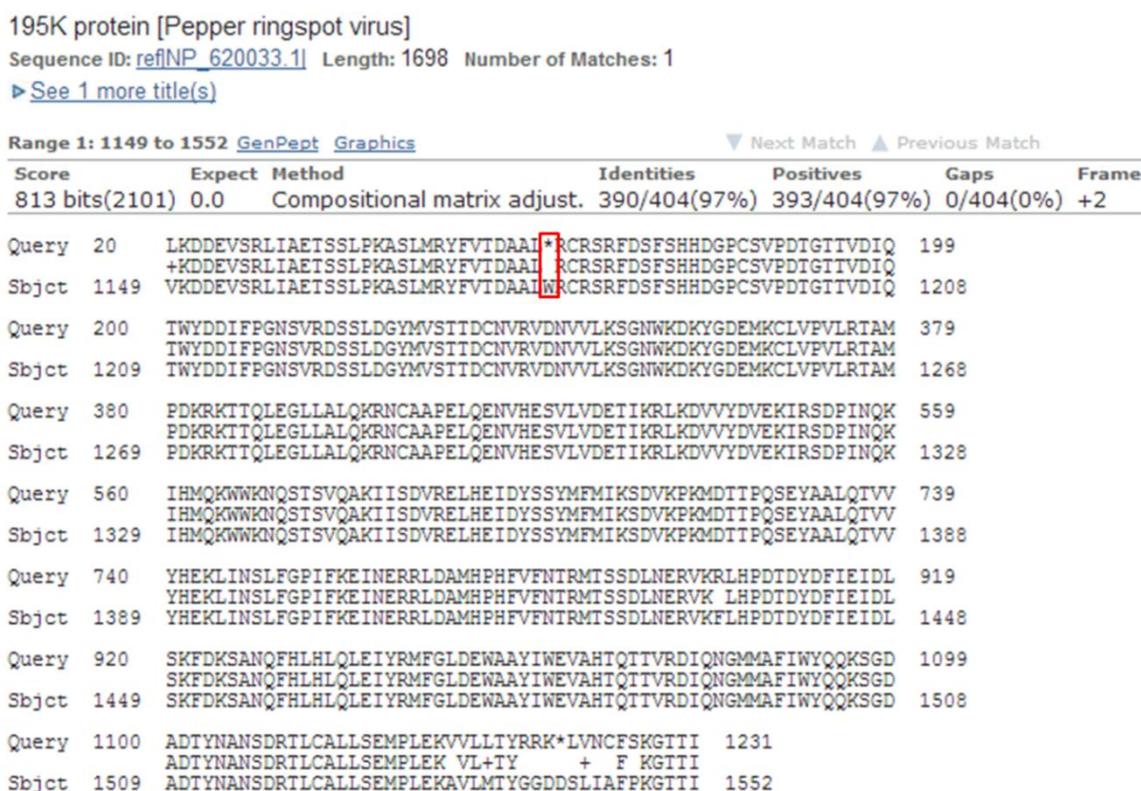


Figura 36 - Análise pelo programa Blastx, comprando a sequência proveniente do sequenciamento (Query) com a depositada no banco de dados (Sbjct). Em vermelho, a troca do aminoácido triptofano (W) por stop códon (*).

3.6 - Ligação do RNA 1 de PepRSV no vetor pPepRSV-RNA2

A substituição do RNA 2 pelo RNA 1 de PepRSV será realizada por digestão com as enzimas de restrição *Ascl* e *Pacl* e ligação sítio-específica dos fragmentos. Outra possibilidade também é usar a estratégia *overlap-extension* PCR, à maneira como foi realizada para a inserção do RNA 2 de PepRSV no *backbone* de pCAMBIA 0390.

Após a obtenção do RNA 1 em vetor binário, as duas construções (RNA 1 e RNA 2) serão co-infiltradas para avaliar o aparecimento de sintomas, que serão comparados com os sintomas presentes em plantas inoculadas mecanicamente com o vírus. A infectividade do clone infeccioso será confirmada por microscopia eletrônica (Leaf dip) e Western-blot.

CAPÍTULO IV – Discussão geral e perspectivas

Um dos objetivos deste trabalho, inicialmente, era determinar as localizações subcelulares, utilizando microscópio confocal, das proteínas p29 e CP em relação à mitocôndria. Para este propósito, várias metodologias foram testadas (protoplastos, cultura da linhagem BY-2 de células de tabaco ou imunomarcação para microscopia eletrônica), porém nenhuma possibilitou a visualização da co-localização destas proteínas e mitocôndrias.

Outra questão é a fusão das proteínas-alvo com proteínas fluorescentes (PF), que pode ter interferido nas funções e localizações. Neste trabalho, as proteínas p29 e CP foram fusionadas apenas pela região C-terminal às PF (GFP ou YFP). Contudo, não se sabe o comportamento das proteínas quando fusionadas à extremidade N-terminal. Portanto, para tentar esclarecer a localização de p29 e CP na mitocôndria, estas fusões às extremidades N-terminal em vetores binários já estão sendo feitas.

A co-localização de p29 com uma proteína de movimento (30 K) é uma indicação de que suas funções sejam análogas, fornecendo também informação do mecanismo molecular do movimento célula-a-célula de tobavírus. No entanto, para corroborar esse dado e comprovar a funcionalidade desta proteína, ensaios de trans-complementação utilizando o clone infeccioso de tobamovírus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (Junqueira *et al.*, 2014) já estão sendo realizados. Em uma primeira tentativa, a proteína de movimento de PMMoV foi deletada e substituída pela p29 de PepRSV. Para uma próxima tentativa, serão feitas algumas adaptações, como a troca da cepa de *E. coli* e diminuição da temperatura de incubação para crescimento bacteriano de 37°C para 28°C, que é uma estratégia para diminuir a instabilidade do plasmídeo contendo cDNA viral (Liao, 1991), que pode acarretar deleções de partes essenciais do genoma viral que inviabilizam a infectividade do clone (Al-Allaf *et al.*, 2013; Bedoya e Daròs, 2010; Boyer e Haenni, 1994; Lai, 2000; Satyanarayana *et al.*, 2003).

Com relação à localização da CP no núcleo, é possível que esta seja causada apenas pelo endereçamento da proteína fluorescente YFP, e não devido à sinalização subcelular de CP para o núcleo, uma vez que em células

vegetais as PFs se localizam não apenas no citoplasma, mas também podem ir para o núcleo devido ao seu pequeno tamanho (Tanz *et al.*, 2013).

Entretanto, algumas proteínas virais tem direcionamento para o núcleo, com o objetivo de alterar a expressão gênica do hospedeiro. Um exemplo é a proteína VPg de potyvírus, que se localiza no núcleo, mais especificamente no nucléolo. Nestes vírus, a VPg tem a função de modificar o perfil de expressão de proteínas ribossomais, ativando proteínas ribossômicas específicas que irão traduzir preferencialmente as proteínas virais (Dardick, 2007; Thiébeauld *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Alguns estudos revelaram uma possível função regulatória no ciclo celular do hospedeiro (Bureau *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009), beneficiando a infecção viral. Este tipo de interação é bem descrita para geminivírus, com a proteína NSP (*nuclear shuttle protein*), que possui localização no núcleo.

A partir destes estudos, é possível sugerir que a CP se direciona para o núcleo para atuar da mesma forma que VPg atua nos potyvírus. Buscando por evidências que comprovem que CP possui endereçamento para o núcleo, será realizado um ensaio de expressão dessa proteína em folhas de *N. benthamiana* por agroinoculação, e posterior imunomarcação com anticorpo específico.

Uma estratégia para tentar elucidar a interação entre proteínas virais p29 e CP com as mitocôndrias surgiu a partir da hipótese de que a mitocôndria é o possível local de replicação e de montagem das partículas de PepRSV. Assim, já está em andamento um projeto para identificar o local de replicação utilizando uma nova ferramenta de detecção de RNA fita dupla (anticorpo monoclonal), que marca a forma replicativa do vírus, e, paralelamente, a localização das proteínas de replicação do vírus, ORF1a (metiltransferase-helicase) e ORF1b (RdRp, *downstream* de região de *read-through* do códon de terminação) utilizando uma ferramenta, desenvolvida para este projeto, baseada na visualização de uma fluoro-proteína contendo um peptídeo sinal que direciona a proteína à mitocôndria. O peptídeo sinal escolhido foi o da ATP-sintase de *Arabidopsis thaliana* (GenBank D88376). O peptídeo sinal para mitocôndrias em plantas de *Nicotiana* ainda não foi identificado precisamente, mas o de *A. thaliana* foi identificado e foi demonstrado que é eficiente em

plantas de *Nicotiana* spp. e cebola (Arimura *et al.*, 2004). Assim sendo, esse peptídeo sinal foi selecionado para avaliar a viabilidade de endereçamento da fluoro-proteína às mitocôndrias.

Embora neste trabalho não tenha sido possível agregar conhecimento acerca da relação de PepRSV com as mitocôndrias, a identificação da localização subcelular da sua possível proteína de movimento (MP) é um dado muito relevante. Até agora, a função da proteína p29 era presumida apenas por similaridade das sequências com a MP de TRV (espécie-tipo do gênero tobrovírus), que é funcionalmente análoga à MP de TMV, usada como controle neste trabalho.

As imagens capturadas por microscópio confocal e a co-localização com a proteína de movimento de TMV é o primeiro registro experimental da provável função da p29 de PepRSV, embora ainda sejam necessários outros experimentos para a validação da função de p29, como por exemplo imunomarcagem da partícula viral intacta com anticorpos específicos para visualização em microscópio.

O uso de tobrovírus como vetor viral tem sido bem representado por TRV, amplamente empregado para indução de silenciamento gênico e expressão de proteínas. No entanto, este vírus não pode ser manipulado livremente no Brasil, o que torna evidente a necessidade do desenvolvimento do clone de cDNA infeccioso de PepRSV, possibilitando seu uso como vetor viral. Para a conclusão desta clonagem, uma nova estratégia está sendo executada, com o objetivo de substituir uma mutação não desejada, que resultou em um códon de terminação, na região 3' do RNA1 viral.

Embora apresentem vantagens (facilidade de manipulação de bactéria, não há necessidade de produção de transcritos...) quando comparados aos clones obtidos por transcrição *in vitro*, a produção de clones agroinfectivos exige mais passos de clonagem, e, conseqüentemente, aumentam as probabilidades de erros. Vários fatores podem limitar a atividade biológica dos vírus resultantes, dificultando a obtenção de clones agroinfectivos, como a instabilidade de clones de cDNA em bactérias, a inserção de nucleotídeos não virais nas extremidades 5' e 3', e a dificuldade em amplificar o genoma de alguns vírus em uma única fita de cDNA. Para contornar esses problemas,

existem algumas estratégias, as quais foram realizadas nesse trabalho, que podem ser adotadas para reduzir esses riscos, como a diminuição da temperatura de crescimento das bactérias (Liao, 1991), a adição de ribozima na extremidade 3' do genoma viral (Liu *et al.*, 2002) e a segmentação do genoma viral para posterior obtenção do RNA completo (Hamilton e Baulcombe, 1989; Perin e Hull, 1999; Cooper, 2014).

Ainda que PepRSV não apresente uma ampla gama de hospedeiros, este infecta com sucesso plantas de *N. benthamiana*, que são amplamente utilizadas em experimentos de agroinoculação pelo nosso grupo de pesquisa. Portanto, o desenvolvimento desse clone infeccioso é uma poderosa ferramenta que irá contribuir para as pesquisas relacionadas com a interação das partículas virais de PepRSV com a membrana mitocondrial, na identificação de proteínas cruciais na replicação, além de seu uso como VIGS, podendo ser utilizado na identificação de funções gênicas através do silenciamento de genes hospedeiros importantes na replicação viral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. J.; HEINZE, C.; JACKSON, A. O.; KREUZE, J. F.; MACFARLANE, S. A.; TORRANCE, L. (2012). In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, ed. by (King, A. M. Q.; Adams, M. J.; Carstens, E. B.; Lefkowitz, E. J., eds.), p. 1156–1162. Elsevier Academic Press.

AHLQUIST, P. & JANDA, M. (1984). cDNA cloning and *in vitro* transcription of the complete *Brome mosaic virus* genome. *Molecular and Cellular Biology*, v. 4, n. 12, p. 2876-2882.

AHLQUIST, P., FRENCH, R., JANDA, M., LOESCH-FRIES, S. (1984). Multicompotent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proceedings of National Academy of Sciences, United States of America*, v. 81, n. 210, p. 7066-7070.

AHLQUIST, P. (2006). Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, p. 371-382.

AL-ALLAF, F. A., TOLMACHOV, O. E., ZAMBETTI, L. P., TCHETCHELNITSKI, V., MEHMET, H. (2013). Remarkable stability of an instability prone lentiviral vector plasmid in *Escherichia coli* STBL3. *3 Biotech*, v. 3, n.1, p. 61-70.

ARIMURA, S.; YAMAMOTO, J.; AIDA, G. P.; NAKAZONO, M.; TSUTSUMI, N. (2004). Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, p. 7805–7808.

ATKINS, D., HULL, R., WELLS, B., ROBERTS, K., MOORE, P., BEACHY, R. N. (1991). The *Tobacco mosaic virus* 30 K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *Journal of General Virology*, v. 72, p. 209–211.

AVISAR, D., PROKHNEVSKY, A. I., DOLJA, V. V. (2008). Class VIII myosins are required for plasmodesmatal localization of a closterovirus Hsp70 homolog. *Journal of Virology*, 82:2836–2843.

BATISTA; A. R. S.; NICOLINI, C.; RODRIGUES, K. B.; MELO, F. L.; VASQUES, R. M.; MACÊDO, M. A.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T. (2014). Unique RNA 2 sequences of two Brazilian isolates of *Pepper ringspot virus*, a tobnavirus. *Virus Genes*, v. 48, n. 2. DOI: 10.1007/s11262-014-1066-8.

BERGH, S.T., KOZIEL, M.G., HUANG, S.C., THOMAS, R.A., GILLEY, D.P. AND SIEGEL, A. (1985). The nucleotide sequence of *Tobacco rattle virus* RNA-2 (CAM strain). *Nucleic Acids Research*, v. 13, p. 8507-18.

BEDOYA, L.C., e DARÒS, J.A. (2010). Stability of *Tobacco etch virus* infectious clones in plasmid vectors. *Virus Research*, v. 149, p. 234-240.

BOYER, J. C. e HAENNI, A. N. (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, v. 198, p. 415-426.

BRIERLEY, K. M., GOODMAN, B. A. & MAYO, M. A. (1993). A mobile element on a virus particle surface identified by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemical Journal*, v. 293, p. 657-659.

BRIGNETI, G., MARTIN-HERNANDEZ, A. M., JIN, H. L., CHEN, J., BAULCOMBE, D. C., BAKER, B., JONES, J. D. G. (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *The Plant Journal*, v. 39, p. 264-272.

BUCHER, E., SIJEN, T., HAAN, P., GOLDBACH, R., PRINS, M. (2003). Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology*, v. 77, n. 2, p. 1329-1336.

BUREAU, M., LEH, V., HAAS, M., GELDREICH, A., RYABOVA, L., YOT, P., KELLER, M. (2004). P6 protein of Cauliflower mosaic virus, a translation reinitiator, interacts with ribosomal protein L13 from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 3765-3775.

BURNELL, J. N. (1988). An enzymatic method for measuring the molecular weight exclusion limit of plasmodesmata of bundle sheath cells of C4 plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 39, p. 1575–1580.

CARETTE, J. E., VAN LENT, J., MACFARLANE, S. A., WELLINK, J. e VAN KAMMEN, A. (2002). *Cowpea mosaic virus* 32- and 60-kilodalton replication proteins target and change the morphology of endoplasmic reticulum membranes. *Journal of Virology*, v. 76, p. 6293–6301.

CITOVSKY, V., KNORR, D., SCHUSTER, G., ZAMBRYSKI, P. (1990). The p-30 movement protein of *Tobacco mosaic virus* is a single-strand nucleic-acid binding protein. *Cell*, v. 60, p. 637– 647.

CITOVSKY, V., WONG, M. L., SHAW, A. L., PRASAD, B. V. V., ZAMBRYSKI, P. (1992). Visualization and characterization of *Tobacco mosaic virus*

movement protein-binding to single-stranded nucleic-acids. *The Plant Cell*, v. 4, p. 397– 411.

CHAPMAN, S., KAVANAGH, T., BAULCOMBE, D. (1992). *Potato virus X* as a vector for gene expression in plants. *The Plant Journal*, v. 2, p. 549-557.

COOPER, B. (2014). Proof by synthesis of *Tobacco mosaic virus*. *Genome Biology*, v. 15:R67. DOI:10.1186/gb-2014-15-5-r67.

CROSSLIN, J. M.; THOMAS, P. E.; HAMMOND, R. W. (2003). Genetic variability of genomic RNA 2 of four tobacco rattle tobnavirus isolates from potato fields in the Northwestern United States *Virus Research*, v. 96, p. 99–105.

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

DEOM, C. M., SCHUBERT, K. R., WOLF, S., HOLT, C. A., LUCAS, W. J., BEACHY, R. N. (1990). Molecular characterization and biological function of the movement protein of *Tobacco mosaic virus* in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, United States of America*, v. 87, p. 3284-3288.

DARDICK, C. (2007). Comparative expression profiling of *Nicotiana benthamiana* leaves systemically infected with three fruit tree viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 20, p. 1004–1017.

DERRICK, P. M., BARKER, H., OPARKA, K. J. (1992). Increase in plasmodesmatal permeability during cell-to-cell spread of *Tobacco rattle virus* from individually inoculated cells. *The Plant Cell*, v. 4, p. 1405– 1412.

DING, B., HAUDENSHIELD, J. S., HULL, R. J., WOLF, S., BEACHY, R. N., 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*, v. 4, p. 915–928.

DUBREUIL, G., MAGLIANO, M., DUBRANA, M. P., LOZANO, J., LECOMTE, P., FAVERY, B., ABAD, P. E. ROSSO, M. N. (2009). *Tobacco rattle virus* mediates gene silencing in a plant parasitic root-knot nematode. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, p. 4041–4050.

DUSI, A. N. & CARVALHO, M. G. (1988). Purificação e imunogenicidade da proteína capsidial do vírus do mosaico comum do feijoeiro (VMCF). *Fitopatologia Brasileira*, v. 13, p. 252-255.

DZIANOTT, A. M., e BUJARSKI, J. J. (1989). Derivation of an infectious viral RNA by autolytic cleavage of *in vitro* transcribed viral cDNAs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 86, v.13, p. 4823-4827.

ESAU, K. (1979). *Beet yellow stunt virus* in cells of *Sonchus oleraceus* L. and its relation to host mitochondria. Virology, 98, 1-8.

ERWEE, M. G. e GOODWIN, P. B. (1985). Symplast domains in extrastelar tissues of *Egeria densa* Planch. Planta 163, 9–19.

FISHER, D. B., CASH-CLARK, C. E. (2000). Sieve tube unloading and post-phloem transport of fluorescent tracers and proteins injected into sieve tubes via severed aphid stylets. Plant Physiology. 123, 125– 137.

FU, D., ZHU, B., ZHU, H., JIANG W, LUO, Y. (2005). Virus-induced gene silencing in tomato fruit. The Plant Journal, v. 43, p. 299-308.

FUJIKI, M., KAWAKAMI, S., KIM, R. W. E BEACHY, R. N. (2006). Domains of *Tobacco mosaic virus* movement protein essential for its membrane association. Journal of General Virology, v. 87, p. 2699–2707.

FUJIKI, M., KACZMARCZYK, J. F., YUSIBOV, V., RABINDRAN, S. (2008). Development of a new *Cucumber mosaic virus*-based plant expression vector with truncated 3a movement protein. Virology, 381:136-142.

GASPAR, J. O., VEGA, J., CAMARGO, I. J. .B. e COSTA, A. S. (1984). An Ultrastructural-Study of particle distribution during microsporogenesis in tomato plants infected with the Brazilian *Tobacco rattle virus*. Canadian Journal of Botany, n. 62, p. 372-378.

GHAZALA, W., WALTERMANN, A., PILOT, R., WINTER, S. e VARRELMANN, M. (2008). Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of *Tobacco rattle virus*. Journal of General Virology, v. 89, p. 1748–1758.

GLEBA, Y., KLIMYUK, V., MARILLONNET, S. (2005). Magniffection - a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. Vaccine, v. 23, p. 2042-2048.

GOODWIN, P. B. (1983). Molecular size limit for movement in the symplast of the *Elodea* leaf. Planta, v. 157, p. 124–130.

GOPINATH, K., WELLINK, J., PORTA, C., TAYLOR, K. M., LOMONOSSOFF, G. P., VAN KAMMEN, A. (2000). Engineering *Cowpea mosaic virus* RNA-2 into a vector to express heterologous proteins in plants. *Virology*, v. 267, p.159-173.

HAMILTON, W. D. O.; BOCCARA, M.; ROBINSON, D. J. E BAULCOMBE, D. C. (1987). The complete nucleotide sequence of *Tobacco Rattle Virus* RNA-1. *Journal of General Virology*, v. 68, p. 2563-2575.

HAMILTON, W. D. O. e BAULCOMBE, D. C. (1989). Infectious RNA produced by *in vitro* transcription of a full-length *Tobacco rattle virus* RNA-I cDNA. *Journal of General Virology*, v. 70, p. 963-968.

HARRISON, B. D. (1973). *Pea early-browning virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses n. 120.

HARRISON, B. D. e ROBINSON, D. J. (1978). The tobnaviruses. *Advances in Virus Research*, v. 23, p. 25-77.

HARRISON, B. D. e ROBINSON, D. J. (1986). Tobnaviruses. In: *The Plant Viruses*, v. 2 (VAN REGENMORTEL, M.H.V. AND FRAENKEL-CONRAT, H., eds), p. 339–369. New York: Plenum Press.

HEINLEIN, M. (2008). Microtubules and viral movement. In: NICK, P. (ed) *Plant Microtubules Development and Flexibility*, 2nd ed. Springer, Berlin-Heidelberg, p. 141–173.

HERNÁNDEZ, C., CARETTE, J. E., BROWN, D. J. F. E BOL, J. F. (1996). Serial passage of tobacco rattle virus under different selection conditions results in deletion of structural and nonstructural genes in RNA2. *Journal of Virology*, v. 70, p. 4933–4940.

HERNÁNDEZ, C., VISSER, P. B., BROWN, D. J. F. & BOL, J. F. (1997). Transmission of *Tobacco rattle virus* isolate PpK20 by its nematode vector requires one of the two non-structural genes in the viral RNA 2. *Journal of General Virology*, v. 78, p. 465-467.

HULL, R. e PLASKITT, A. (1974). The *in vivo* behavior of *Broad bean wilt virus* and three of its strains. *Intervirology*, v. 2, p. 352-359.

ISHIBASHI, K., MIYASHITA, S., KATOH, E., ISHIKAWA, M. (2010). Host membrane proteins involved in the replication of tobamovirus RNA. *Current Opinion in Virology*, v. 2, p. 699-704.

JAUBERT, M.; BHATTACHARJEE, S.; MELLO, A. F. S.; PERRY, K. L. e MOFFETT, P. (2011). ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against *Potato virus X* in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v. 156, p. 1556–1564.

JONCZYK, M., PATHAK, K. B., SHARMA, M., NAGY, P. D. (2007) Exploiting alternative subcellular location for replication: tombusvirus replication switches to the endoplasmic reticulum in the absence of peroxisomes. *Virology*, v. 362, p. 320–330.

JUNQUEIRA, B. R. T., NICOLINI, C., LUCINDA, N., ORÍLIO, A. F., NAGATA, T. (2014). A simplified approach to construct infectious cDNA clones of a tobamovirus in a binary vector. *Journal of Virological Methods*, v. 198, p. 32–36.

KARIMI, M., DEPICKER, A., E PIERRE HILSON, P. (2007). Recombinational cloning with plant Gateway Vectors. *Plant Physiology*, v. 145, p. 1144–1154.

KAWAKAMI, S., WATANABE, Y., BEACHY, R.N. (2004). *Tobacco mosaic virus* infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, United States of America*, v. 101, p. 6291–6296.

KISELYOVA, O. I., YAMINSKY, I. V., KARGER, E. M., FROLOVA, O. Y., DOROKHOV, Y. I., ATABEKOV, J. G. (2001). Visualization by atomic force microscopy of *Tobacco mosaic virus* movement protein-RNA complexes formed in vitro. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 1503–1508.

KITAJIMA, E. W. AND COSTA, A. S. (1969). Association of *Pepper ringspot virus* (Brazilian *Tobacco rattle virus*) and Host Cell Mitochondria. *Journal of General Virology*, v. 4, p. 177-181.

KITAJIMA, E.W., OLIVEIRA, A. R. AND COSTA, A. S. (1969). Morfologia das partículas do vírus do anel do pimentão. *Bragantia*, v. 28, p. 1-22.

KITAJIMA, E.W. AND LOVISOLO, O. (1972). Mitochondrial aggregates in *Datura* leaf cells infected with *Henbane mosaic virus*. *Journal of General Virology*, v. 16, p. 265-271.

KOONIN, E. V. (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, v. 72, p. 2197-2206.

KOPEK, B. G., PERKINS, G., MILLER, D. J., ELLISMAN, M. H., AHLQUIST, P. (2007). Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biology*, v. 5, p. e220.

LAI, M. M. C. (2000). The make of infectious viral RNA: no size limit in sight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 10, p. 5025–5027.

LIAO, H. H. (1991). Effects of temperature on the expression of wild-type and thermostable mutants of kanamycin nucleotidyltransferase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, v. 2, p. 43-50.

LINDBO, J. A. (2007). TRBO: A High-Efficiency *Tobacco mosaic virus* RNA-Based overexpression vector. *Plant Physiology*, v. 145, n. 4, p. 1232-1240.

LIU, Y., SCHIFF, M., DINESH-KUMAR, S. P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal*, v. 31, p. 777-786.

LIU, Y., NAKAYAMA, N., SCHIFF, M., LITT, A., IRISH, V. F. E DINESH-KUMAR, S. P. (2004). Virus induced gene silencing of a *deficiens* ortholog in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology*, v. 54, n. 5, p. 701-711.

LU, R., MARTIN-HERNANDEZ, A. M., PEART, J. R., MALCUIT, I. E DAVID C. BAULCOMBE, D. C. (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, v. 30, p. 296–303.

LUCAS, W. J., LEE, J. Y. (2004). Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, p. 712–726.

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

MACFARLANE, S. A., BROWN, D. J. F. & BOL, J. F. (1995). The transmission by nematodes of tobnaviruses is not determined exclusively by the virus coat protein. *European Journal of Plant Pathology*, v. 101, p. 535-539.

MACFARLANE, S. A., WALLIS, C. V. & BROWN, D. J. F. (1996). Multiple virus genes involved in the nematode transmission of *Pea early browning virus*. *Virology*, v. 219, p. 417-422.

MACFARLANE, S. A. (1997). Natural recombination among plant virus genomes: evidence from tobnaviruses. *Seminars in Virology*, v. 8, p. 25–31.

MACFARLANE, S. A. (1999). Molecular biology of the tobnaviruses. *Journal of General Virology*, v. 80, p. 2799-280.

MACFARLANE, S. A. e POPOVICH, A. (2000). Efficient expression of foreign proteins in roots from tobnavirus vectors. *Virology*, v. 267, p. 29-35.

MARILLONNET, S., THOERINGER, C., KANDZIA, R., KLIMYUK, V., GLEBA, Y. (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology*, v. 23, n. 6, p. 718-723.

MCCARTNEY, A. W., GREENWOOD, J. S., FABIAN, M. R., WHITE, K. A., 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*, v. 17, p. 3513–3531.

MCGAVIN, W. J., MITCHELL, C., COCK, P. J. A., WRIGHT, K. M. e MACFARLANE, S. A. (2012). Raspberry leaf blotch virus, a putative new member of the genus Emaravirus, encodes a novel genomic RNA. *Journal of General Virology*, v. 93, p. 430–437.

MAYO, M. A., ROBERTSON, W. M., LEGORBURU, F. J. & BRIERLEY, K. M. (1994). Molecular approaches to an understanding of the transmission of plant viruses by nematodes. In: *Advances in Molecular Nematology* (LAMBERTI, F., GIORGI, C. & BIRD, D. M. - eds.). p. 277-293. New York: Plenum Press.

MCLEAN, B. G., ZUPAN, J., ZAMBRYSKI, P. C. (1995). *Tobacco mosaic virus* movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell*, v. 7, p. 2101–2114.

MELCHER, U. (2000). The '30K' superfamily of viral movement proteins. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 257–266.

MURAI, N. (2013). Review: plant binary vectors in Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* with a broad host-range replicon of pRK2, pRi, pSa, or pVS1. *American Journal of Plant Sciences*, v. 4, p. 932-939.

MUSHEGIAN, A. R. E KOONIN, E. V. (1993). Cell-to-cell movement of plant viruses: Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems, *Archives of Virology*, v. 133, p. 239-257.

MUSIYCHUK, K., STEPHENSON, N., BI, H., FARRANCE, C. E., OROZOVIC, G., BRODELIUS, M., BRODELIUS, P., HORSEY, A., UGULAVA, N., SHAMLOUL, A. M., METT, V., RABINDRAN, S., STREATFIELD, S. J., YUSIBOV, V. (2007). A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 1, p. 19-25.

NAGAMATSU, A., MASUTA, C., SENDA, M., MATSUURA, H., KASAI, A., HONG, J. S., KITAMURA, K, A. B. E. J, KANAZAWA, A. (2007). Functional

analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnology Journal*, v. 5, p. 778-790.

OPARKA, K. J., BOEVINK, P. e CRUZ, S. S. (1996). Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends in Plant Science*, v. 1, p. 412–418.

OPARKA, K. J., ROBERTS, A. G., BOEVINK, P., SANTA CRUZ, S., ROBERTS, L., PRADEL, K. S., IMLAU, A., KOTLIZKY, G., SAUER, N., EPEL, B. (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell*, v. 97, p. 743–754.

PADGETT, H. S., EPEL, B. L., KAHN, T. W., HEINLEIN, M., WATANABE, Y. & BEACHY, R. N. (1996). Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *The Plant Journal*, v. 10, p.1079–1088.

PERRIN, Y. & HULL, R. (1999). Original reverse transcription polymerase chain reaction method to obtain the full-length cDNA of *Rice tungro spherical virus*. *Journal of Virological Methods* v. 79, p. 161–168.

PLOEG, A. T., ROBINSON, D. J., and BROWN, D. J. F. (1993). RNA2 of tobacco rattle virus encodes the determinants of transmissibility by *Trichodorid* vector nematodes. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 1463–1466.

PYLE, A. M. (1993). Ribozymes- A distinct class of metalloenzymes. *Science*, v. 261, n. 5122, p. 709- 714.

PROKHNEVSKY, A. I., PEREMYSLOV, V. V., DOLJA, V. V. (2005). Actin cytoskeleton is involved in targeting of a viral Hsp70 homolog to the cell periphery. *Journal of Virology*, v. 79, p. 14421-14428.

RATCLIFF, F., MARTIN-HERNANDEZ, A. e BAULCOMBE, D. C. (2001). *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal*, v. 25, p. 237–245.

ROBINSON, D. J. & HARRISON, B. D. (1985). Unequal variation in the two genome parts of Tobraviruses and evidence for the existence of three separate viruses. *Journal of General Virology*, v. 66, p. 171-176.

ROBINSON, D. J. & HARRISON, B. D. (1989a). *Tobacco rattle virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses n. 346.

ROBINSON, D. J. & HARRISON, B. D. (1989b). *Pepper ringspot virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses n. 347.

ROBINSON, D. J. (2005). Genus Tobravirus. In: FAUQUET, C., MAYO, M. A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L. A. (eds). Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego, USA, p. 1015-1019.

RUSSO, M. e MARTELLI, G. P. (1981). The fine structure of *Cymbidium ringspot virus* in host tissues: II. Light and electron microscopy of localized infections Journal of Ultrastructure Research, v. 77, p. 105-118.

SANCHEZ-NAVARRO, J., MIGLINO, R., RAGOZZINO, A., BOL, J. F. (2001). Engineering of Alfalfa mosaic virus RNA 3 into an expression vector. Archives of Virology, v. 146, p. 923-939.

SATYANARAYANA, T., GOWDA, S., AYLLÓN, M. A., DAWSON, W. A. (2003). Frameshift mutations in infectious cDNA clones of *Citrus tristeza virus*: a strategy to minimize the toxicity of viral sequences to *Escherichia coli*. Virology, v. 313, p. 481–491.

SCHOELZ, J. E., HARRIES, P. A & NELSON, R. S. (2011). Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. Molecular Plant, v. 4, p. 813–831.

SENTHIL-KUMAR, M., HEMA, R., ANAND, A., KANG, L., UDAYAKUMAR, M. E MYSORE, K. S. (2007). A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other *Solanaceae* species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. New Phytologist, v. 176, p. 782–791.

STADEN, R. (1996). The Staden sequence analysis package. Molecular Biotechnology, v. 5, n. 3, p. 233-241.

SUDARSHANA, M. R.; PLESHA, M. A.; URATSU, S. L.; FALK, B. W.; DANDEKAR, A. M.; HUANG, T. K. & MCDONALD, K. A. (2006). A chemically inducible *Cucumber mosaic virus* amplicon system for expression of heterologous proteins in plant tissues. Plant Biotechnology Journal 4:551-9.

SUDARSHANA, M. R.; BERGER, P. H. (1998). Nucleotide sequence of both genomic RNAs of a North American *Tobacco rattle virus* isolate. Archives of Virology, v. 143, p. 1535–1544.

TALIANSKY, M., TORRANCE, L. & KALININA, N. O. (2008). Role of plant virus movement proteins. Methods in Molecular Biology, v. 451, p. 33–54.

TANZ, S. K., CASTLEDEN, I., SMALL, I. D., E MILLAR, A. H. (2013). Fluorescent protein aging as a tool to define the subcellular distribution of proteins in plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. 214, p. 1-9.

TAKABATAKE, R., ANDO, Y., SEO, S., KATOU, S., TSUDA, S., OHASHI, Y. e MITSUHARA, I. (2007). MAP kinases function downstream of HSP90 and upstream of mitochondria in TMV resistance gene N-mediated hypersensitive cell death. *Plant Cell Physiology*, v. 48, p. 498-510.

TAYLOR, C. E. & BROWN, D. J. F. (1997). *Nematode Vectors of Plant Viruses*. New York: CAB International.

TERRY, B. T. AND ROBARDS, A. W. (1987). Hydrodynamic radius alone governs the mobility of molecules through plasmodesmata. *Planta*, v. 171, p. 145–157.

THIÉBEAULD, O., POOGGIN, M. M., RYABOVA, L. A. (2007). Alternative translation strategies in plant viruses. *Plant Viruses*, v. 1, p. 1-20.

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

TUCKER, E. B. (1982). Translocation in the staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. I. study of cell ultrastructure and cell-to-cell passage of molecular probes. *Protoplasma*, v. 113, p. 193–201.

TURPEN, T.H., TURPEN, A.M., WEINZETTL, N., KUMAGAI, M.H., DAWSON, W.O. (1993). Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of *Tobacco mosaic virus*. *Journal of Virological Methods*, v. 42, p. 227-240.

VASSILAKOS, N.; VELLIOS, E. K.; BROWN, E. C.; BROWN, D. J. F. E MACFARLANE, S. A. (2001). Tobravirus 2b protein acts *in trans* to facilitate transmission by nematodes. *Virology*, v. 279, p. 478-487.

VISSER, P. B.; BROWN, D. J. F.; BREDERODE, F. T.; BOL, J. F. (1999). Nematode transmission of *Tobacco rattle virus* serves as a bottleneck to clear the virus population from defective interfering RNAs. *Virology*, v. 263, p. 155–165.

WEI, T., WANG. A. (2008). Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at the endoplasmic reticulum exit sites in a

COPI- and COPII-dependent manner. *Journal of Virology*, v. 82, p. 12252–12264.

WEI, T., HUANG, T-S, MCNEIL, J., LALIBERTE, J. F., HONG, J., NELSON, R. S. WANG, A. (2010). Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *Journal of Virology*, v. 84, p. 799–809.

WELSCH, S., MILLER, S., ROMERO-BREY, I., MERZ, A., BLECK, C. K., WALTHER, P., FULLER, S. D., ANTONY, C., KRIJNSE-LOCKER, J., BARTENSCHLAGER, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*, v. 5, p. 365–375.

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

ZACCOMER, B., HAENNI, A.L., MACAYA, G. (1995). The remarkable variety of plant virus RNA genomes. *Journal of General Virology*. v. 76, 231-247.

ZHANG, C. Q., BRADSHAW, J. D., WHITHAM, S. A., HILL, J. H. (2010). The development of an efficient multipurpose *Bean pod mottle virus* viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. *Plant Physiol.*, v. 153, p. 52-65.

YAMSHCHIKOV, V., MISHIN, V., COMINELLI, F. (2001). A new strategy to design (+) RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in *E. coli*. *Virology*, v. 281, p. 272-280.

YANG, C., GUO, R., JIE, F., NETTLETON, D., PENG, J., CARR, T., YEAKLEY, J. M., FAN, J. B. E WHITHAM, S. A. (2007). Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 20, n. 4, p. 358–370.

YANG, C., ZHANG, C., DITTMAN, J. D., WHITHAM, S. A. (2009). Differential requirement of ribosomal protein S6 by plant RNA viruses with different translation initiation strategies. *Virology*, v. 390, p. 163–173.

YU, C., KARLIN, D. G., LU, Y., WRIGHT, K., CHEN, J., MACFARLANE, S. (2013). Experimental and bioinformatic evidence that *Raspberry leaf blotch* emaravirus P4 is a movement protein of the 30K superfamily. *Journal of General Virology*, v. 94, p. 2117–2128.

ANEXO I – Artigo submetido (em análise)

Title: Subcellular localization of p29K, a putative movement protein of pepper ringspot virus

Authors: Kelly B. Rodrigues¹; Anelise F. Orílio¹; Rosana Blawid¹, Fernando L. Melo¹, Tatsuya Nagata¹.

Affiliation and address of the authors: ¹University of Brasília, Post-graduation course of Molecular Biology, Department of Cellular Biology, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, 70910-900, Brazil

Corresponding author: Tatsuya Nagata

E-mail: tatsuya@unb.br

Telephone: +55 61 31072980

ABSTRACT

Pepper ringspot virus (PepRSV) is a *Tobravirus* which possesses a bipartite single-strand RNA genome in positive sense. The p29 protein is encoded by RNA 1 and is presumed to be a movement protein (MP) of this virus. The intracellular distribution of p29 was analyzed by confocal microscopy. Transient expression of a p29 protein fused to green fluorescent protein was observed as punctate spots localized next to the cell wall. These spots partially co-localized with an eCFP-tagged tobacco mosaic virus 30K MP, which associates with plasmodesmata. This result suggests that the p29 protein is most probably a movement protein for PepRSV.

BRIEF REPORT

Pepper ringspot virus (PepRSV) is a member of the genus *Tobravirus* first reported in Brazil in 1969 [1]. The virus was originally isolated from a *Capsicum* spp. plant demonstrating ringspot symptoms on its leaves. The *Tobravirus* genus consists of three species, PepRSV, *Tobacco rattle virus* (TRV) and *Pea early-browning virus* (PEBV) [2-5]. PepRSV had been considered as a strain of TRV; however, the analysis of its genomic sequence revealed that it would be a virus distinct from TRV due to the low amino acid (aa) sequence identity in coat protein (CP) (70%) and unique untranslated regions (UTRs) of RNA 2 [6]. Tobraviruses have bipartite ssRNA genome in the positive sense. The RNA 1 genome segment of PepRSV has 6828 bases and encodes three open reading frames (ORFs) (accession number NC003669). The first ORF is a 136 kDa protein (small replicase subunit), which possesses methyltransferase and helicase domains, and a 195 kDa protein (large replicase subunit) by ribosome read-through containing the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domain. The ORF 2 is a putative movement protein (p29) as identified in TRV. Interestingly, p29 of TRV was also demonstrated to be involved in symptom induction [7] causing a disease called “spraing” in potato tubers, which was a hypersensitive reaction [8]. The ORF 3 (p16) is a putative PTGS (post-transcriptional gene silencing) suppressor protein [9] as well as multifunctional p29 [10].

The RNA 2 segment is 1799 bases long and encodes solely the coat protein (CP) gene (NC003670). However, the RNA 2 of TRV and PEBV generally encodes one or two nonstructural proteins (2b and 2c) besides CP [11–14], which are involved in nematode transmission [12, 15-18].

To successfully establish an infection in susceptible hosts, plant viruses possess one or more movement proteins (MPs), which are essential for intercellular virus movement and subsequent systemic spread. Virus-encoded MPs associate with the plant's endoplasmic reticulum (ER) and plasma membranes, and thereafter MPs localized to and modify plasmodesmata (PD) to increase the size exclusion limit (SEL) for passage of viral genome through PD [19-23]. Only molecules less than approximately 1 kD can move passively between cells via PD [24], however the virus particles and genomes are much larger than this size.

For plant viruses with RNA genomes, there are mainly two different types of MPs: the first type MPs alter the SEL of PD and enable the intercellular passage of a ribonucleoprotein complex as reported the MP of *Tobacco mosaic virus* (TMV) [19, 25-30]. The second type MPs form tubular structures as the MP of *Cowpea mosaic virus*. The virions traverse through tubular structures associated with PD to neighboring cells [31-34]. There are several structural classes of plant virus MPs and one of the largest groups is the 30K MP superfamily whose members are structurally related to the TMV 30K MP [35-38]. The TMV 30K MP is known to localize to PD [39]. Within tobnaviruses, the TRV p29 protein was demonstrated to be homologous to the TMV 30K MP [36, 40, 41] and both proteins had effect to increase the SEL of PD for viral genome movement [19, 42].

Aiming to identify amino acid sequence similarity, multiple sequence alignment of putative MPs from three tobnavirus was performed using Clustal W program (www.ebi.ac.uk). p29-PepRSV (NC003669) shares 67 % of aa identity with 30K-PEBV (NC002036) and 60 % with 29 kDa protein of TRV (GQ903771). Then, the aa sequences of putative tobnavirus MPs were further aligned with TMV 30K MP using T-Coffee algorithm to analyze the protein primary and secondary structures [43]. Some aa

sequences were highly conserved among them (Fig. 1, red boxes). The moderately conserved sequences (Fig. 1, blue boxes) were also seen through the MPs showing higher similarities (by aa change within the same aa class) [44-47]. The 30K Superfamily MP possesses two hydrophobic regions forming α -helix (aa 61–80 and 148-167, Fig. 1, underlined). These two hydrophobic regions were possible transmembrane domains and flanking a hydrophilic region, which may form loop in lumen of organelle (TMV 30K MP was shown to be associated with endoplasmic reticulum membrane [44, 47]).

Using Delta G Prediction Server [48], one of this α -helix was found in PepRSV p29 with a high probability and this region was detected at the same position of TMV 30K MP (Fig. 1, Supplementary Fig. 1). However, the second α -helix of PepRSV MP showed lower probability (Supplementary Fig. 1, arrow) due to amino acid change at aa 167 (R167D).

To characterize whether the PepRSV p29 protein has a homologous function as MP, the PepRSV *p29* gene was cloned into binary vectors as a fusion fluorescent protein and the subcellular location of this protein was observed by confocal microscopy. The previously characterized TMV 30K protein was used as a control.

Pepper ringspot virus (CAM isolate) [1, 6] was maintained in *Nicotiana benthamiana* plants by mechanical inoculation. Plants, 5-6 weeks old, were used for agro-infiltration assays. Total RNA was extracted from *N. benthamiana* infected leaves using a Plant RNA reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

The complementary DNA (cDNA) of *p29* gene was synthesized from total RNA using PepRSV-p29 Rev primer (5'- TTT TTT CTT TAT GCT TGC CGC T -3'). Reverse transcription was performed using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen), according to manufacturer's instructions, adjusting the reaction temperature to 52 °C. PCR was performed using the primer pair of PepRSV-p29 For (5'- AACAA ATG GAG AAC GAT AAG TCG TTA GT -3') and PepRSV-p29 Rev using Vent DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

The cDNA fragments of PepRSV *p29* gene with the expected size (768 bp) was amplified by PCR and gel-purified using the Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Little Chalfond, UK). These blunt-ended fragments were phosphorylated using T4 Polynucleotide kinase (New England Biolabs, NEB) and ligated to pENTR 2B vector (Invitrogen) which was prepared by PCR (forward primer 5'- GAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA -3' and reverse 5'- AGC CTG CTT TTT TGT ACA AAG T -3') with Vent DNA polymerase. *Escherichia coli*, DH5 α strain were transformed with this construct by electroporation. Four clones were selected and sequenced at MacroGen Inc. (Seoul, South Korea). The correct clone was recombined with the binary vector pK7FWG2,0 (Plant Systems Biology, Belgium) using LR clonase of Gateway technology (Invitrogen), and transferred to *E. coli*, DH5 α strain. Recombinant binary vectors, selected following sequencing, were used to transform *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain by electroporation to obtain a pK7-p29-*egfp* construction. The expression of p29-eGFP was further confirmed by Western blotting using an anti-p29 antibody (kindly provided by Dr. José Osmar Gaspar, IBERCE, Universidade Estadual Paulista, SP, Brazil). As a control, a pK7FWG2,0 vector, without the CmR-*ccdB* region, was prepared. The vector contains attR1-CmR-*ccdB*-attR2 recombinant site upstream of *egfp* gene. The eGFP-expression control vector was prepared with

pK7FWG2,0 as backbone by PCR removing this recombinant region using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific) (primer set: pK7FW-*ccdB* For, 5'-CTG CAG GTC GAC TAG AAT AGT AAA -3' and pK7FW-*ccdB* Rev, 5'-AAC AAT GGT GAG CAA GGG CGA G -3'). The PCR products were self-ligated, which resulted in the pK7FWG2 Δ CmR-*ccdB* construct.

To compare the intracellular localization of p29 of PepRSV with well-characterized MP, the 30K MP gene of TMV was PCR-amplified from the plasmid pCBNoAx_MPTMV-GFP [49]. This was fused to the N-terminal region of a cyan fluorescent protein (CFP) gene (Clontech, Mountain View, CA, USA) in a pMDC32 vector containing a 35S promoter and NOS terminator [50], and resulted in a pMDC-MPTMV-*ecfp* construct.

Agro-infiltration of transformed *A. tumefaciens* with clones pK7-p29-*egfp*, pK7FWG2 Δ CmR-*ccdB* and pMDC-MPTMV-*ecfp* were performed as described previously [51]. *N. benthamiana* leaves were syringe (without needle) infiltrated with *A. tumefaciens* of 1.0 OD₆₀₀. Co-inoculation assays were made with bacterial suspensions mixed in a 1:1 ratio of 1.0 OD₆₀₀. Detached leaves were examined using a Leica TCS-SP5 confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The eGFP was excited at 488 nm, and the emitted light was captured at 525 nm, whereas eCFP was excited at 420 nm, and the emission was captured at 480 nm.

To evaluate the intracellular localization of p29, the fluorescent signals were observed at 2 days post-infiltration (p.i.) by confocal laser-scanning microscopy. The first result showed the subcellular distribution of p29-eGFP fluorescence as punctate spots next to the cell wall (Fig. 2a). The spots, a pair of similar-sized signals across the cell wall, appeared to accumulate along the PD on both sides of the cell wall (Fig. 2b).

This result suggested that p29 associated with PD much like other viral MPs that showed similar intracellular distribution [47, 52-54]. Therefore, p29 protein is most likely involved in the cell-to-cell movement of PepRSV. As expected, fluorescence of eGFP only showed a dispersed localization in the cytoplasm and also in the nucleus (Fig. 2c).

In order to compare the intracellular localization of p29 with well-known MP, a co-inoculation assay of p29 of PepRSV and 30K MP of TMV was performed. PepRSV and TMV both belong to the *Virgaviridae* virus family; hence, the characteristics of p29 of PepRSV and the 30K MP of TMV were expected to be similar. For this reason, agro-infiltration with equivalent amounts of agrobacteria of both constructs was performed in *N. benthamiana* plants. Fluorescent signals of each construct can be seen distinctly, with respective channels (p29-eGFP and MPTMV-eCFP), and micrographs were overlaid with bright-field images (Fig. 2d and e). Merged images of p29-eGFP and MPTMV-eCFP showed yellowish punctate spots (the blue fluorescence of eCFP was digitally altered to red color for better visualization of merged images) (Fig. 2f). Interestingly, although several signals of p29-eGFP and MPTMV-eCFP were co-localized (Fig 2f, arrows), but many were not. This indicates that these proteins possess similar features as MPs, however, not thoroughly.

There is a lack of information regarding PepRSV since there have been no reports in recent years. Although the complete genome sequence of this virus species was reported in 80's [55], the interaction between PepRSV and host plants remained unknown. In this work, we examined the subcellular localization of p29K protein of PepRSV in order to define a putative function of this protein as an MP. The results show that p29 associates with PDs much like the 30K MP of TMV, which strongly indicates that it works as a movement protein of this virus. To our knowledge, this work

is the first to offer an intracellular view of the tobnavirus p29 protein which shows the association with PDs. However, additional research is necessary to further determine the characteristics and functions of p29 in the virus infection process.

Acknowledgements

The first author was supported with a scholarship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and this work was financially supported by CNPq (Grant No. 473241/2009-9). We thank Dr. Valerian V. Peremyslov (Oregon State University) for providing the plasmids pCBNoAx, MPTMV-GFP and pMDC32. We also thank Miguel de Souza Andrade for figure design.

References

1. Kitajima EW, Oliveira AR, Costa AS (1969) Morfologia das partículas do vírus do anel do pimentão. *Bragantia* 28: 1-22
2. Harrison BD (1973) Pea early-browning virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses no. 120
3. Robinson DJ, Harrison BD (1989a) Tobacco rattle virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses no. 346
4. Robinson DJ, Harrison BD (1989b) Pepper ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses no. 347
5. Adams MJ, Heinze C, Jackson AO, Kreuze JF, Macfarlane SA, Torrance L (2005) Family Virgaviridae. In: King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB (eds) *Virus Taxonomy*, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/ Academic Press. San Diego, USA, pp 1139- 1162
6. Bergh ST, Koziel MG, Huang SC, Thomas RA, Gilley DP, Siegel A (1985) The nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-2 (CAM strain). *Nucleic Acids Res* 13:8507-8518
7. Ziegler-Graff V, Guilford PJ, Baulcombe DC (1991) Tobacco rattle virus RNA-1 29K gene product potentiates viral movement and also affects symptom induction in tobacco. *Virology* 182:145-55
8. Ghazala W, Varrelman M (2007) Tobacco rattle virus 29K movement protein is the elicitor of extreme and hypersensitive-like resistance in two cultivars of *Solanum tuberosum*. *Mol Plant Microbe Int* 20:1396–1405
9. Ghazala W, Waltermann A, Pilot R, Winter S, Varrelmann M (2008) Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of *Tobacco rattle virus*. *J Gen Virol* 89:1748-1758
10. Deng X, Kelloniemi J, Haikonen T, Vuorinen AL, Elomaa P, Teeri, TH and Valkonen JPT (2013) Modification of *Tobacco rattle virus* RNA1 to Serve as a VIGS Vector Reveals That the 29K Movement Protein Is an RNA Silencing Suppressor of the Virus. *Mol Plant Microbe Int* 26:503–514
11. MacFarlane SA, Wallis CV, Brown DJF (1996) Multiple virus genes involved in the nematode transmission of *Pea early browning virus*. *Virology* 219:417-422
12. Ploeg AT, Robinson DJ, Brown DJF (1993) RNA2 of tobacco rattle virus encodes the determinants of transmissibility by *Trichodorid* vector nematodes. *J Gen Virol* 74:1463–1466
13. Vassilakos EK, Vellios EC, Brown DJF, MacFarlane SA (2001) Tobravirus 2b protein acts in trans to facilitate transmission by nematodes. *Virology* 279:478–487
14. Vellios E, Brown DJF, MacFarlane SA (2002) Substitution of a single amino acid in the 2b protein of Pea early-browning virus affects nematode transmission. *J Gen Virol* 83:1771–1775
15. MacFarlane SA (1999) Molecular biology of the tobnaviruses. *J Gen Virol* 80:2799-2807

16. Hernández C, Visser PB, Brown DJF, BOL JF (1997) Transmission of *Tobacco rattle virus* isolate PpK20 by its nematode vector requires one of the two non-structural genes in the viral RNA 2. *J Gen Virol* 78:465-467
17. MacFarlane SA, Brown DJF (1995) Sequence comparison of RNA2 of nematode-transmissible and nematode-non-transmissible isolates of pea early-browning virus suggests that the gene encoding the 29 kDa protein may be involved in nematode transmission. *J Gen Virol* 76:1299-1304
18. Valentine T, Shaw J, Blok VC, Phillips MS, Oparka KJ, Lacomme C (2004) Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified *Tobacco rattle virus* vector. *Plant Physiol* 136:3999-4009
19. Wolf S, Deom CM, Beachy RN, Lucas WJ (1989) Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246:377-379
20. Atkins D, Hull R, Wells B, Roberts K, Moore P, Beachy RN (1991) The Tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *J Gen Virol* 72:209-211
21. Ding B, Haudenshield JS, Hull RJ, Wolf S, Beachy RN, Lucas WJ (1992) Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 4:915-928
22. Taliansky M, Torrance L, Kalinina NO (2008) Role of plant virus movement proteins. *Methods Mol Biol* 451:33-54
23. Schoelz JE, Harries PA, Nelson RS (2011) Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol Plant* 4:813-831
24. Robards AW, Lucas WJ (1990) Plasmodesmata. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol* 41:369-419
25. Tomenius K, Clapham D, Meshi T (1987) Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* 160:363-371
26. Deom CM, Schubert KR, Wolf S, Holt CA, Lucas WJ, Beachy RN (1990) Molecular characterization and biological function of the movement protein of tobacco mosaic virus in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3284-3288
27. Citovsky V, Wong ML, Shaw AL, Prasad BVV, Zambryski P (1992) Visualization and characterization of tobacco mosaic-virus movement protein-binding to single-stranded nucleic-acids. *Plant Cell* 4:397-411.
28. Heinlein M, Epel BL, Padgett HS, Beachy RN (1995) Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* 270:1983-1985
29. McLean BG, Zupan J, Zambryski PC (1995) Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* 7:2101-2114
30. Kawakami S, Watanabe Y, Beachy RN (2004) Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6291-6296

31. Wellink J, Vankammen A (1989) Cell-to-cell transport of cowpea mosaic virus requires both the 58K/48K proteins and the capsid proteins. *J Gen Virol* 70:2279–2286
32. Van Lent J, Wellink J, Goldbach R (1990) Evidence for the involvement of the 58K and 48K proteins in the intercellular movement of cowpea mosaic virus. *J Gen Virol* 71:219– 223
33. 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
34. Lucas WJ (2006) Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344:169–184
35. Mushegian AR, Koonin EV (1993) Cell-to-cell movement of plant viruses. Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. *Arch Virol* 133:239–257
36. Melcher U (2000) The ‘30K’ superfamily of viral movement proteins. *J Gen Virol* 81:257–266
37. Citovsky V, Knorr D, Schuster G, Zambryski P (1990) The p-30 movement protein of tobacco mosaic-virus is a single-strand nucleic-acid binding protein. *Cell* 60:637– 647.
38. Kiselyova OI, Yaminsky IV, Karger, EM, Frolova, OY, Dorokhov YI, Atabekov, JG. (2001) Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein-RNA complexes formed in vitro. *J Gen Virol* 82:1503–1508
39. Heinlein M (2008) Microtubules and viral movement. In: Nick P (ed) *Plant Microtubules Development and Flexibility*, 2nd edn. Springer, Berlin-Heidelberg, pp. 141–173.
40. Boccara M, Hamilton WDO, Baulcombe DC (1986) The organization and intervirial homologies of genes at the 3’ end of tobacco rattle virus RNA-1 - *EMBO J* 5:223-229
41. Deom CM, Oliver M J, Beachy RN (1987) The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* 237:389-394
42. Derrick PM, Barker H, Oparka KJ (1992) Increase in plasmodesmatal permeability during cell-to-cell spread of tobacco rattle virus from individually inoculated cells. *Plant Cell* 4:1405–1412
43. Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biolol* 302:205-217
44. Brill LM, Nunn RS, Kahn TW, Yeager M, Beachy RN (2000) Recombinant tobacco mosaic virus movement protein is an RNA-binding, α -helical membrane protein. *PNAS*. 97:7112–7117
45. Mushegian A R & Koonin EV (1993) Cell-to-cell movement of plant viruses. Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. *Arch Virol* 133:239–257
46. Melcher U (2000) The ‘30K’ superfamily of viral movement proteins. *J Gen Virol* 81:257–266

47. Yu C, Karlin DG, Lu Y, Wright K, Chen J, MacFarlane SA (2013). Experimental and bioinformatic evidence that *Raspberry leaf blotch* emaravirus P4 is a movement protein of the 30K superfamily. *J Gen Virol* 94: 2117–2128
48. Hessa T, Meindl-Beinker NM, Bernsel A, Kim H, Sato Y, Lerch-Bader M, Nilsson I, White SH, von Heijne G. (2007) Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. *Nature* 450, p. 1026-30
49. Prokhnevsky AI, Peremyslov VV, Dolja VV (2005) Actin cytoskeleton is involved in targeting of a viral Hsp70 homolog to the cell periphery. *Journal of Virology* 79:14421-14428
50. Avisar D, Prokhnevsky AI, Dolja VV (2008) Class VIII Myosins Are Required for Plasmodesmatal Localization of a Closterovirus Hsp70 Homolog. *J Virol* 82:2836–2843
51. Bucher E, Sijen T, Haan P, Goldbach R, Prins M (2003) Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J Virol* 77:1329-1336
52. Oparka KJ, Boevink P, Cruz SS (1996) Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends Plant Sci* 1:412–418
53. Padgett HS, Epel B L, Kahn TW, Heinlein M, Watanabe Y, Beachy RN (1996) Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J* 10:1079–1088
54. McGavin WJ, Mitchell C, Cock PJA, Wright KM, MacFarlane SA (2012) Raspberry leaf blotch virus, a putative new member of the genus Emaravirus, encodes a novel genomic RNA. *J Gen Virol* 93:430–437
55. Bergh ST, Siegel A (1989) Intraviral homology and subgenomic RNAs of pepper ringspot virus. *Virology* 168:339–343

Figure caption

Fig. 1 Comparison of tobnavirus putative MPs with the TMV MP. Alignment was performed using T-Coffee algorithm. Highly and moderately conserved amino acid sequences are shown in red and blue boxes, respectively. The underlined regions represent the predicted TMV MP α -helix. TMV = TMV 30K MP, p29 = PepRSV p29 MP; 30K = PEBV 30K MP and 29K = TRV p29 MP

Fig. 2 Subcellular localization of transiently expressed p29-eGFP and MPTMV-eCFP in *N. benthamiana* leaves. (a) The signals of p29 protein of PepRSV fused to eGFP were seen as punctate spots in cell wall. The micrograph was overlaid on the bright-field image, scale bar = 10 μ m. In panel (b), detailed localization of p29-eGFP across the cell wall, with a pair of fluorescent signals of similar size, scale bar = 5 μ m. Panel (c) shows distribution pattern of control expressing eGFP only in cytoplasm and nucleus, merged with bright field, scale bar = 50 μ m. The co-expression of p29-pK7-eGFP and TMVMP-eCFP, visualizing specifically eGFP channel (d) and eCFP (e) (color changed digitally to red fluorescence). Both images were overlaid on the bright-field image. (f) Merged image of panel (d) and (e). A co-localization of p29-eGFP and MPTMV-eCFP (color changed digitally to red fluorescence), was observed (arrows) by yellow punctuates (Scale bars = 25 μ m to panels d, e and f)

Supplementary Fig. 1 Prediction of delta G for transmembrane helix insertion using Delta G prediction Server. In (a) TMV 30K sequence showing two predicted α -helix, and in b) PepRSV MP sequence showing one α -helix with high score, and the second another with relatively low score (arrow). “L” represents the aa length for scanning of Delta G value. Graphic lines in colors blue, pink, green, yellow and grey represent scanning length of 19, 20, 21, 22 and 23 aa, respectively.

Figure 1

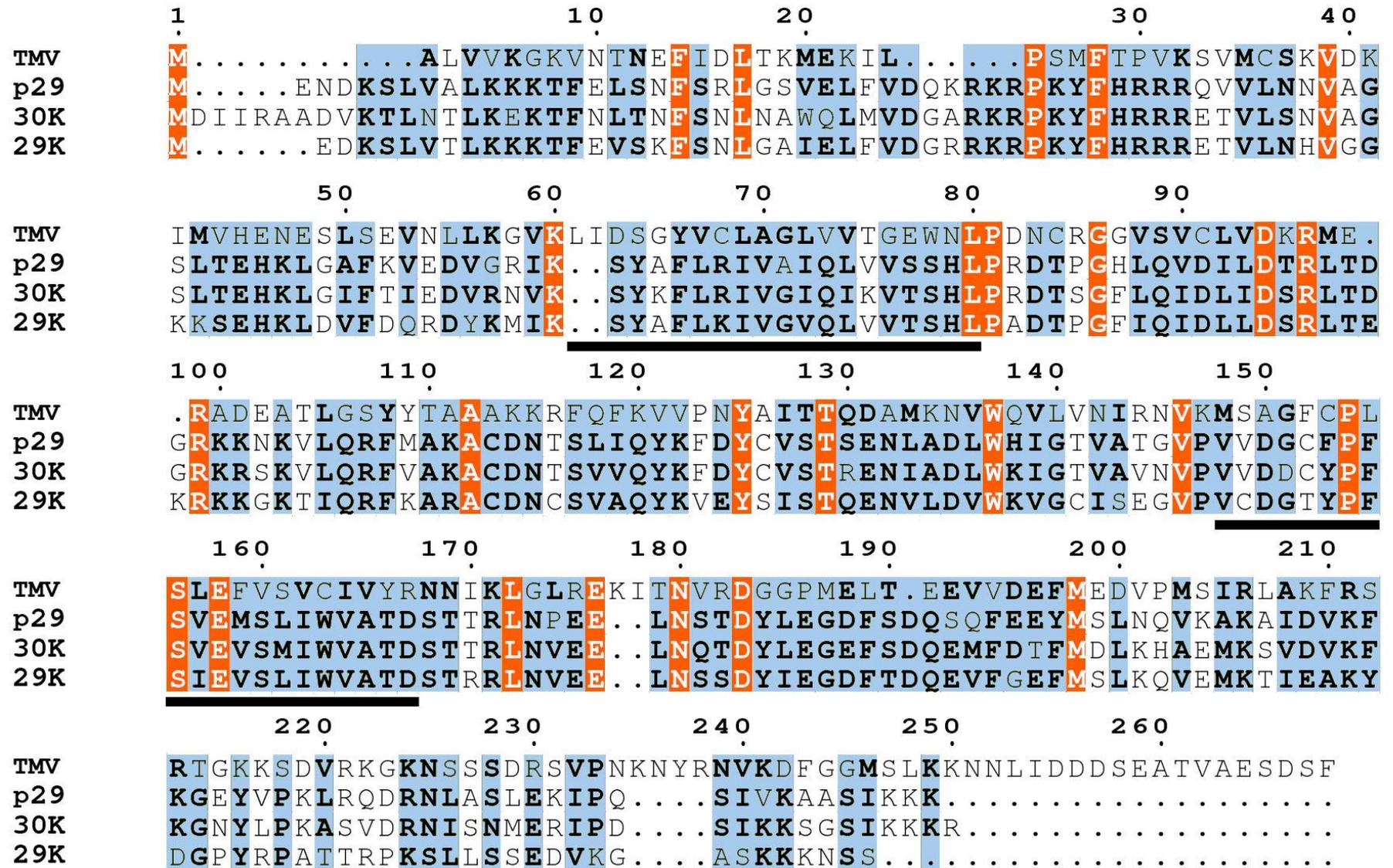
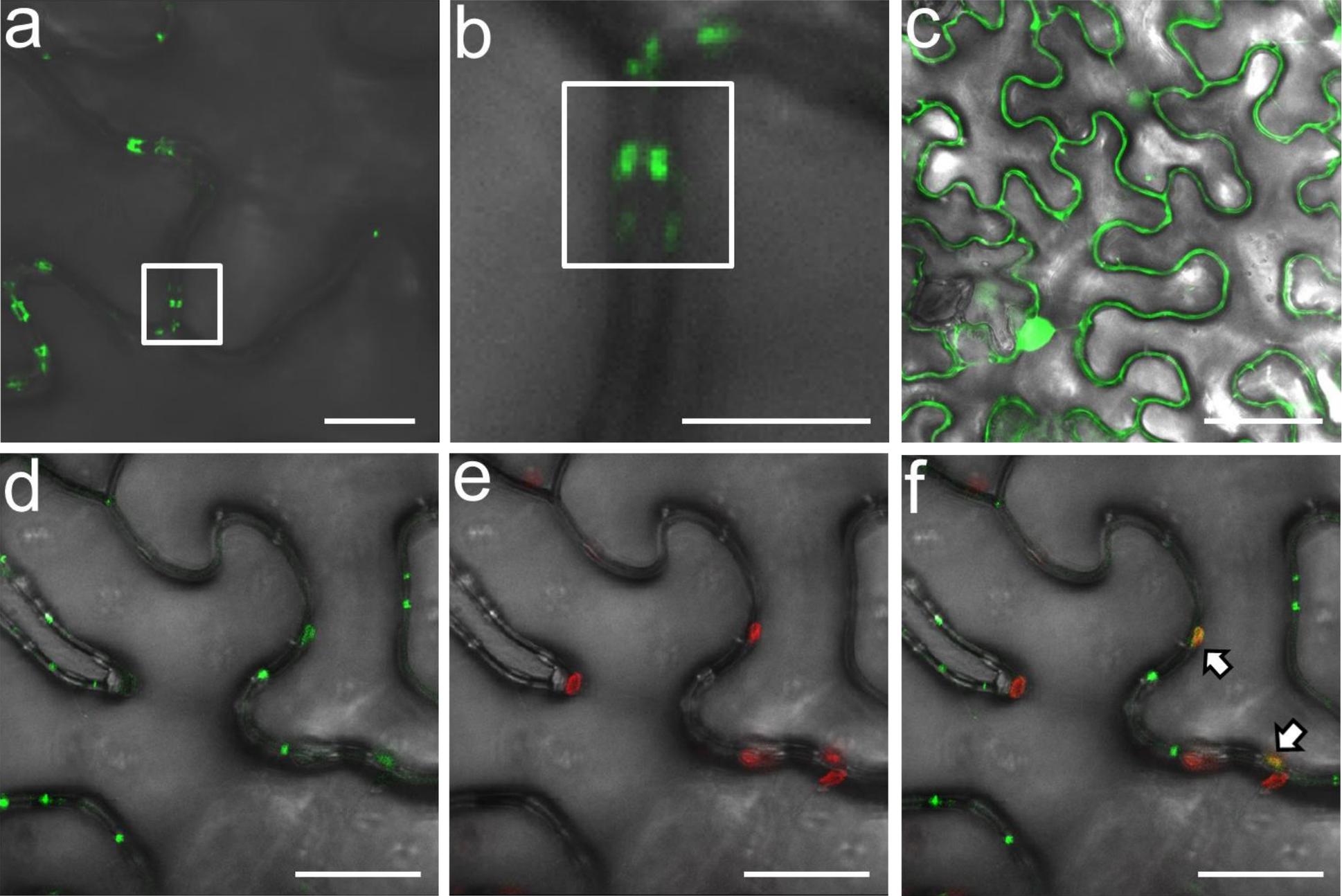


Figure 2



Supplementary S1

