



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Pós-graduação em Biologia Molecular

Desenvolvimento de um Sistema de Genética Reversa para Tospovírus via Moléculas de RNA Defectivo-Interferente (DI- RNA)

André Gustavo Machado Bertran

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Renato de Oliveira Resende

Co-orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Brasília, 2012



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Pós-graduação em Biologia Molecular

Desenvolvimento de um Sistema de Genética Reversa para Tospovírus via Moléculas de RNA Defectivo-Interferente (DI- RNA)

André Gustavo Machado Bertran

Dissertação aprovada por:

Dr. Renato de Oliveira Resende (Orientador)

Dra. Alice Kazuko-Inoue Nagata (Embrapa-CNPH)

Dr. Francisco Aragão (Embrapa - Cenargen)

Brasília, 2012

Aos meus pais,

Miriam Machado Zitz e

Paulo Bertran Wirth Chaibub,

pelos bons (e maus) genes herdados...

ÍNDICE

Resumo.....	Pág. 1
Abstract.....	Pág. 2
Introdução.....	Pág. 3
Capítulo 1 - Sistemas de Genética Reversa e Partículas Defectivas-Interferentes: Estado da Arte.....	Pág. 6
Objetivos e Hipóteses Científicas.....	Pág. 28
Capítulo 2 - Caracterização Molecular da RNA Polimerase RNA Dependente de <i>Tomato chlorotic spot virus</i> (<i>Bunyaviridae</i> , <i>Tospovirus</i>).....	Pág. 29
Capítulo 3 - Desenvolvimento de um Sistema de Genética Reversa de <i>Tospovirus</i> via Moléculas de RNA Defectivo-Interferente (DI RNA).....	Pág. 43
Conclusão.....	Pág. 66
Bibliografia.....	Pág. 68
Agradecimentos.....	Pág. 86

RESUMO

O gênero *Tospovirus* agrupa importantes vírus vegetais pertencentes à família *Bunyaviridae*. Estes são vírus de ssRNA(-) com genoma tripartido para o qual ainda não existe um sistema de estudo baseado em genética reversa. A genética reversa é uma ferramenta investigativa com aplicações importantes para o estudo da expressão gênica, evolução e interação vírus-hospedeiro através da manipulação do RNA viral por meio de seu DNA complementar (cDNA). O desenvolvimento de sistemas de genética reversa para vírus vegetais de ssRNA(-), no entanto, ainda precisa superar barreiras técnicas relativas à manutenção e cultivo de células vegetais e produção e transfecção de clones infecciosos, em contraste aos estudos desenvolvidos para vírus animais. O capítulo 1 discorre sobre sistemas de genética reversa e o conhecimento e aplicação dos RNAs defectivos-interferentes virais (DIs), enfatizando o estado da arte, em especial sob a perspectiva dos tospovírus. No capítulo 2, a busca por novos DIs a partir de um isolado brasileiro de tospovírus levou à publicação da sequência completa e caracterização molecular do RNA L de *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV). Estudos de evolução molecular utilizando a proteína L como critério taxonômico indicam melhor poder de resolução e maior confiabilidade na descrição da evolução do gênero *Tospovirus* em comparação a filogenia baseada na proteína N. Portanto, o L RNA poderia ser usado como critério alternativo e/ou complementar ao gene N na taxonomia de tospovirus. O capítulo 3 apresenta os resultados preliminares do desenvolvimento de uma estratégia alternativa a construção de clones infecciosos para tospovírus baseada no estudo das propriedades replicativas e de expressão de mini-genomas derivados de RNAs defectivos-interferentes transcritos *in planta* pela expressão transiente da enzima T7 RNA Polimerase e incorporados ao ciclo de replicação de um vírus auxiliar livre de DIs, avaliados por Northern Blotting. Os resultados iniciais parecem demonstrar que esta estratégia é promissora, pois foi possível detectar transcrição de DIs *in planta* pelo sistema T7 Polimerase. No entanto, a estratégia deve ser otimizada para seu emprego com ferramenta para o estudo de genética reversa no gênero *Tospovirus*.

ABSTRACT

The genus *Tospovirus* comprises important plant pathogens belonging to the *Bunyaviridae* family of tripartite ssRNA(-) genome viruses for which a reverse genetics system is still unavailable. Reverse genetics is an important methodological tool for the study of gene expression, evolution and host-virus interactions based on the ability of manipulating viral RNA genomes through its DNA counterparts (cDNA). Though significant progress has been achieved for animal-infecting viruses, the same is not true to plant viruses since important technical barriers have not yet been overcome, such as the *in vitro* maintenance and growth of plant cells and the transfection efficiency of infectious clones. In chapter 1 a review of the acquired knowledge and state of the art of reverse genetics and defective-interfering RNAs/particles with further insight into the *Tospovirus* genus is presented. Chapter 2 describes how the search for new defective-interfering (DI) RNAs resulted in the publication of the complete sequence and molecular characterization of the L RNA of *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV). In this chapter, the molecular evolution analysis of the *Tospovirus* genus based on L protein phylogeny is shown to provide higher resolution and confidence values for the evolutionary history of the *Tospovirus*, rather than N protein based analysis. Therefore, the L gene could be used as an alternative and/or additional parameter in the taxonomy of the *Tospovirus* genus. Chapter 3 presents the preliminary results on the development of a reverse genetics systems for the tospoviruses based not on the construction of infectious cDNA clones, but on the replication and expression of DI-derived mini-genomes via *in planta* T7 RNA Polymerase-dependent transcription and helper virus infectious cycle incorporation. The preliminary results showed that the T7 polymerase system was able to transcribe DI molecules. However, the strategy needs to be optimized to be employed as a tool for studying reverse genetics in the *Tospovirus* genus

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e otimização de técnicas hoje rotineiras em um laboratório de biologia molecular, como a tecnologia do DNA recombinante (Cohen *et al.*, 1973), a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki *et al.*, 1985), assim como o sequenciamento de DNA baseado em dideoxynucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977) e, mais recentemente, o sequenciamento em massa de genomas completos (Mardis, 2008) e o silenciamento gênico por indução da maquinaria de RNA de interferência (RNAi) (Fire *et al.*, 1998) levaram a uma mudança de paradigma nos métodos investigativos da Biologia Molecular ao permitir aos pesquisadores manipular sequências de DNA de um organismo de interesse e verificar o fenótipo resultante de suas manipulações – um método investigativo denominado Genética Reversa.

Em contraposição, o *modus operandi* da Biologia durante os primeiros três quartos do século XX e no século anterior, desde o nascimento da Genética como ciência, foi marcado pela busca de fenótipos distintos de um tipo “padrão” (tipo-selvagem), as chamadas “variantes”, com o intuito de compreender as bases genéticas que motivam tais fenótipos.

Existem inúmeros exemplos bem sucedidos de uso da genética reversa para organismos dos mais variados e também para vírus de relevância epidemiológica, cujo cultivo *in vitro* das células hospedeiras é possível (em especial, vírus que infectam seres humanos), no entanto, a afirmativa não é verdadeira para a grande maioria dos vírus vegetais, pois pelo menos três barreiras técnicas ainda não foram transpostas: i) não existem, ainda, sistemas eficientes de cultivo *in vitro* de linhagens celulares vegetais, a não ser para uma espécie-modelo (*e.g.* a linhagem BY2 de *Nicotiana tabacum* (Nagata *et al.*, 1992)); ii) Possivelmente todos os vírus vegetais co-evoluíram com outros organismos que atuam como seus vetores de transmissão (nematoides e insetos, principalmente) (Gray, 1996; Power, 2000; Lovisolo *et al.*, 2003; Whitfield *et al.*, 2005), levando a uma condição muito restritiva de dependência dos primeiros em relação aos últimos para o sucesso da invasão de um hospedeiro; iii) uma fração dos vírus vegetais usam ssRNA(-) como o ácido nucleico para o armazenamento de suas informações genéticas e sintetizam suas próprias

RNA Polimerases RNA dependentes (RpRd), o que dificulta o trabalho de geração de clones infecciosos, sendo estes as peças-chave para o sucesso da maioria dos sistemas de genética reversa existentes.

Uma das possíveis maneiras de contornar as barreiras técnicas ao desenvolvimento da genética reversa para vírus vegetais é o uso de moléculas de RNA que sejam reconhecidas pelos sistemas de replicação virais e incorporadas às partículas virais nascentes, garantindo a propagação das mesmas paralelamente ao curso das infecções. Tais moléculas podem codificar genes-repórter, como a proteína verde fluorescente (GFP) (Heim *et al.*, 1994) e suas variantes (Chudakov *et al.*, 2010), precursores de RNAs pequenos e interferentes (siRNA) levando ao silenciamento de algum gene viral, ou ainda estas moléculas de RNA podem, elas próprias, ser modificadas a fim de estudar os elementos mínimos necessários para o reconhecimento e replicação pelas RpRd virais. Para tanto, é preferível que tais moléculas de poder replicativo sejam derivadas do próprio vírus ou de algum processo endógeno por ele coordenado, o que facilitaria as chances dessas moléculas serem reconhecidas pela maquinaria viral.

Por sua capacidade replicativa, sua origem (são derivadas do próprio material genético viral) e por serem comumente encontrados (já foram relatados para diversos vírus animais, vegetais e humanos) os RNAs defectivos-interferentes (DI) são excelentes candidatos a ferramentas de genética reversa e potentes agentes antivirais.

Os objetivos deste trabalho incluíram a busca por novos DIs produzidos por um tospovírus presente no território brasileiro – *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), que culminou na obtenção e caracterização molecular do RNA L de TCSV e o desenvolvimento de um sistema de genética reversa para tospovírus baseado no uso de DIs como mini-genomas.

Nesta dissertação é feita uma revisão sobre o estado da arte da genética reversa para vírus de RNA negativo (ssRNA(-)) e sobre os DI e sua aplicabilidade científica (Capítulo 1), seguida da apresentação de uma busca por novos DI de tospovírus que resultou na clonagem e sequenciamento de um segmento genômico (L RNA) ainda não conhecido para o vírus *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV, família *Bunyaviridae*, gênero *Tospovirus*) (Bertran *et al.*, 2011) e na sugestão de uso do L RNA como critério taxonômico para o gênero *Tospovirus* (Capítulo 2), além da descrição da montagem de um sistema de replicação de DI *in planta* com potenciais aplicações para a genética reversa e defesa contra Tospovírus por meio de dois passos: i) transcrição *in planta* dos cDNA dos DI de duas diferentes espécies de

Tospovírus – *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV) – sob comando do promotor T7 por meio da expressão heteróloga de T7 RNA polimerase (T7RPol);
ii) co-inoculação de isolados das mesmas espécies virais, livres de DI, resultando na acumulação dos DI em folhas sistêmicas (não inoculadas) e indicando a incorporação dessas moléculas ao ciclo infeccioso (Capítulo 3). Por fim, os principais pontos do trabalho desenvolvido durante este projeto de mestrado se encontram listados na seção Conclusão.

Capítulo 1 - Sistemas de Genética Reversa e Partículas Defectivas-Interferentes: Estado da Arte

A Virologia é uma ciência dinâmica, cujos métodos e descobertas revolucionam a pesquisa científica. Tome como exemplo a mudança de paradigma do dogma central da Biologia Molecular por meio do estudo dos retrovírus e sua transcrição reversa – e todos os seus desdobramentos para a oncologia – ou a infância da tecnologia do DNA recombinante com os estudos sobre vírus bacteriófagos e sua capacidade de “edição” sobre seu próprio material genético e sobre o genoma do hospedeiro, ou ainda, considere que os primeiros estudos sobre silenciamento gênico e RNA de interferência derivam da tentativa de emular um fenótipo floral produzido por uma infecção viral (Hamilton e Baulcombe, 1999). Essas revoluções científicas são fruto da busca constante pela compreensão dos mecanismos pelos quais os vírus atuam.

De acordo com a classificação taxonômica proposta por Baltimore (**Fig. 1**) (Baltimore, 1971), os vírus de RNA senso negativo (ssRNA(-)) estão no grupo V, subdividido em duas ordens: *Mononegavirales*, na qual todas as espécies que possuem genoma não segmentado se agrupam, e uma ordem não designada agrupando todas as espécies com genomas segmentados. O desenvolvimento da genética reversa enquanto estratégia investigativa se deve, em parte, ao estudo destes microrganismos embora não seja restrita a eles sendo aplicada, por exemplo, a eucariotos (Hardy *et al.*, 2010) e vírus de ssRNA(+) (Ball e Johnson, 1999; Vashist *et al.*, 2009) com grande sucesso.

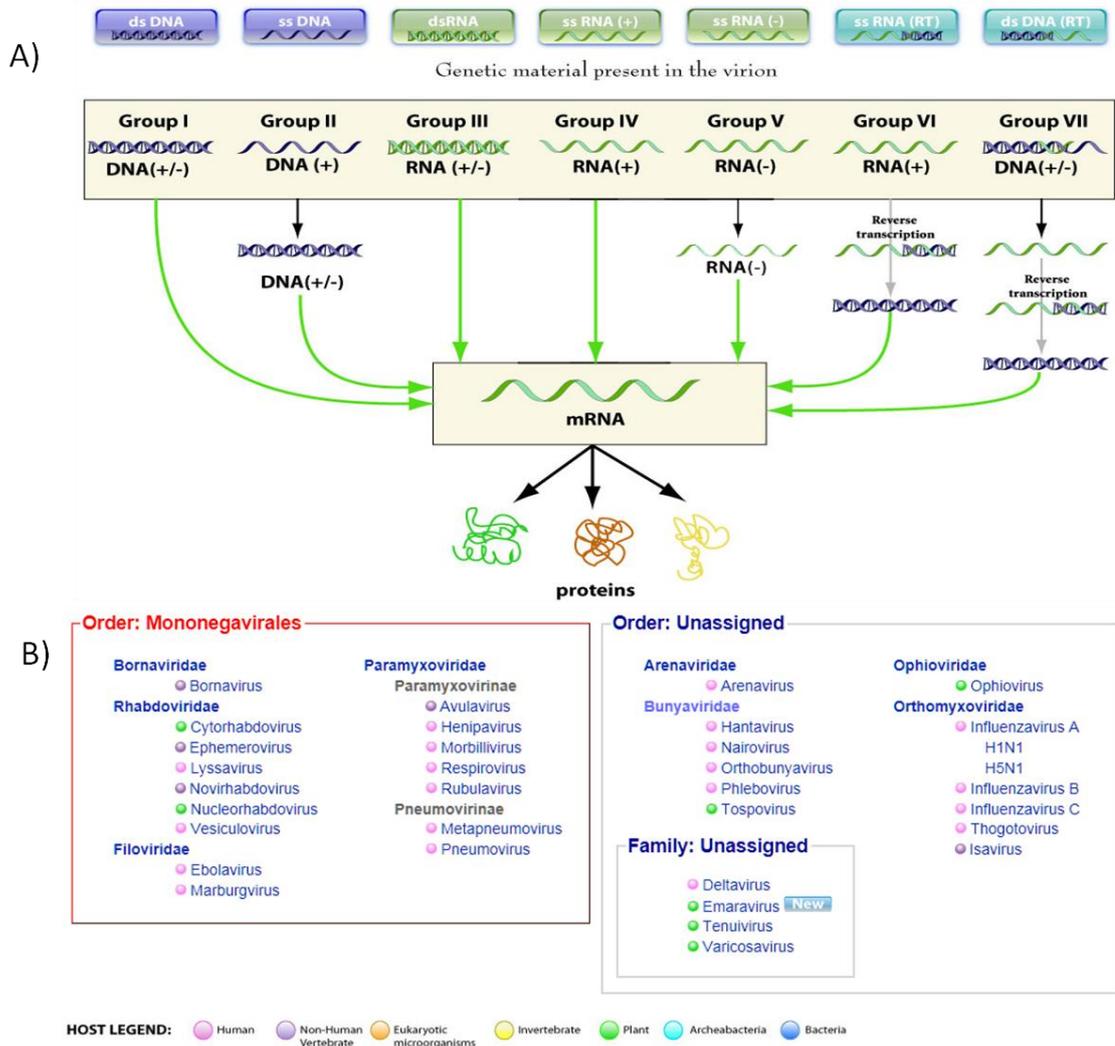


Figura 1. A classificação de Baltimore (Baltimore, 1971) das diferentes espécies virais. A) Infográfico demonstrando as diferentes classes (na figura, Group) em que todos os vírus já conhecidos são separados, de acordo com suas estratégias de produção de RNAs mensageiros virais. B) Lista das duas ordens da classe V, de acordo com a classificação de Baltimore. A ordem Mononegvirales compreende todos os vírus cujo genoma contido na partícula viral madura é de RNA fita simples sentido negativo (ssRNA(-)) não segmentado. A outra ordem, não designada, compreende todos os vírus de ssRNA(-) com genoma segmentado. Figura obtida e modificada a partir de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/254.html e http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/237.html, acessada em 26/01/2012.

1.1 – A Genética Reversa dos vírus de ssRNA(-)

O conceito de Genética Reversa para a Virologia representa a possibilidade de manipular RNA viral por meio de seu DNA complementar (cDNA) (Walpita e Flick, 2005), sobre o qual é possível realizar diversos tipos de modificação, dado o amplo repertório de enzimas de edição e modificação de DNA existentes, além de se tratar de um tipo molecular muito mais estável do que RNA.

Dentre os objetivos da Genética Reversa estão o resgate de partículas virais infecciosas a partir da transfecção de moléculas de cDNA em células hospedeiras, objetivando o desenvolvimento de linhagens virais atenuadas, o estudo dos aspectos moleculares dos ciclos de infecção viral e o desenho racional de novos tratamentos antivirais.

A Genética Reversa foi uma das primeiras aplicações da tecnologia do DNA recombinante (Cohen *et al.*, 1973), sendo prontamente incorporada às metodologias investigativas para vírus de ssRNA(+), incluindo o vírus do mosaico do fumo – TMV – (Okada, 1999), e executada com relativa facilidade quando comparada aos vírus de ssRNA(-), uma vez que, para essa primeira classe de vírus o material genético comporta-se como um RNA mensageiro (mRNA) maduro que mimetiza (parcial ou completamente) os sinais eucarióticos de reconhecimento para a tradução, como a cauda poli-A e o quepe 5'. Os primeiros sistemas de genética reversa para vírus de ssRNA(+) foram desenvolvidos em 1978 (Taniguchi *et al.*) e 1981 (Racaniello e Baltimore), não muito tempo após o surgimento da tecnologia do DNA recombinante.

Em contrapartida, somente onze anos após a publicação do primeiro sistema de genética reversa para vírus de ssRNA(+), Luytjes e colaboradores conseguiram estabelecer o primeiro sistema de genética reversa para um vírus de ssRNA(-), *Influenza A* (Luytjes *et al.*, 1989), pela transfecção de um mini-genoma contendo o gene CAT (cloranfenicol acetil transferase) flanqueado pelas regiões 3' e 5' de *Influenza A*, sob comando do promotor T7, havendo também um sítio de restrição logo após o terminal 5', a fim de garantir fidelidade de reconhecimento das extremidades da molécula do mini-genoma por um vírus selvagem de *Influenza A* co-inoculado, chamado de vírus auxiliar (Neumann *et al.*, 2002). Este experimento, no entanto, não foi o primeiro a conseguir resgatar partículas virais infecciosas completas a partir de cDNA transfectado, feito alcançado por Schnell e colaboradores para o vírus da raiva (família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*) em 1994 (Schnell *et al.*, 1994).

O primeiro vírus de ssRNA(-) de genoma segmentado completamente resgatado a partir de cDNA foi *Bunyamwera virus* (BUNV, família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*), cujo genoma é tri-segmentado (Bridgen e Elliott, 1996). Para os vírus de ssRNA(-) de genoma segmentado, além da maior dificuldade técnica em conseguir a recuperação de vírus a partir do cDNA – em alguns casos, como para *Influenza A*, chegou-se a transfectar até 12 plasmídeos em uma única célula (Neumann *et al.*, 1999) – a estequiometria dos diferentes

segmentos (a quantidade de cada cDNA correspondente aos segmentos genômicos virais inicialmente disponibilizada) é um fator importante a ser considerado (Walpita e Flick, 2005).

É possível perceber que a genética reversa de vírus de ssRNA(-) é tecnicamente mais complexa do que a genética reversa de vírus de ssRNA(+), tendo em vista a distância temporal entre a publicação dos primeiros artigos do gênero para cada grupo de vírus. Isto se deve ao fato da expressão genômica em vírus de ssRNA(-) depender de uma etapa inicial em que uma fita complementar ao RNA genômico do vírus, que possui polaridade negativa, é transcrita por RpRd dedicadas, codificadas pelo próprio vírus e exclusivas para a transcrição e replicação das fases de leitura abertas (ORFs), RNA viral complementar (VC), RNA sub-genômicos, e o genoma viral como um todo (Conzelmann, 2004). O funcionamento das RpRd virais parece ser dependente da associação dos RNA virais à proteína viral responsável pela ligação a ácido nucleico viral e coordenação dos processos de replicação/transcrição, denominada proteína do nucleocapsídeo (N), ou nucleoproteína viral (NP). Somente quando o RNA viral está ligado a proteína do nucleocapsídeo ele consegue ser reconhecido pela RpRd e os eventos de replicação/transcrição acontecem. É essencial, portanto, que para o resgate de vírus de ssRNA(-) a partir de cDNA, sejam fornecidos (co-transfectados) ao menos dois plasmídeos de expressão, para a proteína do nucleocapsídeo e a RpRd viral, além do(s) plasmídeo(s) contendo o(s) genoma(s) viral(is) (Walpita e Flick, 2005).

1.2 – Promotores transcrpcionais

1.2.1 – Promotor T7

O promotor transcricional usado na maioria dos sistemas de genética reversa é derivado do bacteriófago T7 (Tabor e Richardson, 1985), vírus da classe I na classificação de Baltimore (possui genoma na forma de DNA fita dupla - dsDNA) da ordem *Caudovirales* família *Podoviridae*, gênero T7-like viruses. Este vírus sintetiza sua própria RNA polimerase DNA dependente (RpDd), considerada uma das RNA polimerases mais simples e eficientes da natureza (McAllister e Raskin, 1993), assim como as RNA polimerases dos fagos T3 e SP6. Trata-se de uma polimerase que atua sem a necessidade de acoplamento de subunidades e que sozinha promove a iniciação da transcrição e o alongamento valendo-se apenas de mudanças conformacionais (Steitz, 2009). Dado o tamanho pequeno de sua sequência

codante em comparação a outras RNA polimerases DNA dependentes (2.652nt), a enzima T7 RNA Polimerase (T7RPol) pode ser manipulada para expressão por vetores virais capazes de infectar células de mamífero em cultura, como *Vaccinia* (família *Poxviridae*, gênero *Orthopoxvirus*) (Fuerst *et al.*, 1986), ou até transfectada permanentemente em linhagens celulares (Kohl *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2008).

As sequências promotoras reconhecida pelas RpDd dos vírus T7, T3 e SP6 estendem-se da posição -17 a +3, o que significa que pode haver a adição de três nucleotídeos a mais no transcrito gerado por essas polimerases (Rong *et al.*, 1998). Embora esses três nucleotídeos extras sejam importantes para a eficiência transcricional da T7 RNA polimerase, um dos fatores mais importantes na geração de clones infecciosos (i.e. o produto final de um sistema de genética reversa) é justamente a manutenção rígida dos terminais 3' e 5', o que levou ao desenho de versões alteradas do promotor T7, por exemplo ver Perrotta e Been (1990). Em relação à manutenção da extremidade 3' do transcrito nascente, poucos trabalhos foram produzidos a respeito, mas sabe-se que o terminador T7 não adiciona caudas poli-A aos transcritos nascentes (Macdonald *et al.*, 1993). Alternativamente, a adição de sequências de RNA com capacidade autocatalítica (Pyle, 1993) como a ribozima do vírus da Hepatite Delta (HDV, gênero *Deltavirus*) e a ribozima “cabeça de martelo” (hammerhead) (Cochrane e Strobel, 2008) entre a sequência promotora e a sequência de interesse a ser transcrita, garantem a correta transcrição da porção 5' do RNA nascente. Além das extremidades 5', as ribozimas são também adicionadas após o terminal 3' da sequência de interesse, entre este último e a sequência do terminador T7 o que garante a manutenção correta das duas extremidades das moléculas de RNA.

1.2.2 – Promotor Pol I

As estratégias baseadas no promotor transcricional T7 funcionam muito bem para vírus de ssRNA(+) e ssRNA(-) que se replicam no citoplasma da células hospedeira. Entretanto, alguns vírus de ssRNA, em especial o vírus *Influenza A*, se replicam no núcleo da célula hospedeira. Tendo em vista que tanto o promotor T7 quanto T7RPol possuem atividade citoplasmática, e que sua utilização necessita da adição de mais um plasmídeo de expressão ou vetor viral carregando o gene da T7RPol tornou-se conveniente buscar outras estratégias de transcrição dos cDNA virais.

Uma das estratégias de maior sucesso foi o uso de promotores reconhecidos pela RNA Polimerase I de células eucarióticas (Zobel *et al.*, 1993). A RNA Polimerase I é responsável pela transcrição de RNA ribossomal e se localiza no nucléolo da célula. Seus transcritos não possuem estruturas 5' capeadas ou 3' poli-A, e como essa enzima é sintetizada por todas as células eucarióticas e é bastante conservada, não é necessária a adição de mais um plasmídeo de expressão para sintetizá-la, em contraponto à T7RPol. Esta estratégia foi usada com sucesso inclusive para vírus que se replicam no citoplasma como o vírus da doença de Borna, o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) e três espécies da família *Bunyaviridae*, Hantaan e Uukuniemi virus e o vírus da febre hemorrágica do Congo-Crimeano (CCHFV) (Walpita e Flick, 2005).

1.2.3 – Promotor Pol II

Em adição ao controle transcricional promovido pelo promotor Pol I, pesquisadores utilizaram ainda um controle transcricional induzido pelo promotor Pol II, de modo a garantir a eficiente transcrição de RNA viral tanto no ambiente nuclear quanto citoplasmático (Hoffmann *et al.*, 2000). Para outros vírus, usou-se apenas o controle transcricional promovido por Pol II (Li *et al.*, 2011). Nestes casos, a adição de ribozimas entre o promotor e terminador Pol II é necessário, uma vez que os mesmos induzem a formação de quepe 5' e cauda poli-A, respectivamente (Inoue *et al.*, 2003).

1.3 – Sistemas de Genética Reversa para Vírus de Planta

Dentre todos os vírus que infectam plantas descritos no relato oficial do Comitê Internacional para a Taxonomia de Vírus (ICTV) (Fauquet e Mayo, 2005) 70% possuem genoma de RNA, dentre os quais os vírus de ssRNA(+) são mais representativos do que os vírus de ssRNA(-) e para os quais é possível encontrar exemplos de desenvolvimento de genética reversa, como para *Barley yellow dwarf virus* e *Cereal yellow dwarf virus* (Yoon *et al.*, 2011), o vírus Y da batata (PVY) (Fakhfakh *et al.*, 1996; Janzac *et al.*, 2010), *Barley yellow mosaic virus* (You e Shirako, 2010), *Lettuce infectious yellows virus* (Wang *et al.*, 2009), *Turnip yellow mosaic virus* (Jakubiec *et al.*, 2007), *Pepper mild mottle virus* (Ichiki *et al.*, 2005), *Brome mosaic virus* (Figlerowicz e Bujarski, 1998), *Plum pox virus* (Raghupathy *et al.*, 2006) e TMV (Okada, 1999). Boa parte dos artigos sobre vírus vegetais de ssRNA(+), no

entanto, lidam com a manipulação dos genomas virais visando não a compreensão da virologia molecular, mas sim a aplicação destes vírus manipulados como ferramentas de indução de silenciamento gênico por vírus (VIGS) (e.g. Stratmann e Hind (2011)).

Uma busca feita na base de dados ISI Web of Knowledge indicou que, até o momento, trabalhos científicos sobre genética reversa de vírus vegetais de ssRNA(-) não foram depositados. A busca foi feita utilizando-se o nome do gênero viral seguido do termo “reverse genetics”, (e.g. tospovirus reverse genetics) usando o filtro “Topic”. O mesmo tipo de busca, realizado no site PubMed, utilizando a ferramenta de busca avançada e selecionando o filtro “Title/Abstract” também gerou o mesmo resultado.

Isso sugere que as barreiras ao desenvolvimento da Genética Reversa para os vírus de planta de ssRNA(-) ainda não foram superadas, ou que as alternativas testadas até o momento ainda não renderam resultados positivos. No entanto, a pressão científica para o desenvolvimento de um sistema de genética reversa para os vírus de planta de ssRNA(-) é grande, já que entre eles, os membros do gênero *Tospovirus* são alguns dos maiores causadores mundiais de perdas de produtividade agrícola (e conseqüentemente prejuízos econômicos) (Pappu *et al.*, 2009).

1.3.1 – Barreiras ao desenvolvimento dos sistemas de genética reversa para os vírus de planta de ssRNA(-)

Como mencionado anteriormente, existem pelo menos três barreiras a serem vencidas para o desenvolvimento de sistemas de genética reversa para vírus de planta de ssRNA(-). Elas serão tratadas em maior profundidade nesta seção.

Culturas celulares vegetais

O processo de manipulação de tecidos vegetais para realização de micropropagação é um dos maiores focos de estudo das ciências vegetais. Entre suas possíveis aplicações estão a produção em massa de plantas, com grande potencial para o aumento da produção agrícola, o estudo da fisiologia vegetal e dos processos de diferenciação tecidual e o melhoramento genético por meio de cruzamentos assistidos e transgenia, para citar alguns exemplos. No entanto, tecidos vegetais não são facilmente aproveitáveis para o estudo da virologia molecular, principalmente pelo alto custo de produção e manutenção das culturas

de tecido e a infraestrutura necessária para fazê-lo, sem contar os altos níveis de contaminação por bactérias endógenas, comuns nesse tipo de procedimento.

Há ainda as culturas de células vegetais em suspensão, muito utilizadas para o desenvolvimento de “molecular farming” – a produção de proteínas heterólogas de interesse comercial, livre de boa parte dos inconvenientes da transgenia convencional por serem manipuladas apenas dentro dos laboratórios e incapazes de se propagar no campo. Alguns exemplos de linhagens celulares vegetais cultivadas desta forma são BY-2 (Nagata *et al.*, 1992) derivada de *N. tabacum*, T87 (Axelos *et al.*, 1992) derivada de *Arabidopsis thaliana* e outras culturas derivadas de cenoura, arroz e soja (Xu *et al.*, 2011). Este método de cultura celular vegetal apresenta características de interesse para o pesquisador, como a imortalidade das linhagens celulares (dada a aplicação correta dos hormônios vegetais), a manutenção de parede celular e formação de agregados celulares (com manutenção parcial do *plasmodesmata*), o que garante maior estabilidade estrutural e resistência ao rompimento mecânico das células (que são cultivadas sobre agitação) além de um tempo rápido de divisão, quando comparado a outras células eucarióticas (24-100h) (Xu *et al.*, 2011). Este sistema possui bom potencial para uso em pesquisas de genética reversa, entretanto, devido ao seu custo de manutenção, é mais adequado para laboratórios que dispõem de melhor condição financeira.

Uma alternativa mais rápida frente à cultura de tecidos vegetais e as culturas celulares em suspensão é a produção de protoplastos. Protoplastos são células vegetais destituídas de parede celular, geradas a partir de folhas que sofrem um tratamento enzimático rico em celulases, pectinases e ligninases capaz de dissolver o tecido vegetal e manter as células desagregadas. Seu uso para o entendimento da função de proteínas virais é amplo (Chen *et al.*, 1994; Kormelink *et al.*, 1994; Storms *et al.*, 1995; Raghupathy *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009b; You e Shirako, 2010) e os custos de manutenção são muito reduzidos, já que os protoplastos são mantidos a temperatura ambiente e sobre leve agitação, sem necessidades especiais de controle de fotoperíodo – podem ser mantidos na bancada do laboratório. No entanto, os protoplastos mantêm-se por pouco tempo (1-2 semanas), no qual a viabilidade celular decai rapidamente e as células começam a sintetizar novamente os componentes da parede celular. Em adição, protoplastos possuem baixa eficiência de transformação e não servem para repique. Em outras palavras, os protoplastos são utilizados de maneira descartável e a cada novo experimento, novos protoplastos têm

de ser produzidos, o que significa um gasto elevado das enzimas que retiram a parede celular vegetal.

Outros fatores como o controle e sincronização das fases de crescimento celular e a patogenicidade de *Agrobacterium tumefaciens* sobre as células mantidas em cultura devem também ser levados em consideração na escolha do melhor sistema para a realização da genética reversa. Por exemplo, descobriu-se recentemente que dentro do conjunto de proteínas secretadas por BY-2 está uma proteína com potencial antiviral, o que pode atrapalhar estudos de genética reversa (Duby *et al.*, 2010).

É possível ver que nenhum dos sistemas existentes possui individualmente todas as características necessárias para a realização de estudos de genética reversa. Algumas alternativas foram propostas, como a cultura de gametófitos de *Physcomitrella pedans* (Huhns *et al.*, 2003) ou até mesmo a infecção de células de mamífero que sofreram alteração de permissibilidade (De Medeiros *et al.*, 2005). Ainda alternativas permanecem por ser investigadas, como o uso de culturas celulares dos insetos vetores. Para tospovírus, é sabido que a expressão da proteína supressora de silenciamento gênico NSs em células de lepidópteros (*Anticarsia gemmatalis*, *Tricoplusia ni*, *Spodoptera frugiperda* e *Bombix mori*) é capaz de induzir a permissibilidade a baculovírus em tipos celulares semi-permissivos e não permissivos (Oliveira *et al.*, 2011) o que, tendo em vista todo o conhecimento acumulado sobre esses tipos celulares e a facilidade de manipulação dos mesmos, apresenta-se como excelente alternativa a ser explorada no estudo do processo infeccioso de tospovírus.

Mimetismo das condições naturais da infecção viral

Os vírus de planta e seus vetores (na grande maioria insetos afídeos) constituem um dos exemplos mais pujantes do efeito da co-evolução entre diferentes organismos. Por serem essenciais para a propagação planta a planta, os vírus interagem com seus insetos-vetores modificando seus comportamentos, alterando padrões de voo (Chancellor *et al.*, 1997), alimentação (Medina-Ortega *et al.*, 2009), cópula (Burand *et al.*, 2005) e metamorfose (Oreilly, 1995). Em alguns casos, os vírus são também responsáveis pela floração forçada (uma resposta de defesa clássica das plantas a estresses gerados por patógenos) das espécies hospedeiras das quais os insetos-vetores colhem néctar ou seiva, o que os atrai e garante a transmissibilidade do vírus para outras plantas.

Uma consequência interessante da dependência dos vírus de seus insetos vetores é que os vetores funcionam como grandes filtros, agentes evolutivos promotores do efeito de gargalo de garrafa (bottleneck effect) caracterizado pela diversificação local das populações virais, o que acaba induzindo variabilidade e promovendo a especiação (Escarmis *et al.*, 2006). Este efeito de filtragem ainda é importante na eliminação de vírus defeituosos – partículas defectivas-interferentes, por exemplo, que podem comprometer a eficiência da infecção viral como demonstrado para os tospovírus (Nagata *et al.*, 2000) e para *Tobacco rattle virus* (Visser *et al.*, 1999), transmitidos por tripes e nematoides, respectivamente.

A especificidade entre vírus e vetor pode chegar a tal ponto que a detecção de um vírus em uma determinada espécie hospedeira vegetal pode prever a existência de uma nova espécie ou subespécie do inseto vetor e vice-versa. Isto aconteceu com o tospovírus *Zucchini lethal chlorosis virus* descoberto no Brasil (Bezerra *et al.*, 1999). Os insetos transmissores de tospovírus pertencem à família *Thripidae*, ordem *Thysanoptera* e possuem relação muito estreita com estes vírus. A descoberta em abril de 1999 de uma nova espécie de tripes (*Frankliniella zucchini*) se alimentando de abobrinha (*Cucurbita pepo*; cv. Caserta) levou a busca por doenças virais que tivessem aspecto de infecções por tospovírus. Pouco tempo depois, em setembro do mesmo ano, foi relatada uma nova espécie de tospovírus, *Zucchini lethal chlorosis virus*, infectando esta planta.

Tendo em vista que boa parte dos vírus vegetais não são envelopados e que mesmo para os vírus envelopados as glicoproteínas parecem desempenhar papéis de reconhecimento e invasão celular apenas nos insetos vetores, tornou-se necessário o uso de técnicas que internalizem as partículas virais nas células vegetais em cultura. Métodos como a inoculação viral em solução de polietileno glicol (PEG), eletroporação das células-hospedeiras e fusão de lipossomos tornaram-se populares para a administração viral. No entanto, estes métodos necessitam que a membrana celular não esteja recoberta pela parede celular, o que em termos práticos significa que não funcionariam muito bem para culturas celulares vegetais em suspensão e culturas de tecido, mas sim para protoplastos.

Como alternativa, é possível promover a transfecção de DNA para células vegetais por meio de agroinfiltração, técnica bastante difundida e amplamente revisada na literatura das ciências vegetais (McCullen e Binns, 2006; Gelvin e Kim, 2007; Alimohammadi e Bagherieh-Najjar, 2009; Pacurar *et al.*, 2011), mas que apresenta problemas como rápido silenciamento e instabilidade do transgene, indução de citopatologias provocadas pela

interação bactéria/célula vegetal e integração do transgene (T-DNA) em sítios aleatórios do genoma da célula vegetal (Gelvin e Kim, 2007).

Fatores associados à saliva do inseto hospedeiro e que possivelmente possuem papel na modulação da fisiologia vegetal ou que se associam às partículas virais durante o processo natural de inoculação viral são pouco conhecidos, mas podem também constituir uma frente importante de estudos no intuito de melhorar a eficiência de inoculação de vírus vegetais *in vitro*. Ainda outra frente de estudos é a obtenção de linhagens celulares de afídeos, tripses, besouros, moscas-brancas e outros insetos vetores, o que poderia facilitar o estudo dos vírus a eles associados.

RNA Polimerases RNA dependentes

As RpRd dos vírus de ssRNA(-) são proteínas muito conservadas entre as diferentes famílias virais da classe V e são caracterizadas por sua multifuncionalidade, coordenando a replicação/transcrição do genoma viral e dos RNA subgenômicos de uma maneira dependente da proteína do nucleocapsídeo, pelo menos para a família *Bunyaviridae* (De Haan *et al.*, 1991; Adkins *et al.*, 1995; Reguera *et al.*, 2010; Walter e Barr, 2010), na qual sabe-se que a polimerase viral é também responsável pelo sequestro de pequenas sequências iniciadoras de mRNA celulares maduros que são adicionados aos mRNA virais (processo conhecido como cap-snatching), e para a qual demonstrou-se recentemente que a RpRd (proteína L) forma homo-oligômeros, indicando a formação de um núcleo dedicado de processamento, edição e síntese de RNA viral (Zamoto-Niikura *et al.*, 2009).

A fim de expressar estas proteínas em um sistema de cultura de células seria possível realizar transgenia das linhagens celulares, obtendo clones que expressem constitutivamente as RpRd virais, ou ainda, expressá-las transientemente. No entanto, por seu grande tamanho (entre 6.000 e 9.000nt), são moléculas de difícil obtenção e manipulação que não podem ser clonadas em um vetor viral, por exemplo, já que esses vetores não suportam construções exógenas nesta faixa de tamanho (prof. Dr. Renato de Oliveira Resende, comunicação pessoal - 2011). Muitos grupos de pesquisa que trabalham com o gênero *Tospovirus*, por exemplo, já tentaram fazer sistemas de genética reversa e invariavelmente encontraram como ponto de grande dificuldade a expressão da RNA polimerase viral completa no ambiente celular vegetal (Dra. Rosana Blawid, comunicação pessoal - 2011).

Uma das alternativas viáveis, portanto, é o desenvolvimento de genética reversa por meio do uso de mini-genomas e vírus auxiliares, capazes de fornecer a RpRd e a proteína N em grande quantidade e em condições funcionais. Nesta direção, o desenvolvimento dos mini-genomas pode beneficiar-se de moléculas naturalmente produzidas pelo vírus que podem ser facilmente recuperadas a partir de RNA total extraído de plantas infectadas, os RNA defectivos-interferentes.

Outra possibilidade é a construção de genomas virais nos quais o cDNA transcrito corresponde a fita viral completar, onde estão codificadas as proteínas virais estruturais. Desta forma, pode-se transfectar apenas o cDNA correspondente ao genoma viral-complementar sob comando de um promotor para RpDd sem a necessidade de vírus ou plasmídeos auxiliares expressando a RpRd. Este feito de grande relevância foi alcançado recentemente na geração de um sistema de células de mosquito para o estudo da genética reversa do vírus da febre do vale do Rift (RVFV, gênero *Phlebovirus*, família *Bunyaviridae*) (Kohl *et al.*, 2004). Neste sistema, as células de mosquito foram transfectadas estavelmente com o gene da T7 RNA polimerase e em adição, descobriu-se serem deficientes para uma das RpRd celulares, enzima responsável pela multiplicação do sinal de silenciamento gênico induzido pela expressão de material genético exógeno. Sem este sinal de controle celular da expressão gênica, torna-se mais fácil expressar em quantidade no ambiente celular a enzima T7RPol, e conseqüentemente, mais estável a transcrição de RNAs genômicos completos. Em complemento a este sistema conseguiu-se engenheirar uma partícula viral de RVFV geneticamente estável que não necessita das proteínas NSs e NSm para infectar as células de mosquito do sistema mencionado acima. Os pesquisadores então substituíram a ORF codante da proteína NSs pela ORF do precursor glicoproteico de Gn e Gc no segmento S e trocaram a ORF de NSm por GFP no segmento M (Brennan *et al.*, 2011). Este foi um dos passos mais importantes até o momento para o estudo do processo de replicação de um bunyavírus usando uma molécula repórter. Por se tratar de uma linhagem viral atenuada ainda reserva potencial para a produção de vacinas (Brennan *et al.*, 2011).

1.4 – Partículas Defectivas Interferentes

Data de 1951 o primeiro relato científico de perda da capacidade infecciosa de um inóculo viral devido à realização de passagens seriadas em alta multiplicidade de infecção

(MOI) feito por Von Magnus com *Influenza A* (família *Orthomyxoviridae*, gênero *Influenzavirus A*) (Von Magnus, 1951), um problema biológico que só seria resolvido em 1965 por Alice Huang e seu trabalho pioneiro com *Vesicular stomatitis indiana virus* (VSIV, família *Rhabdoviridae*, gênero *Vesiculovirus*) (Huang e Wagner, 1965; 1966b). Huang e Wagner conseguiram detectar o acúmulo de partículas virais com tamanhos menores do que o normal para VSIV após múltiplas passagens *in vitro*, e verificaram que estas partículas defeituosas tinham a capacidade de atenuar ou até inibir os sintomas provocados por VSIV nas células infectadas e eram progressivamente mais frequentes na análise microscópica do inóculo em diferentes pontos da passagem seriada (Huang e Wagner, 1966a,b). Para o agente causador do fenômeno descrito inicialmente por Von Magnus cunhou-se o termo Partículas Defectivas-Interferentes, ou simplesmente, Defectivos-Interferentes (DI).

1.4.1 Partículas Defectivas-Interferentes e RNA Defectivo-Interferente

Defectivos-Interferentes podem existir simplesmente na forma de ácidos nucleicos virais modificados (variações de tamanho, informação e posição no DNA ou RNA viral) que podem ou não ser encapsidados normalmente, ou na forma de partículas virais defeituosas (variações de forma, tamanho e componentes estruturais), quando a modificação do genoma viral altera as proteínas estruturais do vírus. Logo, há diferentes implicações biológicas para cada tipo de DI (Depolo *et al.*, 1987). Defectivos-Interferentes são mais frequentemente encontrados em vírus de RNA (classes IV e V na classificação de Baltimore), mas existem casos de DI para baculovírus (dsDNA, classe I) (Wickham *et al.*, 1991) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV, classe VI) (Nelson e Perelson, 1995), por exemplo.

No entanto, o conhecimento atual de partículas defeituosas interferentes vale-se muito das pesquisas realizadas em três vírus humanos e três vírus de plantas, todos eles das classes IV e V na classificação de Baltimore: *Influenza A*, *Vesicular stomatitis indiana virus*, *Semliki Forest virus*, *Broad bean mottle virus*, *Cymbidium ringspot virus* e *Cucumber necrosis virus*. Das várias conclusões a que os estudos sobre esses e outros vírus chegaram podemos listar algumas mais importantes:

Origem das Partículas Defectivas Interferentes

As partículas defectivas-interferentes são originadas de ácidos nucleicos defectivos e estes, por sua vez, são originados do genoma (ou segmento genômico) viral a partir de um processo de erro da polimerase durante a replicação viral em tecidos infectados.

As polimerases virais de modo geral e, mais contundentemente as RNA polimerases virais, são conhecidas por aumentar a variabilidade viral por meio de um processo falho de revisão (proof-reading) da incorporação de nucleotídeos à fita nascente (Duffy *et al.*, 2008). Além deste tipo de variabilidade, mudanças mais drásticas devido à recombinação *in trans* (entre moléculas) são bastante conhecidas e estudadas (Simon-Loriere e Holmes, 2011). No entanto, existem processos drásticos de variabilidade que ocorrem *in cis* por meio de erros da polimerase (saltos) nos quais parte do material genético selvagem é deletado ou polimerizado na ordem incorreta pela polimerase viral. É a partir deste último tipo de modificação dos genomas virais que surgem os defectivos-interferentes.

O erro devido ao acoplamento irregular da polimerase viral parece ser dependente da ocorrência de estruturas secundárias típicas (Havelda *et al.*, 1997) e pode se dar de formas diferentes: múltiplas deleções, uma única deleção interna, deleção da(s) porção(ões) terminal(is) e rearranjo do RNA genômico (mosaico) (Marriott e Dimmock, 2010), esquematizadas na **Figura 2**. Especialmente no caso de vírus vegetais, a temperatura em que ocorre a infecção viral e a espécie hospedeira na qual o vírus é mantido, são condições importantes para a geração dos DI como demonstrado para *Tospovirus* (Inoue-Nagata *et al.*, 1997). Contrariando as primeiras descobertas sobre o processo de geração de DIs na qual se assumia que seriam gerados apenas em alta MOI após passagens seriadas, hoje se sabe que eles podem ser produzidos *de novo* durante a infecção de um inóculo viral fresco, livre de tais moléculas e/ou partículas defectivas (Law e Morris, 1994; Pogany *et al.*, 1995).

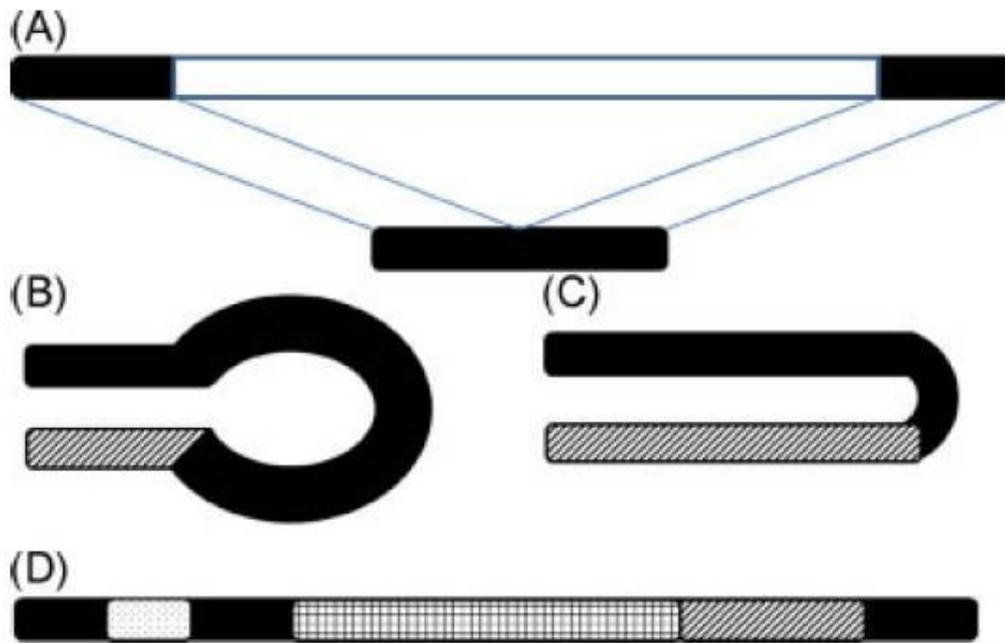


Figura 2. Tipos de origem dos genomas dos Defectivos-Interferentes (DI) de vírus de RNA. A) Genoma de DI gerado por deleção simples, mostrando a conservação dos terminais da molécula de RNA e a região central deletada. Este tipo de DI pode ser gerado também a partir de múltiplas deleções. B) Genoma de DI gerado por estrutura secundária de RNA do tipo cabo de panela (panhandle), no qual a região hachurada é complementar ao outro término da molécula. C) Genoma de DI gerado por estrutura secundária de RNA do tipo grampo de cabelo (hairpin), no qual a complementaridade de bases é maior do que em uma estrutura panhandle. D) Genoma de DI mosaico ou complexo, no qual as várias regiões que compõem o DI são herdadas da molécula parental em ordem incorreta, ou a partir de diferentes moléculas parentais, ou podem incluir pedaços de RNA da célula hospedeira. Obtido de Marriott e Dimmock (2010).

Efeito Interferente

O efeito interferente de ácidos nucleicos defectivos-interferentes que atenuam/inibem os sintomas de uma infecção viral se dá por competição entre a(s) molécula(s) defectiva(s) e o material genético do vírus selvagem (Frank, 2000). Todas as moléculas de DIs têm em comum o fato de possuírem tamanho menor do que as moléculas concorrentes do genoma viral selvagem, já que são geradas a partir de deleções. Portanto, levam menos tempo para serem replicadas do que o material genético viral selvagem. Em adição, para os tospovírus, por exemplo, há outra fonte predita de interferência: por possuírem as extremidades terminais de todos os segmentos gênicos complementares – assim como muitos dos vírus de ssRNA(+)/(-) (Whelan *et al.*, 2004), a formação de trechos de dsRNA poderia servir como substrato para a ativação do sistema de RNAi da célula infectada, ativando assim a imunidade celular.

Durante uma infecção viral versões diferentes dos DIs se acumulam na célula-hospedeira e instituem um intenso processo de seleção natural, competindo entre si (o que leva a ocorrência mais frequente de algumas espécies de DI, chamados DI estáveis). Os DIs

também competem com o material genético viral selvagem por componente (ligação à proteína do nucleocapsídeo e ribossomos, por exemplo) e por capacidade replicativa em um verdadeiro processo Darwiniano (Kirkwood e Bangham, 1994; Pathak e Nagy, 2009). Em alguns casos, no entanto, os DI não são atenuadores da infecção viral, podendo ser neutros (Lewandowski e Dawson, 1998) ou atuar como moduladores, transformando infecções de curto período em infecções persistentes (Tsai *et al.*, 2007), e agindo até como acentuadores do processo infeccioso (Li *et al.*, 1989; Romero *et al.*, 1993).

As moléculas defectivas geralmente não mantêm as ORFs de sua molécula parental intactas, mas parece importante para sua estabilidade que essas moléculas conservem versões truncadas das ORFs parentais (White *et al.*, 1992). Estas versões truncadas das ORFs possivelmente são traduzidas e podem se acumular no citosol de maneira a contribuir para o efeito interferente. Este processo tem ainda implicações para os sistemas de expressão que utilizam vírus como vetores e para os métodos de purificação de proteínas recombinantes. Geralmente nesses sistemas altos MOI são utilizados a fim de maximizar a produção de proteína expressa por tempo de infecção, o que favorece o acúmulo de DI e conseqüentemente a probabilidade de que versões truncadas da proteína de interesse sejam produzidas, dificultando seu processo de purificação. Este fato é de especial relevância para a produção *in vitro* de vacinas e antígenos empregados em kits de diagnóstico.

DIs como agentes antivirais

Desde sua descoberta e devido a seus efeitos sobre a sintomatologia viral, os DI sempre foram considerados como alternativas importantes de pesquisa visando à cura ou a diminuição da mortalidade e morbidade de doenças virais (Pathak e Nagy, 2009). Talvez por terem sido descobertos em *Influenza A*, os DI tiveram nesta espécie seu primeiro alvo como molécula terapêutica. O grupo de pesquisas liderado por Nigel J. Warwick atua a mais de 25 anos no desenvolvimento de uma estratégia de defesa contra a gripe usando DI e já desvendou algumas das características-chave para que o DI de um vírus possa ser usado em terapia antiviral: i) o DI precisa inibir/atenuar a infecção viral (Dimmock *et al.*, 1986); ii) o efeito interferente funciona melhor quando o limiar para interferência é mais baixo (menos partículas de DI precisam ser acumuladas no inóculo para que o efeito interferente funcione) (Mclain *et al.*, 1988; Nelson e Perelson, 1995); iii) a ação antiviral promovida pelo DI é de

curta duração, mas é eficiente para ativação do sistema imunológico em modelos animais (Scott *et al.*, 2011).

Em adição, uma das características mais interessantes do uso de DI como agente antiviral é sua capacidade de interferência sobre outras espécies aparentadas ao vírus de origem de onde foi gerado o DI. Isto foi confirmado para a gripe equina (H3N8) conferindo defesa contra *Influenza A* humano (Noble e Dimmock, 1994), para *Influenza A* conferindo defesa contra pneumovírus (Easton *et al.*, 2011) e para *Tomato bushy stunt virus* conferindo defesa contra *Cymbidium ringspot virus* (Rubio *et al.*, 1997).

O uso de DI como estratégia antiviral foi também sugerido para *Sendai virus* (Strahle *et al.*, 2006), HIV (Schubert *et al.*, 1992) e rubéola (Seya *et al.*). Devido ao seu potencial como agentes antivirais (Marriott e Dimmock, 2010) há pelo menos quatro pedidos de patente aprovados nos estados Unidos da América (EUA) para uso de DI como terapia antiviral: para TSWV, *Influenza A*, HIV e *Rubella virus* (Atarashi e Sayama; Dimmock e Easton; Rozenberg e Anderson; Seya *et al.*).

1.5 A expressão gênica de tospovírus e seus RNA defectivos-interferentes

Os tospovírus são membros da família *Bunyaviridae* de vírus de ssRNA(-) de genoma tri-segmentado. Os primeiros relatos sobre tospovírus (a primeira espécie descoberta foi TSWV) ocorreram em plantações visitadas pelo tripes *Frankliniella occidentalis* datados do início do século XX na Austrália (Tentchev *et al.*, 2011). Inicialmente, pensou-se que TSWV podia ser um vírus de RNA positivo (Verkleij *et al.*, 1982), mas por possuir genoma tri-segmentado e morfologia típica de bunyavírus, TSWV (e todos os vírus a ele aparentados) foi incluído na família *Bunyaviridae* (Milne e Francki, 1984). Os segmentos gênicos de tospovírus são típicos da família *Bunyaviridae* e denominados de acordo com o tamanho das moléculas em RNA L (large), RNA M (medium) e RNA S (small) (Nichot *et al.*, 2005). Todos os segmentos gênicos de tospovírus possuem um conjunto de oito nucleotídeos conservados (5'-AGAGCAAT-3') e complementares nas extremidades 5' e 3', o que leva à formação de uma estrutura secundária dos segmentos gênicos virais conhecido como cabo de panela (pan-handle). Esta estrutura é comum para a maioria dos vírus de ssRNA(+)/(-) (Walpita e Flick, 2005) e essencial para a iniciação de todos os processos de replicação/transcrição dos vírus desta classe (Kawoka, 2004).

1.5.1 Organização Genômica

Os membros do gênero *Tospovirus* codificam em seu genoma seis proteínas a partir de cinco ORFs usando uma estratégia de codificação ambisenso para os segmentos genômicos S (De Haan *et al.*, 1990) e M (Law *et al.*, 1992) e uma sequência codificante no cRNA do segmento L (De Haan *et al.*, 1991). As proteínas estruturais (aquelas que estão presentes na partícula viral madura) produzidas pelo vírus são a proteína do nucleocapsídeo (N) no segmento S, as glicoproteínas Gn e Gc (também chamadas G1/G2 em publicações mais antigas sobre o gênero) no segmento M (que são produzidas a partir de um único mRNA viral em um precursor glicoproteico clivado pela célula hospedeira) e a RpRd viral (proteína L) no segmento L (Nichot *et al.*, 2005) (**Fig. 3**). Todas as proteínas estruturais estão codificadas no cRNA viral, o que significa que para a sua produção o vírus precisa transcrever a fita complementar ao RNA genômico viral usando sua RpRd. Para tanto, a proteína L é empacotada nas partículas virais nascentes em associação ao complexo ribonucleoproteico (Nichot *et al.*, 2005). Os Tospovírus codificam ainda duas proteínas não estruturais, NSs e NSm, nos segmentos gênicos S e M, respectivamente (**Fig. 3**).

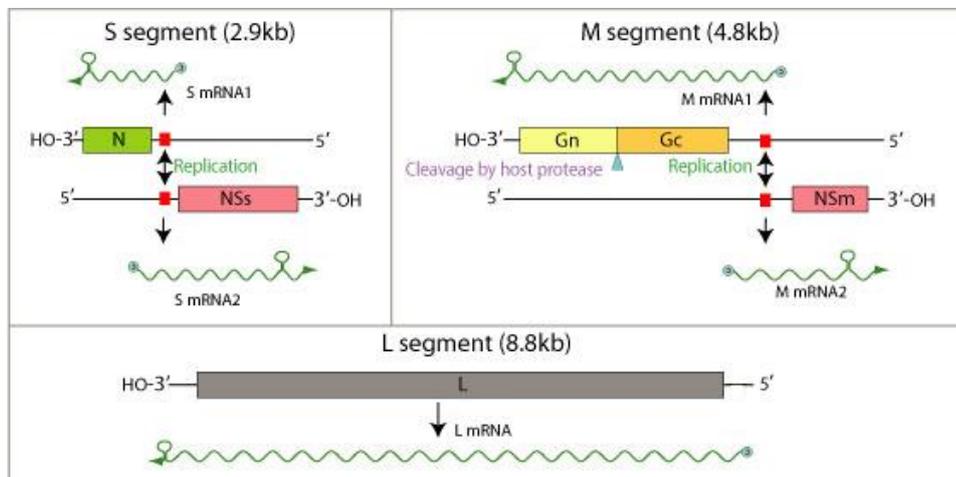


Figura 3. Organização genômica dos tospovírus. Os três quadros acima indicam as estratégias de transcrição dos RNAs mensageiros virais a partir dos segmentos genômicos chamados RNA S (S segment), RNA M (M segment) e RNA L (L segment). No RNA S são codificados os genes da proteína N na fita viral complementar (cRNA), necessitando que a polimerase viral transcreva uma fita complementar (RNA subgenômico) ao RNA S para sua tradução e NSs na fita viral. O RNA M codifica o precursor glicoproteico (GPp) que é clivado pela célula hospedeira dando origem as glicoproteínas Gn e Gc (cRNA) e a proteína NSm (fita viral). O RNA L codifica uma única fase de leitura aberta (ORF) correspondente a proteína L no cRNA. Os segmentos em verde representam os RNAs mensageiros virais (extremidade 5', balão preenchido e extremidade 3', balão não preenchido) e os quadrados vermelhos as regiões intergênicas. Modificado de http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/253.html. Acesso em 26/01/2012.

A proteína NSs está implicada para algumas espécies de tospovírus na formação de estruturas fibrosas presentes na célula infectada em estágio tardio (Kormelink *et al.*, 1991),

no processo de supressão de silenciamento gênico da célula hospedeira pela interferência no funcionamento da maquinaria de RNAi (Takeda *et al.*, 2002; Lokesh *et al.*, 2010; Schnettler *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2011) e, possivelmente é a proteína envolvida na determinação dos diferentes círculos de hospedeiros encontrados para espécies do gênero *Tospovirus*. Esta última hipótese é reforçada pelos resultados obtidos para mudança de permissibilidade de diferentes células de lepidópteros a baculovírus recombinantes expressando a proteína NSs de TSWV (Oliveira *et al.*, 2011). A proteína NSs, portanto poderia ser a chave para explicar por que algumas espécies de tospovírus, como os recém-descobertos Bean necrotic mosaic virus (De Oliveira *et al.*, 2011) e Soybean vein necrosis associated virus (Zhou *et al.*, 2011), possuem gama de hospedeiros muito restrita (de 1 a 3 hospedeiros sistêmicos), enquanto TSWV infecta mais de 1.000 espécies de plantas daninhas e cultiváveis (Nichot *et al.*, 2005).

A proteína NSm por sua vez, é responsável pelo movimento célula a célula do vírus (de fato, são os complexos ribonucleoproteicos que se movimentam célula a célula, não as partículas virais) por meio da formação de túbulos e possivelmente também está envolvida na sintomatologia viral (Kormelink *et al.*, 1994; Storms *et al.*, 1995; Soellick *et al.*, 2000; von Bargen *et al.*, 2001; Lewandowski e Adkins, 2005; Paape *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009a,b), além disso, a proteína NSm parece ser responsável pela determinação da avirulência (interação gene a gene) e capacidade de quebra de resistência gênica ao gene *Sw-5* em tomate (*Solanum lycopersicum*) (Lopez *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que a RpRd dos tospovírus é uma enzima multifuncional, responsável pela replicação/transcrição viral em um processo dependente da coordenação da proteína do nucleocapsídeo (Adkins *et al.*, 1995; van Knippenberg *et al.*, 2002; Chapman *et al.*, 2003). A RpRd promove o sequestro de sequências de quepe 5' a partir de mRNA celulares que apresentem alguma similaridade à molécula viral nascente, coordenado por um domínio N-terminal com atividade endonucleolítica (Duijsings *et al.*, 2001; van Knippenberg *et al.*, 2005; Reguera *et al.*, 2010). De acordo com dados obtidos para *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus*, a proteína L é possivelmente capaz de promover reparos a danos causados por inserções e deleções ao RNA viral (Walter e Barr, 2010) e pode possuir uma estrutura proteica quaternária formada por homo-oligômeros (Zamoto-Niikura *et al.*, 2009).

Inicialmente se acreditava que as glicoproteínas dos tospovírus, Gn e Gc, possuísem papel apenas na mediação da infecção do inseto vetor, onde se sabe serem essenciais para a infecção e circulação propagativa do vírus (Ullman *et al.*, 1995; Bandla *et al.*, 1998). No entanto, as glicoproteínas dos tospovírus são também essenciais para a coordenação do processo de montagem de novas partículas virais, que se dá entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi da célula infectada (Ribeiro *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009). Em adição, descobriu-se que essas proteínas interagem fisicamente com a proteína do nucleocapsídeo durante a montagem de novas partículas virais (Ribeiro *et al.*, 2009) e que são elas as possíveis responsáveis pelo formato da partícula viral madura, fato demonstrado para o hantavírus Tula (Huiskonen *et al.*, 2010).

A proteína N é um componente importante da replicação viral em tospovírus, pois está associada à mediação da interação entre os RNAs virais e a RpRd para a formação dos complexos ribonucleoproteicos, além de ser a proteína responsável pela interação (Richmond *et al.*, 1998), integridade e coordenação do RNA viral (Mir e Panganiban, 2006) durante todo o processo infeccioso, incluindo seu processamento pela RNA polimerase viral, como sugerido para RVFV (Ferron *et al.*, 2011) e para outros vírus de ssRNA(-) (Walpita e Flick, 2005). Trata-se também da proteína mais diversa entre as espécies de Tospovírus, fator pelo qual é usada como principal critério taxonômico do gênero (Nichot *et al.*, 2005). Em estudos realizados para o gênero *Hantavirus* descobriu-se que a proteína N possui um papel muito importante na manutenção da estrutura do pan-handle (Mir e Panganiban, 2004) dos segmentos gênicos de uma maneira gênero-específica (Mir *et al.*, 2006) e que esta proteína interage com o RNA ribossomal da célula hospedeira, possivelmente como um fator de estabilização do complexo RNA viral/ribossomo (Haque e Mir, 2010). A proteína N ainda está associada à resposta de hipersensibilidade verificada em acessos de pimentão (*Capsicum chinense*) resistentes a TSWV (Lovato *et al.*, 2008).

A transcrição dos RNA subgenômicos virais que servem como mRNA virais é coordenada pelas regiões 5' e 3' UTR, que são distintas para cada segmento gênico dos tospovírus (Kormelink *et al.*, 1992; van Poelwijk *et al.*, 1996) e atuam, respectivamente, como promotores e terminadores transcricionais. Até o momento poucos estudos foram realizados sobre as regiões 5' e 3' UTR de vírus do gênero *Tospovirus*, no entanto, em modelos produzidos para outros bunyavírus descobriu-se que as regiões promotoras de cada RNA viral subgenômico (5' UTR), em especial os derivados dos segmentos S e M, que

possuem estratégia de codificação ambisenso, apresentam diferentes taxas de transcrição dos mRNAs virais, o que foi confirmado por experimentos de genética reversa em que se trocou as regiões 5' UTR e 3' UTR entre os segmentos genômicos (Kohl *et al.*, 2004). Em adição, as regiões intergênicas dos segmentos S e M, ricas em A e U, funcionam como terminadores transcricionais por meio de uma estrutura secundária que foi recentemente estudada para TSWV usando uma metodologia similar à descrita acima, envolvendo a troca de regiões 3' UTR entre os dois mRNA codificados no segmentos S (Geerts-Dimitriadou *et al.*, 2011). Os resultados demonstraram que também há variabilidade da eficiência de terminação transcricional entre as diferentes regiões 3' UTR (Geerts-Dimitriadou *et al.*, 2011).

1.5.2. Diversidade e taxonomia de tospovirus

Até a última publicação do ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) 23 espécies já foram descobertas, sendo que 15 dessas são consideradas tentativas (Nichot *et al.*, 2005). No Brasil, foram relatadas sete espécies até o momento: TSWV, *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), e mais recentemente a nova espécie proposta como Bean necrotic mosaic vírus (BeNMV) (Pozzer *et al.*, 1999; de Ávila *et al.*, 1993; Resende *et al.*, 1996, De Oliveira *et al.* 2011). Inicialmente, TCSV e GRSV foram consideradas estirpes de TSWV, mas trabalhos sorológicos e moleculares estabeleceram diferenças e delimitaram a classificação taxonômica de espécie a partir da sequência de aminoácidos da nucleoproteína (N) (de Ávila *et al.*, 1993; Nichot *et al.*, 2005).

Para determinação de novas espécies a caracterização biológica e molecular se faz necessária para comparação da nova espécie proposta com as demais já caracterizadas. Com isso, espectro de hospedeiros, sintomatologia, ensaio de transmissão com tripes, testes sorológicos e análise genética da proteína N são comumente utilizados para caracterização, diferenciação e classificação taxonômica (Cortez *et al.*, 2001; Nichot *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2008; Hassani-Mehraban *et al.*, 2010). São consideradas novas espécies de tospovirus aquelas que apresentam identidade de sequência de aminoácidos da proteína N menor que 90% em relação às demais (Nichot *et al.*, 2005). Contudo, diversos trabalhos mostram que as sequências de aminoácidos das proteínas L, NSm e das glicoproteínas Gn e Gc apresentam

comportamento filogenético semelhante a proteína N, sugerindo que todas elas podem refletir a evolução natural das espécies de tospovírus (Silva *et al.*, 2001; Lovato *et al.*, 2004; Bertran *et al.*, 2011).

1.5.3 RNAs e Partículas Defectivas-Interferentes de Tospovírus

Até o momento só houve um relato de partículas defectivas interferentes para o gênero *Tospovirus*, realizado por Resende e colaboradores em 1991. Neste estudo, é descrita a geração de partículas virais deficientes em envelope por meio de mutações na ORF do precursor glicoproteico (GPp) de isolados de *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) e TSWV por meio de passagens seriadas por inoculação mecânica em alto MOI (Resende *et al.*, 1991).

Todos os RNAs defectivos-interferentes de tospovírus caracterizados até o momento são derivados do RNA L (Resende *et al.*, 1991). Eles são gerados por extensas deleções internas provocadas por erros (saltos) da polimerase viral, podendo reduzir a molécula do RNA L (8,9kb aproximadamente) em até 70% do seu comprimento, como no caso do DI estável de GRSV, que possui comprimento de 2.000nt, aproximadamente (Resende *et al.*, 1992). Sabe-se que a geração de DI para os tospovírus é um processo dependente da passagem serial de um inóculo em alta concentração (Resende *et al.*, 1991) – até o momento não foi descrita a geração de novo de defectivos para a família *Bunyaviridae* – e que a geração de DI é dependente da espécie hospedeira em que o vírus é propagado, e influenciada pela temperatura em que as plantas são mantidas (Inoue-Nagata *et al.*, 1997). Em adição, sabe-se que uma miríade de moléculas defectivas é produzida, com tamanhos variando entre 2 e 5kb e que os DI mais estáveis aparentemente são aqueles que preservam uma ORF truncada para a proteína L em suas sequências (Inoue-Nagata *et al.*, 1998). Desde 1998 nenhum outro estudo foi realizado sobre a descrição de novas características ou aplicações para os DI de tospovírus, no entanto, um pedido de patente recente (2008) aprovado nos EUA, de propriedade de uma companhia japonesa, descreve como inovação o uso de uma versão muito reduzida de molécula defectiva (211nt) derivada de um tospovírus para a defesa ampla e duradoura contra tospovírus na produção de plantas de crisântemo e com potencial de uso para muitas outras plantas cultiváveis de interesse agrícola (Atarashi e Sayama).

Objetivos e Hipóteses Científicas

Nesta dissertação de mestrado objetivou-se a caracterização molecular do RNA L de TCSV obtido durante este projeto de mestrado, e estabelecer as bases para um sistema de genética reversa para *Tospovirus* baseado em mini-genomas (DI) transcritos *in planta* por um sistema dependente da expressão de T7RPol *in planta* e do suprimento de todas as proteínas virais por meio da inoculação de isolados virais auxiliares livres de DI. As hipóteses científicas trabalhadas nesta dissertação foram:

- O uso da sequência de aminoácidos da proteína L dos tospovírus como critério taxonômico apresenta melhor poder de resolução filogenética do que a proteína N.
- A adição de uma sequência promotora do fago T7 é suficiente para gerar transcritos de RNA das construções de DI estáveis de GRSV e TSWV pela T7RPol por meio de transcrição run-off *in planta*.
- Transcritos contendo as extremidades 5' e 3' intactas dos segmentos L de GRSV e TSWV (DIs) serão reconhecidos pelas nucleoproteínas fornecidas por um vírus auxiliar, direcionando os transcritos para replicação *in planta*.
- Os transcritos dos DI gerados nas folhas simultaneamente agroinfiltradas com T7RPol, infiltradas com o cDNA dos DI e inoculadas com um tospovírus auxiliar serão incorporados à infecção viral e translocados célula a célula de maneira sistêmica.

Capítulo 2 - Caracterização Molecular da RNA Polimerase RNA Dependente de *Tomato chlorotic spot virus* (gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae*)

TCSV é um vírus de ssRNA(-) que pertence ao gênero *Tospovirus* e junto com *Groundnut ringspot virus* e *Tomato spotted wilt virus* é uma das espécies prevalentes deste gênero no Brasil. Este capítulo apresenta a busca por DIs de TCSV que culminou na obtenção e caracterização *in silico* de um cDNA correspondente ao RNA L deste vírus, que é composto por uma única ORF com 8619nt que codifica uma proteína de 2873 aminoácidos correspondente à RNA polimerase RNA dependente (proteína L). A análise filogenética de diferentes proteínas L confirma que TCSV é um membro do grupo americano de tospovírus, e a comparação da árvore filogenética baseada na proteína L com outra baseada na proteína N indica que a análise filogenética baseada na sequência da proteína L pode ser mais confiável do que a baseada na proteína N.

2.1 Introdução

O gênero *Tospovirus* (família *Bunyaviridae*) compreende vírus de ssRNA(-) que infectam plantas e artrópodes (*Thysanoptera:Thripidae*), diferentemente dos outros quatro gêneros desta família que infectam apenas mamíferos (*Hantavirus*), ou mamíferos e artrópodes (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Nairovirus*) (Nichot *et al.*, 2005). A organização do genoma compreende três segmentos designados de acordo com o tamanho em RNA L, RNA M e RNA S, codificando um total de 6 proteínas a partir de 5 mRNA virais. O RNA L codifica a proteína L, uma RpRd, no cRNA viral (Chapman *et al.*, 2003). A RpRd (proteína L) é uma proteína grande (> 2000 aminoácidos) e multifuncional responsável pela replicação do genoma viral e transcrição de todos os genes virais.

A proteína L é considerada uma proteína estrutural (está presente na partícula viral madura) já que se demonstrou estar associada ao RNA viral em um complexo denominado ribonucleoproteína (van Poelwijk *et al.*, 1993). Em adição, um trabalho recente realizado por Reguera e colaboradores (2010) demonstrou que a porção N-terminal da RpRd de *La Crosse virus* (*Orthobunyavirus*) possui papel no mecanismo de “cap-snatching” (Duijsings *et al.*, 2001) viral desempenhando função de RNA endonuclease.

Durante a propagação de inóculos de tospovírus por inoculação mecânica podem surgir versões defeituosas do RNA L que possuem tamanho menor do que o tipo selvagem deste segmento genômico (Resende *et al.*, 1991). Ao longo de várias passagens seriadas, estas versões defeituosas se acumulam preferencialmente em detrimento ao RNA L selvagem. Em adição, as versões defeituosas do RNA L, que nas primeiras passagens são muitas e distintas, perdem variabilidade e um tipo específico de RNA defeituoso passa a predominar (Inoue-Nagata *et al.*, 1998; Resende *et al.*, 1991). Este efeito de acumulação de versões defeituosas do RNA L está associado a um abrandamento dos sintomas provocados pelos isolados de tospovírus, o que confere a esses RNAs defeituosos um caráter interferente no processo de infecção, estes RNAs portanto são denominados defectivos interferentes (DIs). Efeitos de temperatura e espécie hospedeira possuem influência sobre a ocorrência e o tipo de DIs gerados por meio de passagem mecânica seriada de um inóculo, e até hoje a maior parte das informações disponíveis sobre DIs foram obtidas para poucas espécies de tospovírus. Nenhum estudo foi feito ainda sobre a produção de DIs em condições climáticas tropicais e para TCSV.

Os tospovírus possuem distribuição global, sendo que a América do Sul constitui a região de segunda maior diversidade do gênero com 11 espécies descritas (Pappu *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2011; Beikzadeh *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2012). Na América do Sul GRSV, TCSV e TSWV são as espécies prevalentes do gênero (De Ávila *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 2000). Enquanto GRSV foi descrito pela primeira vez como um isolado de TSWV infectando amendoim na África do Sul (De Ávila *et al.*, 1990), TCSV é um representante genuinamente brasileiro dos tospovírus, caracterizado como um isolado de tospovírus infectando tomate. Os sintomas provocados por TCSV causam a redução de produtividade para culturas economicamente importantes como tomate e pimentão por meio da indução de nanismo severo, necrose foliar e do caule e anéis necróticos nos frutos (Resende *et al.*, 1996). Recentemente, um isolado caracterizado por rearranjo

interespecífico foi descrito pela primeira vez, apresentando os segmentos S e L derivados de GRSV e o segmento M de TCSV (Webster *et al.*, 2011).

Este capítulo da dissertação apresenta a busca por novos DIs de tospovírus para a espécie TCSV que culminou no primeiro relato da sequência completa e análise *in silico* do L RNA de TCSV, assim como em uma comparação entre TCSV e outros tospovírus cujas sequências do RNA L estão disponíveis.

2.2 Metodologia

Inóculo viral

O inóculo viral de TCSV utilizado para a obtenção do L RNA chama-se BR-03 e foi obtido da coleção de isolados de tospovirus mantida no Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças – EMBRAPA. O vírus foi propagado em plantas de *Datura stramonium* por meio de inoculação mecânica como descrito por García-Cano e colaboradores (2006). As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob temperatura ambiente (mín. 12°C, máx. 31°C) entre os meses de junho a agosto de 2010.

Extração de RNA total e RT-PCR

RNA total foi extraído de folhas de *D. stramonium* sistemicamente infectadas com TCSV utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A obtenção do cDNA correspondente ao RNA L foi feita através de transcrição reversa seguida de PCR usando a enzima de transcrição reversa SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e duas sequências iniciadoras (primers) específicas, 'DI-sense' (5' AGAGCAATCAGGTAACAACG 3') e 'DI-antisense' (5' AGAGCAATCAGGTAACAAC 3') de acordo com o protocolo da enzima. A amplificação do RNA L foi realizada usando o mix enzimático Elongase Enzyme Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em protocolo otimizado para concentração final de 2mM de Mg²⁺ como recomendado pelo fabricante. As condições da PCR foram: 1 min. de hot-start a 80°C seguido de desnaturação inicial do cDNA a 94°C por 45 segundos e realização de 35 ciclos de amplificação – 94°C por 30 seg., 55°C por 45 seg. e 68°C por 9min. Os amplicons foram visualizados após eletroforese por gel de agarose a 1% (p/v) e coloração com brometo de etídio (EtBr). A eluição do fragmento intacto de

aproximadamente 9kbp foi feita com o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) seguindo as instruções do protocolo incluso.

Clonagem e sequenciamento do cDNA

A clonagem foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do vetor pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), gerando o plasmídeo AB8900. A clonagem foi confirmada por perfil de restrição usando as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* (Promega, Madison, WI, USA) (**Fig. 4**). As técnicas básicas de clonagem, extração de DNA plasmidial e eletroforese foram realizadas de acordo com os métodos descritos por Sambrook e Russell (2001).

O sequenciamento completo do plasmídeo AB8900 foi feito pela empresa Macrogen Corp. (Coreia do Sul) usando o método de Sanger automatizado em capilar (Williams e Soper, 1995), por meio de primer-walking (10 reações de sequenciamento) até a obtenção de um inserto com 8.868pb.

Análises in silico

A análise dos cromatogramas, a construção dos contigs e a predição de ORFs do RNA L usou o programa de bioinformática Staden Package (Staden, 1996) versão 1.7.0. Os alinhamentos múltiplos de sequências de aminoácidos e nucleotídeos e as árvores filogenéticas foram feitos usando o programa MEGA, versão 5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

As análises filogenéticas foram realizadas usando o algoritmo de Máxima Probabilidade (Maximum Likelihood) com mil replicatas (bootstrap). As sequências do RNA L dos seguintes vírus foram usadas para a análise comparativa: *Tomato spotted wilt virus* (NC_002052), *Impatiens necrotic spot virus* (NC_003625), *Iris yellow spot virus* (FJ623474), *Capsicum chlorosis virus* (NC_008302), *Melon yellow spot virus* (AB061774), *Watermelon silver mottle virus* (NC_003832), *Groundnut bud necrosis virus* (NC_003614), *Tomato zonate spot virus* (NC_010491), *Calla lily chlorotic spot virus* (FJ822961), *Groundnut ringspot virus* (NC_015469.1), *Watermelon bud necrosis virus* (GU731408.1), Bean necrotic mosaic virus (JF417980.1), Soybean vein necrosis associated virus (HQ728385.1) e a sequência de *Tomato chlorotic spot virus* (HQ700667.1) descrita neste estudo.

Ainda, outras análises *in silico* foram feitas com o aplicativo InterProScan (Quevillon *et al.*, 2005) para buscar similaridades entre a sequência de TCSV e domínios já conhecidos para outros vírus, e os programas ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) e SAPS (Brendel *et al.*,

1992) para descrever as propriedades físico-químicas da proteína L de TCSV. Os resultados produzidos por três diferentes algoritmos de busca de estruturas secundárias em sequências de aminoácidos – GOR4, HNN e SOPMA (Combet *et al.*, 2000) – foram superpostos manualmente e o consenso obtido foi usado para prever a estrutura secundária da proteína L deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do RNA L. As estruturas secundárias foram associadas à proteína L de TCSV somente quando havia consenso em pelo menos dois dos três algoritmos de busca. Regiões de alfa-hélice e folhas-beta menores do que 4 e 3 resíduos, respectivamente, foram excluídas da análise. Uma análise mais refinada da predição da estrutura secundária da proteína L foi feita para a região N-terminal a fim de comparar a estrutura predita com os resultados encontrados por Reguera e colaboradores. Para tanto, os resultados obtidos no consenso manual entre os três algoritmos citados acima foram comparados aos resultados do consenso produzido pelo algoritmo JPRED3 (Cole *et al.*, 2008). Quando houve desacordo entre os dois consensos sobre o tipo de estrutura secundária na sequência de aminoácidos, o segmento em desacordo foi considerado sem estrutura secundária. A análise de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos das **Tabelas 1 e 2** foi realizada com o aplicativo EMBOSS Stretcher. Com exceção dos programas Staden Package e MEGA, todos os outros algoritmos mencionados acima estão disponíveis através do sítio eletrônico ExPasy no endereço <http://expasy.org/tools/>.

2.3 Resultados e Discussão

Clonagem dos cDNAs derivados do RNA L de TCSV

De acordo com os resultados apresentados na **figura 4**, quatro bandas recorrentes de tamanhos correspondentes a 1250, 1600, 4000 e 8900pb foram obtidas após RT-PCR usando os primers DI-sense e DI-antisense. Estas bandas foram eluídas do gel e clonadas em vetor pGEM-T easy (fragmentos de 1250 e 1600pb) ou pCR4-TOPO (fragmentos de 4000 e 8900pb). A análise do perfil de restrição obtido com as enzimas *Apal*, *NotI* e *HindIII* para o plasmídeo contendo o inserto de 8900pb foi similar ao produzido em uma simulação *in silico*, indicando que a banda não se tratava de um artefato da reação de PCR ou de alguma forma de contaminação.

Análise do sequenciamento

O sequenciamento dos fragmentos de 1250, 1600 e 4000 pares de bases revelou que todos eles são fragmentos da RpRd viral e não DIs (dados não mostrados). O fragmento de 8900pb, no entanto, correspondente ao RNA L intacto de TCSV foi depositado sob o número de acesso HQ700667.1 no GenBank e em outros bancos de dados de sequências genéticas a ele associados. O segmento genômico L de TCSV tem comprimento de 8.868nt (A, 37,6%; C, 15,2%; T, 28,4% e G, 18,8%) e contém uma única ORF de 8619nt correspondente à proteína L (**Tabela 1**). A maior e menor identidade de nucleotídeos do RNA L de TCSV foram GRSV e Bean necrotic mosaic virus (BeNMV) com 82,1% e 56,9% de identidade, respectivamente. Os segmentos de TCSV e GRSV possuem a maior identidade em sequência de aminoácidos entre todos os segmentos de RNA L disponíveis nos bancos de dados, com 93,3%, enquanto a menor identidade de TCSV foi com BeNMV, um tospovírus pertencente a um possível novo grupo de tospovírus adaptados a hospedeiras leguminosas (soja e feijão) (De Oliveira *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011), no valor de 43,7%. A **Tabela 2** apresenta a matriz de identidade de aminoácidos mais completa disponível no momento para as espécies de tospovírus com sequências completas disponíveis da proteína L.

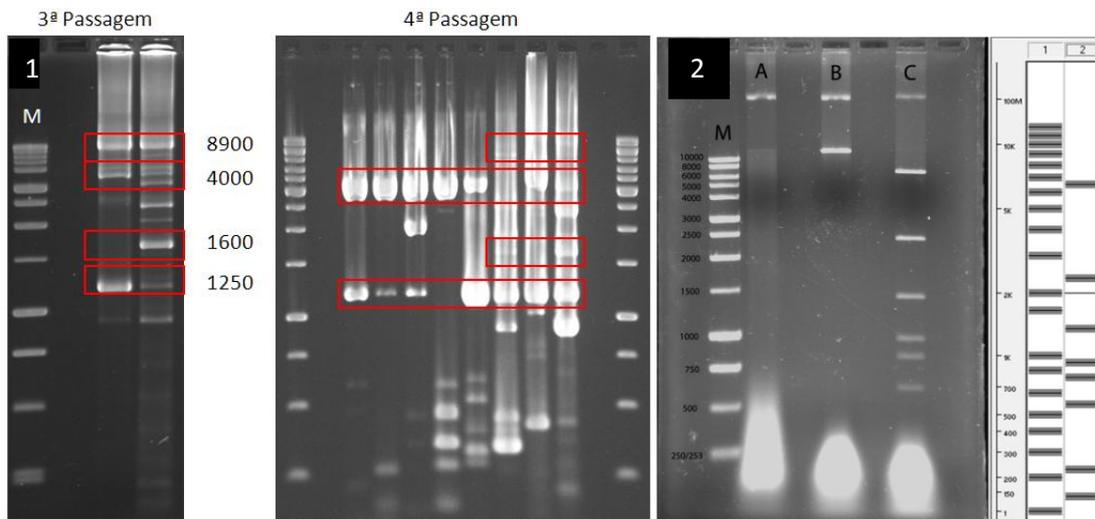


Figura 4. RT-PCR do isolado de *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) após 3ª e 4ª passagens seriadas e confirmação da clonagem do cDNA de 8,9kb no vetor pCR4-TOPO por análise eletroforética em gel de agarose a 1% (p/v). Em (1), os retângulos vermelhos ressaltam as bandas mais recorrentes na amplificação por RT-PCR de plantas infectadas com TCSV. AS bandas correspondentes a 1250, 1600, 4000 e 8900pb foram eluídas do gel e clonadas em vetor pGEM-T easy (1250 e 1600) ou pCR4-TOPO (4000 e 8900pb). Em (2), o gel apresenta o perfil de restrição do plasmídeo para *Apal* (A), *NotI* (B) e *HindIII* (C). De acordo com simulações *in silico*, o plasmídeo não contém sítios de *Apal* e *NotI*, por isso permanece intacto. O perfil de restrição obtido para *HindIII* na simulação (coluna 2) gera 8

Tabela 1 Comparação dos valores de identidade de nucleotídeos e aminoácidos entre *Tomato chlorotic spot virus* e outros tospovírus com sequências do RNA L disponíveis em bancos de dados

Nº de acesso no GenBank	Vírus (acrônimo)	Tamanho da ORF do RNA L (nt)	Ident. com a ORF L de TCSV (% nt)	Tamanho da proteína (aa)	Peso molecular (kDa)	Ident. com ptn. L de TCSV (% aa)
HQ700667.1	TCSV	8619	100	2873	330,740	100
NC_002052	TSWV	8625	78,7	2875	331,503	85,5
NC_003625	INSV	8595	70,1	2865	330,260	71,6
FJ623474	IYSV	8619	58,5	2873	331,141	46,6
NC_008302	CaCV	8631	58,8	2877	331,328	45,9
NC_003614	GBNV	8631	58,5	2877	330,926	45,8
NC_010491	TZSV	8655	58,5	2885	333,098	45,2
FJ822961	CCSV	8649	59,1	2883	332,047	45,6
NC_003832	WSMoV	8634	58,6	2878	331,777	45,8
AB061774	MYSV	8610	58,3	2870	330,212	46,0
NC_015469.1	GRSV	8622	82,2	2874	330,562	93,3
JF417980.1	BeNMV	8796	56,9	2932	336,021	43,7
HQ728385.1	SVNaV	8793	57,3	2931	336,482	43,9
GU731408.1	WBNV	8634	58,4	2878	331,852	45,7

TCSV *Tomato chlorotic spot virus*, TSWV *Tomato spotted wilt virus*, INSV *Impatiens necrotic spot virus*, IYSV *Iris yellow spot virus*, CaCV *Capsicum chlorosis virus*, GBNV *Groundnut bud necrosis virus*, TZSV *Tomato zonate spot virus*, CCSV *Calla lily chlorotic spot virus*, WSMoV *Watermelon silver mottle virus*, MYSV *Melon yellow spot virus*, GRSV *Groundnut ringspot virus*, BeNMV *Bean necrotic mosaic virus*, SVNaV *Soybean vein necrosis associated virus*, WBNV *Watermelon bud necrosis virus*

Tabela 2 Matriz de identidade de aminoácidos entre espécies de tospovírus para a proteína L (RNA polimerase RNA dependente)

	TCSV	TSWV	GRSV	INSV	IYSV	CaCV	CCSV	MYSV	GBNV	TZSV	WSMoV	BeNMV	SVNaV	WBNV
TCSV	100	85,5	93,3	71,6	46,6	45,9	45,6	46,0	45,8	45,2	45,8	43,7	43,9	45,7
TSWV		100	86,1	68,5	44,2	44,0	43,8	44,1	44,1	43,7	43,6	42,0	42,1	44,1
GRSV			100	71,4	46,7	46,2	45,8	46,1	46,1	45,6	46,3	43,7	44,2	46,2
INSV				100	45,9	45,3	45,0	45,2	45,4	44,9	45,9	43,5	43,2	45,6
IYSV					100	68,3	66,4	67,4	67,3	65,5	68,2	42,3	43,1	67,8
CaCV						100	76,7	76,0	89,9	76,2	90,7	42,5	43,3	88,5
CCSV							100	73,7	76,5	88,7	76,9	42,1	42,0	76,2
MYSV								100	75,9	73,1	75,6	42,8	43,1	75,6
GBNV									100	75,5	91,2	43,0	43,3	90,6
TZSV										100	76,3	41,4	41,6	75,8
WSMoV											100	43,0	43,3	90,1
BeNMV												100	73,9	42,9
SVNaV													100	43,3
WBNV														100

TCSV *Tomato chlorotic spot virus*, TSWV *Tomato spotted wilt virus*, INSV *Impatiens necrotic spot virus*, IYSV *Iris yellow spot virus*, CaCV *Capsicum chlorosis virus*, GBNV *Groundnut bud necrosis virus*, TZSV *Tomato zonate spot virus*, CCSV *Calla lily chlorotic spot virus*, WSMoV *Watermelon silver mottle virus*, MYSV *Melon yellow spot virus*, GRSV *Groundnut ringspot virus*, BeNMV *Bean necrotic mosaic virus*, SVNaV *Soybean vein necrosis associated virus*, WBNV *Watermelon bud necrosis virus*

Caracterização molecular do RNA L de TCSV

A proteína L de TCSV possui 2873aa com peso molecular predito de 330,74kDa e ponto isoelétrico (pI) igual a 6,00. A análise feita com SAPS predisse um cluster negativamente carregado entre os aminoácidos 2842 e 2873. Dois motivos foram reconhecidos na sequência de aminoácidos de TCSV pelo aplicativo InterProScan, denominados 'bunyaviral RNA-dependent RNA polymerase' (bunya_RdRp) e 'negative single-stranded RNA virus RNA-directed RNA polymerase' (ssRNA_RdRp). Estes motivos estão descritos na database PROSite sob os números de acesso PF04196 e PS50525, respectivamente. O motivo 'ssRNA_RdRp' está contido dentro do motivo bunya_RdRp, como demonstrado na **Figura 5**.

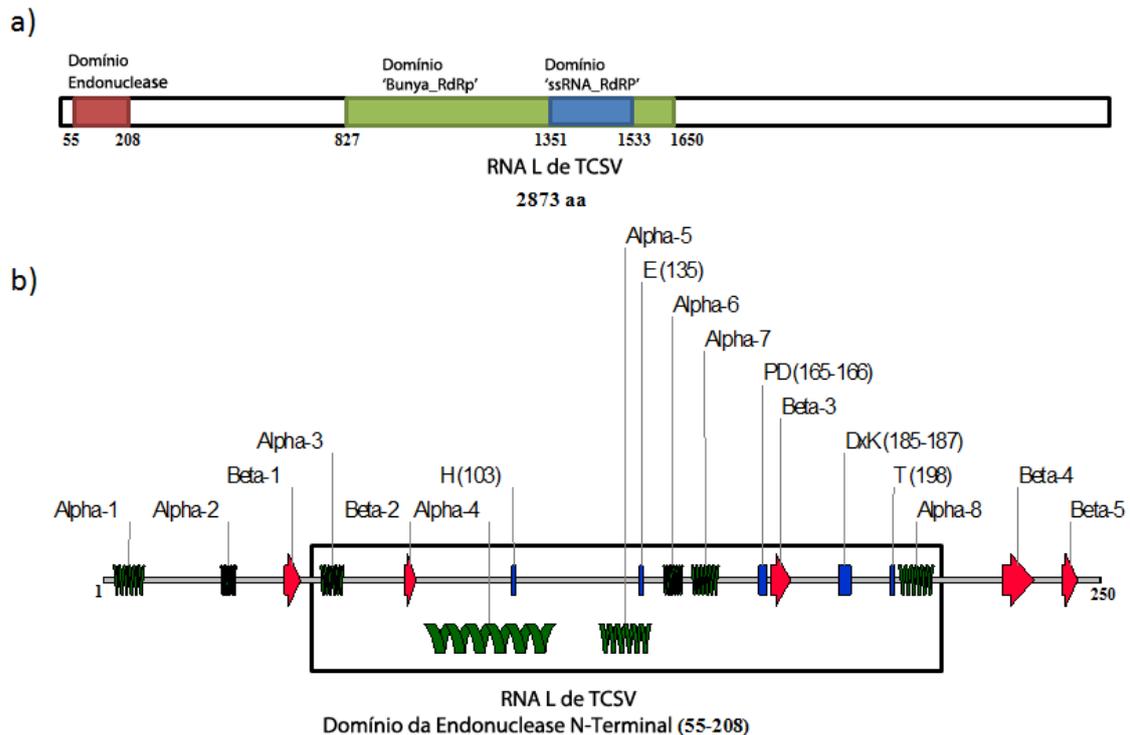


Figura 5. Busca de domínios e predição da estrutura secundária da proteína L de *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) por análise *in silico*. a) Representação esquemática da proteína L de TCSV (2873aa). Dois domínios foram identificados pelo programa InterProScan, assim como foi confirmado um domínio putativo de endonuclease por meio da predição de estrutura secundária e comparação com a estrutura descrita por Reguera e colaboradores (2010) para *La Crosse virus* (LaCV). b) Características estruturais secundárias dos primeiros 250 aminoácidos da proteína L de TCSV obtidas pelo consenso entre diferentes algoritmos de predição (GOR4, HNN, SOPMA e JPRED3). H...E...PD...DxK...T são aminoácidos conservados do domínio putativo da endonuclease encontrado em LaCV. Na figura estes aminoácidos estão numerados de acordo com suas posições na sequência da proteína L. O domínio de endonuclease está localizado entre os aminoácidos 55 e 208 (área contida dentro do retângulo). Na figura, as marcações em verde correspondem a regiões de alfa-hélice e as marcações em vermelho correspondem às folhas-beta. Em azul estão enfatizados os aminoácidos conservados característicos do domínio de endonuclease.

O motivo ssRNA_RdRp é encontrado em todas as polimerases de vírus de ssRNA(-) e corresponde aos domínios catalíticos conservados (preA e A-E) associados a atividade nucleotidil transferase promovida por esta classe de enzimas (O'reilly e Kao, 1998).

Análises filogenéticas

Foram realizadas análises filogenéticas baseadas em sequências disponíveis das proteínas L e N de tospovírus. Após o alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos usando o algoritmo Muscle com 8 iterações baseadas em Neighbor Joining, utilizou-se o algoritmo Best-Fit Model para a determinação do melhor modelo de evolução molecular possível utilizando o método de Máxima Probabilidade (Maximum Likelihood) para cada alinhamento. O modelo escolhido para a filogenia baseada na proteína L foi JTT+G(4)+I+F enquanto o modelo para a proteína N foi WAG+G(4). As duas árvores filogenéticas foram calculadas utilizando 1.000 replicatas (bootstrap). Todos os algoritmos mencionados acima fazem parte do programa de análises filogenéticas Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011). Os resultados confirmaram que nas duas filogenias TCSV é um membro do grupo americano de tospovírus, como esperado (**Fig. 6**).

Em comparação a filogenias anteriores baseadas no gene N (De Ávila *et al.*, 1993) ou nas comparações utilizando as sequências de aminoácidos da proteína NSm e das glicoproteínas Gn e Gc que apresentaram comportamento filogenético semelhante a proteína N (Silva *et al.*, 2001; Lovato *et al.*, 2004), o uso do método de Máxima Probabilidade ao invés de Agrupamento de Vizinhos (Neighbor Joining) e a adição de novas espécies as árvores apresentadas na **Figura 6** parecem tornar menos clara a história evolutiva de algumas das espécies sul-americanas (GRSV, TCSV e TSWV). Em classificações anteriores GRSV e TCSV descendem de um mesmo ancestral comum, distinto do ancestral comum de TSWV, enquanto na classificação apresentada neste estudo as três espécies descendem de um mesmo ancestral comum e a diferença entre elas é uma medida da quantidade de mutações acumuladas em relação ao ancestral comum. Neste sentido, a filogenia baseada na proteína L apresenta uma resolução da história evolutiva dessas três espécies mais próxima da filogenia comumente aceita para o gênero *Tospovirus* (Nichot *et al.*, 2005) do que a filogenia baseada na proteína N.

Além do caso mencionado acima para a evolução de TSWV, TCSV e GRSV, existem outras diferenças topológicas entre as duas filogenias propostas neste estudo. A resolução

da história evolutiva para o grupo de tospovírus asiáticos WSMoV, CaCV, GBNV e WBNV parece ser melhor para a proteína L do que a proteína N (**Fig. 6**).

Outro ponto da evolução do gênero *Tospovirus* em que as proteínas L e N divergem é sobre o Novo Grupo de *Tospovirus*, aparentemente especializados na infecção de plantas leguminosas. Estas novas espécies-tentativas do gênero *Tospovirus* possuem círculo de hospedeiros muito restrito, apresentam um domínio C-terminal rico em lisinas que não ocorre em nenhuma das outras espécies de *Tospovirus* caracterizadas (De Oliveira *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011) e filogeneticamente divergem de todas as outras espécies de *Tospovirus* conhecidas (**Fig. 6**). Análises filogenéticas prévias indicam, no entanto, que BeNMV e SVNaV estão mais proximamente relacionadas ao gênero *Tospovirus* do que a qualquer outro gênero da família *Bunyaviridae* (dados não mostrados).

Na **Figura 6**, quando a proteína L é usada como caractere taxonômico, o Novo Grupo diverge dos demais grupos de tospovírus na posição mais ancestral da filogenia e aparece como um ramo paralelo aos grupos de tospovírus já conhecidos. A filogenia baseada na proteína N posiciona o Novo Grupo como descendente do ancestral comum de todas as espécies do gênero, e sua separação dos grupos conhecidos de tospovírus é caracterizada pelo surgimento de um ramo paralelo ao ancestral comum do Grupo Americano. Ainda não há dados disponíveis, no entanto, para afirmar qual das duas filogenias é mais precisa quanto ao posicionamento do Novo Grupo na evolução do gênero *Tospovirus*.

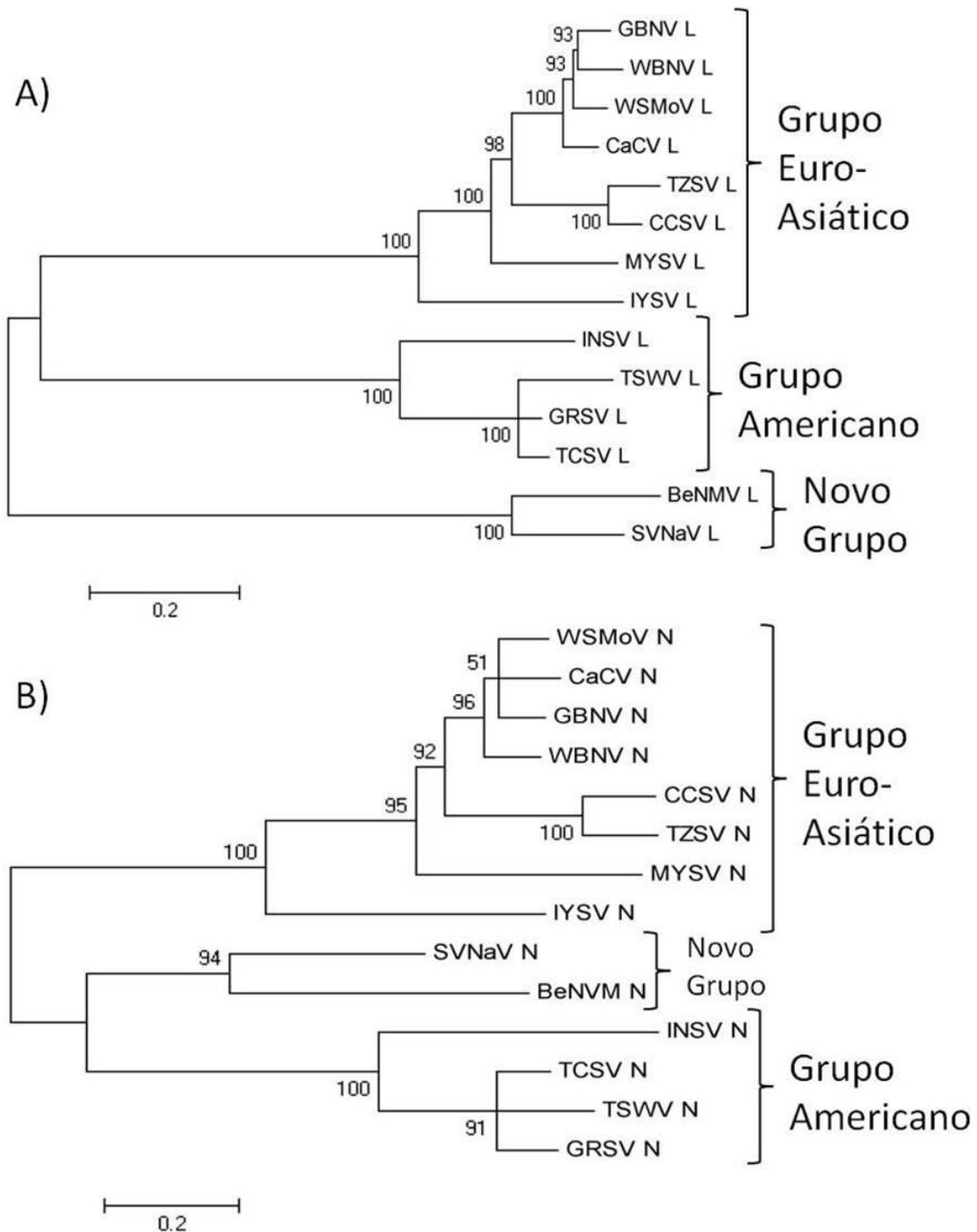


Figura 6. Análises filogenéticas de tospovírus. A) Filogenia do gênero *Tospovirus* baseada na sequência de aminoácidos da proteína L. B) Filogenia baseada na proteína N como caractere taxonômico. O algoritmo de Máxima Probabilidade (Maximum Likelihood) usando os modelos de evolução molecular JTT + G(4) + I + F e WAG + G(4) com 1.000 replicatas foi empregado, respectivamente, para resolver a evolução das proteínas L e N. Os valores de confiabilidade para os mesmo eventos evolutivos são maiores quando a proteína L é utilizada como critério taxonômico, em detrimento a proteína N. Os acrônimos utilizados para nomear as espécies estão explicitados nas Tabelas 1 e 2.

A filogenia baseada na proteína L parece ser mais confiável quanto à distinção entre espécies do que a proteína N, o que é evidenciado por valores de confiabilidade maiores para os eventos filogenéticos baseados nos algoritmos de análise filogenética utilizados. Isso indica que a filogenia baseada na proteína L pode ser mais representativa das mudanças evolutivas já fixadas entre as espécies do gênero, por ser uma proteína mais conservada do que a proteína N e estar sob forte pressão negativa de seleção enquanto, aparentemente, a proteína N está sob pressão positiva de seleção, é mais variável do que a proteína L. Em outras palavras, por ser uma proteína menos variável do que a proteína N, quando a distância evolutiva entre as espécies do gênero *Tospovirus* é avaliada usando a proteína L como critério taxonômico, tem-se uma indicação da fixação dos eventos de especiação, enquanto a maior variabilidade da proteína N indica tendências de especiação.

A diferenciação entre GRSV e TCSV é um bom exemplo da análise feita acima. Neste caso, o valor de confiabilidade do evento de diferenciação entre TCSV e GRSV aferido pelo uso da proteína N como critério taxonômico é de 91%, enquanto a filogenia baseada na proteína L revela um valor de confiabilidade para este evento de especiação igual a 100% (**Fig. 6**). Existem claro, outros fatores relevantes para a classificação de isolados como espécies distintas como o círculo de hospedeiros, a sintomatologia provocada pelo isolado e o local de ocorrência do isolado. Para TCSV e GRSV estes fatores de classificação foram importantes para a separação dos isolados em duas espécies distintas já que para essas espécies há reação cruzada em ensaios de detecção usando métodos imunológicos (De Ávila *et al.*, 1990; De Ávila *et al.*, 1993a,b). No entanto, métodos imunológicos ainda são comumente utilizados para a diagnose rotineira de isolados, o que pode levar a erros como o ocorrido neste estudo em que se pensava, originalmente, que o isolado obtido era de GRSV e não TCSV. À época da publicação do artigo referente a este estudo (Bertran *et al.*, 2011), não havia outras sequências (parciais ou completas) depositadas do RNA L de TCSV ou GRSV com as quais se pudesse comparar o resultado do sequenciamento do isolado utilizado, a fim de evitar a classificação incorreta da sequência produzida neste estudo.

Pouco tempo após a publicação do artigo científico produzido por nosso grupo, um artigo escrito por Webster e colaboradores (2010) relatou a primeira ocorrência de GRSV no hemisfério norte e tornou pública as sequências completas para os três segmentos gênicos do isolado e duas sequências parciais de referência para o RNA L de TCSV e GRSV. Com estes dados em mãos, pudemos fazer uma comparação da sequência obtida do isolado utilizado

neste estudo com o RNA L completo do isolado descrito por Webster e colaboradores e com as sequências de referência por eles depositadas. A comparação demonstrou que a sequência depositada pelo nosso grupo de pesquisa era 82,1% idêntica à sequência depositada por Webster e colaboradores para o RNA L de GRSV e 95,5% idêntica à sequência de referência por eles utilizada para TCSV. Frente à ocorrência, recentemente descrita (Webster *et al.*, 2011), de rearranjos entre segmentos virais de espécies distintas para o gênero *Tospovirus*, clonamos e sequenciamos o gene da proteína N e da proteína NSm do mesmo isolado utilizado em nosso estudo. Os resultados revelaram que se tratava de um isolado intacto de TCSV e não de um isolado derivado de rearranjo. Estes resultados foram publicados na forma de uma errata ao artigo original (Bertran *et al.*, 2011).

Caracterização do domínio N-terminal endonucleolítico da proteína L de TCSV

Em um trabalho recente publicado por Reguera e colaboradores (2010) foi proposta a presença de um domínio N-terminal na proteína L com atividade endonucleolítica de RNA, imprescindível para a ocorrência do “cap-snatching” em *Bunyaviridae* a partir da análise cristalográfica de fragmentos da região N-terminal da proteína L de *La Crosse virus* (*Hantavirus*) associada a uma análise de resíduos de aminoácidos conservados presentes neste fragmento. No intuito de caracterizar molecularmente a proteína L de TCSV, análises *in silico* buscando os resíduos de aminoácidos conservados foram feitas e provou-se que eles estão presentes na região N-terminal da proteína L de TCSV entre os aminoácidos 55 e 208 (**Fig. 5**). A ocorrência dos resíduos de aminoácidos conservados pode estar relacionada à manutenção de uma estrutura secundária preservada para este domínio (Gherardini e Helmer-Citterich, 2008). Portanto, foi feita a predição da estrutura secundária dos primeiros 250 aminoácidos de TCSV, baseando-se no consenso entre quatro diferentes algoritmos de busca de estrutura secundária: GOR4, HNN, SOPMA e JPRED3 (**Fig. 5**). O resultado encontrado reflete que ao menos os dois resíduos universalmente conservados associados à função endonucleolítica da porção N-terminal da proteína L dos vírus de ssRNA(-) segmentados (H e PD) (Reguera *et al.*, 2010) estão corretamente posicionados no domínio N-terminal de TCSV em relação às estruturas secundárias a eles associados.

Permanece ainda por ser pesquisado, no entanto, se a região N-terminal da proteína L de TCSV possui um domínio de ligação a ácidos nucleicos, que seria responsável pelo sequestro e coordenação de mRNAs celulares no processo de cap-snatching. Entretanto,

evidências provenientes do estudo da polimerase de Influenza A, indicam que as duas extremidades da proteína L (N e C-terminal) parecem participar da coordenação de mRNAs celulares e virais, enquanto a porção central da proteína L desempenharia a função de polimerase propriamente dita (Reguera *et al.*, 2010).

2.4 Perspectivas do trabalho

O clone contendo o RNA L de TCSV está sob comando do promotor T7 e pode ser utilizado para a produção *in vitro* do RNA L, ou ainda como fonte para a construção de um plasmídeo de expressão contendo a ORF da proteína L. Uma vez que possuímos o RNA L completo, obtido a partir de um único cDNA de 8,9kb, é possível usar o mesmo inóculo como fonte para os RNAs M e S, visando a construção de um clone infeccioso de TCSV a partir da co-transfecção de plasmídeos contendo os três segmentos genômicos virais e plasmídeos de expressão para *Agrobacterium* contendo os genes da proteína N e L em culturas vegetais celulares em suspensão (BY-2) estavelmente expressando a proteína T7RPol ou em protoplastos de *N. benthamiana*, com a adição de um plasmídeo de expressão para o gene da T7RPol.

2.5 Agradecimentos

Este projeto de pesquisa foi apoiado financeiramente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

Capítulo 3 - Desenvolvimento de um Sistema de Genética Reversa de Tospovírus via Moléculas de RNA Defectivo-Interferente (DI RNA)

A partir do desenvolvimento de sistemas de genética reversa para o estudo dos vírus de ssRNA(-) houve um salto na quantidade e na aplicabilidade do conhecimento produzido para esta classe viral. No entanto, os vírus de planta foram pouco beneficiados por esta revolução científica já que barreiras técnicas ao desenvolvimento de culturas celulares vegetais e métodos eficientes de inoculação viral ainda não foram totalmente superadas. O gênero *Tospovirus* compreende o único gênero da família *Bunyaviridae* que tem como hospedeiro células vegetais. As doenças provocadas pelas espécies deste gênero são de extrema relevância para o agronegócio. A espécie-tipo do gênero, *Tomato spotted wilt virus*, figura como o segundo patógeno viral de plantas de maior relevância para a fitopatologia de acordo com uma recente votação entre os pesquisadores da área (Scholthof *et al.*, 2011), no entanto ainda não existe um sistema de genética reversa disponível para o seu estudo (ou dos outros membros do gênero *Tospovirus*). Neste capítulo é feito um histórico da construção de sistemas de genética reversa para a família *Bunyaviridae*, seguido da descrição de uma estratégia de desenvolvimento de genética reversa pioneira para esta família viral a partir do uso de RNAs defectivos-interferentes *in planta*.

3.1 Introdução

A família *Bunyaviridae* compreende vírus de ssRNA(-) envelopados com genoma tri-segmentado e morfologia circular da partícula viral. São ao todo cinco gêneros pertencentes a essa família, *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus* e *Tospovirus*, sendo que desses, somente o gênero *Hantavirus* não é transmitido por meio de vetores da classe *Insecta* (a transmissão é do tipo circulativa-propagativa) (Nichot *et al.*, 2005).

O gênero *Tospovirus* é o único entre os bunyavírus formado por vírus que infectam plantas. Os três RNAs genômicos do gênero são divididos por tamanho em RNA L (Large), M

(Medium) e S (Small), assim como para os outros gêneros da família *Bunyaviridae*. No entanto, codificam, respectivamente, a proteína L (RpRd), as proteínas NSm (ptn. de movimento) e Gn/Gc (glicoproteínas do envelope) e as proteínas NSs (ptn. supressora de silenciamento gênico) e N (ptn. do nucleocapsídeo) (Nichot *et al.*, 2005), enquanto para *Hantavirus* e *Nairovirus* não há genes ortólogos à NSm e NSs e para *Phlebovirus* e *Orthobunyavirus* há proteína NSs e um gene ortólogo à NSm, mas com função distinta.

A espécie-tipo do gênero *Tospovirus*, Tomato spotted wilt virus, infecta mais de mil espécies hospedeiras distintas e é uma das maiores causadoras de prejuízos à produção agrícola (os vírus perdem apenas para os fungos neste aspecto) (Pappu *et al.*, 2009). O gênero é composto ainda por mais 23 espécies que infectam hortaliças, plantas ornamentais e fabáceas (feijão e soja) (Pappu *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011).

A genética reversa de vírus de ssRNA(-) segmentados começou com o relato da primeira partícula viral de *Bunyamwera virus* (BUNV) gerada completamente a partir de cDNAs e três plasmídeos de expressão contendo as proteínas N, L e o precursor glicoproteico de Gn e Gc (GPp) sob comando do promotor T7 (Bridgen e Elliott, 1996). Desde então foram produzidos mais de 20 artigos relatando a montagem das partículas virais (Kohl *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2010) e a análise funcional das proteínas Gn e Gc (Shi *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2007), NSm (Shi *et al.*, 2006), NSs (Bridgen *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2002; Kohl *et al.*, 2003; Streitenfeld *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2006) e N (Kohl *et al.*, 2004; Lowen e Elliott, 2005; Blakqori *et al.*, 2009), publicados nas revistas de maior impacto da área (e.g. Journal of Virology).

Recentemente, Geerts-Dimitriadou e colaboradores (2011) relataram o uso eficiente de um dos sistemas desenvolvidos para genética reversa de *Bunyamwera virus* (Lowen *et al.*, 2004) aplicado à genética reversa de tospovírus. Este sistema, no entanto, utiliza células de mamífero (BHK) modificadas para expressão constitutiva do gene da T7RPol e pode não representar um bom modelo para analogias ao comportamento do vírus em células vegetais. Em adição, o trabalho de Geerts-Dimitriadou e colaboradores não visou o resgate de partículas virais de *Tospovirus*, mas sim, o estudo da função das regiões intergênicas dos RNAs M e S utilizando um sistema repórter baseado em luciferase e na expressão das proteínas N e NSs de TSWV. A genética reversa de tospovírus, portanto, ainda é um campo em aberto.

Existem algumas alternativas disponíveis para os pesquisadores que desejam desenvolver um sistema de genética reversa de tospovírus como: i) o uso de células de tripes mantidas em cultura (Nagata *et al.*, 1997). No entanto, esta linhagem celular foi perdida e nenhuma tentativa nova de produção de linhagens celulares a partir de tecidos de tripes foi feita desde então (prof. Dr. Tatsuya Nagata, comunicação pessoal 2011); ii) o cultivo de gametóforos de *Physcomitrella patens* (Huhns *et al.*, 2003) uma espécie de musgo altamente permissiva a modificações genéticas por meio de recombinação homóloga (as taxas de recombinação chegam a 90% de eficiência); iii) a produção de protoplastos, utilizada com sucesso em diversos estudos, principalmente sobre a função da proteína NSm de tospovírus (Storms *et al.*, 1995; Kikkert *et al.*, 1997; Steinecke *et al.*, 1998; Kikkert *et al.*, 1999; Lewandowski e Adkins, 2005; Ribeiro *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009b). Neste caso, de 4 a 7 plasmídeos devem ser transfetados (por eletroporação, agroinfiltração ou fusão de lipossomos) simultaneamente para o resgate de partículas virais; iv) o uso de culturas celulares vegetais em suspensão (e.g. BY-2) expressando constitutivamente o gene da T7RPol e transfetadas por meio de agroinfiltração com pelo menos 3 plasmídeos ao mesmo tempo; v) o uso de RNAs defectivos-interferentes (DIs) como mini-genomas, aptos ao estudo das características necessárias de um RNA tipo-viral para o reconhecimento e replicação da RpRd, estudos transcricionais e de regulação da expressão gênica e uso como molécula repórter para o estudo do ciclo infeccioso e empacotamento de novas partículas virais em tempo real.

Neste capítulo é descrita a construção de um sistema de transcrição *in planta* baseado em T7 RNA polimerase (T7RPol) e auxiliado pela inoculação de isolados de tospovírus livres de DIs para a amplificação dos cDNAs dos DIs estáveis de TSWV (3,1kb) e GRSV (2,0kb). Os resultados iniciais demonstram que, em pelo menos uma ocasião, houve transcrição dos cDNAs inoculados pela T7RPol após 72hs da infiltração dos cDNAs no tecido vegetal. Como as moléculas de RNA dos DIs possuem as extremidades terminais complementares e formam estruturas secundárias na forma de cabo de panela (pan-handle) assumiu-se que elas podem ter sido endereçadas para degradação nesses experimentos preliminares, sem a inoculação dos vírus auxiliares. Nos experimentos realizados com a inoculação do vírus auxiliar, no entanto, não foi possível detectar a replicação ou acúmulo dos DIs por meio de northern blotting, possivelmente pelo não funcionamento da agroinfiltração com o gene da T7RPol. Perspectivas futuras para o desenvolvimento do

sistema de genética reversa baseada no uso de RNAs defectivos incluem a adição de ribozimas às moléculas dos DI, testes com outros promotores transcricionais, clonagem dos DIs em vetores binários e mudanças dos intervalos e da ordem de inoculação da T7RPol, DIs e vírus auxiliar.

3.2 Metodologia

Inóculos Virais e Plantas Hospedeiras

Seis isolados virais distintos coletados no campo ou preservados a -80°C a partir de plantas infectadas no campo, três de TSWV ('TSWV SP', 'TSWV Pimenta' e TSWV 'Fruto') e três de GRSV ('GRSV Tospo Campo', 'GRSV Tospo CNPH' e 'GRSV Fernanda') foram obtidos da coleção de isolados de tospovirus do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPH, Embrapa) e propagados em plantas de pimentão (*Capsicum chinense* PI), *Datura stramonium* ou *Nicotiana benthamiana* por inoculação mecânica (Garcia-Cano *et al.*, 2006) para identificação. Após o surgimento de sintomas em folhas sistemicamente infectadas, estas foram coletadas e armazenadas a -80°C . Os isolados foram analisados para a presença de RNAs defectivos-interferentes por meio de Northern Blotting (**Fig. 10**). Foram feitos dois géis desnaturantes nos quais se correu as mesmas amostras de RNA total coletadas de folhas sistemicamente infectadas a 14 d.p.i. para os seis isolados obtidos da Embrapa-CNPH. Os isolados foram dispostos no gel (e conseqüentemente nas membranas) na seguinte ordem: 1 – TSWV SP; 2 – GRSV Tospo Campo; 3 – GRSV Tospo CNPH; 4 – TSWV Pimenta; 5 – TSWV Fruto; 6 – GRSV Fernanda. Cada uma das membranas referentes aos géis foi hibridizada com uma sonda diferente (**Fig. 10**).

Para os experimentos de transcrição *in planta* dos DIs para a prova conceitual de funcionamento do sistema de genética reversa para *Tospovirus* utilizou-se apenas plantas de *N. benthamiana* jovens (entre 5-7 folhas verdadeiras) mantidas em casa de vegetação entre dezembro de 2011 e janeiro de 2012.

RT-PCR e clonagem

Os isolados de tospovirus escolhidos para os experimentos de transcrição dos DIs *in planta* tiveram o gene N identificado por sequenciamento (Macrogen Corp., Coreia do Sul) para confirmação dos resultados obtidos nos experimentos de hibridização. Para tanto, $1\mu\text{L}$

do RNA total de cada amostra selecionada foi utilizado para reação de RT-PCR usando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados dois primers para a transcrição dos cDNAs, J13 e UHP (Cortez *et al.*, 2001) que são primers conservados e se anelam respectivamente, nas extremidades 5' e 3' dos três segmentos gênicos de tospovírus e na região intergênica dos segmentos M e S. A amplificação por PCR foi feita com a enzima *Taq* Platinum DNA Polymerase (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante usando temperatura de anelamento dos primers de 50°C e tempo de extensão de 3min. Devido a certa inespecificidade esperada, especialmente para o primer J13, mais uma rodada de RT-PCR e clonagem em pGEM-T easy foi realizada, de acordo com as instruções dos fabricantes, desta vez utilizando primers específicos para a amplificação da proteína N de TCSV, GRSV e TSWV, gentilmente cedidos pela Dra. Mariana Halwass (Embrapa-CNPH).

Os produtos de PCR foram eluídos após eletroforese usando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) de acordo com o manual incluído. As bandas eluídas foram quantificadas usando Nanodrop (Thermo Scientific) e as reações de ligação realizadas por 16h, de acordo com as orientações do manual do plasmídeo pGEM-T easy (PROMEGA). No mínimo dez clones de cada transformação foram analisados por extração de DNA plasmidial e digestão com a enzima *EcoRI* (New England Biolabs - NEB). Os clones que continham os insertos foram novamente crescidos em 5mL de meio líquido contendo os antibióticos apropriados e a extração de DNA plasmidial feita com o kit PureLink™ Quick Plasmid Mini-prep (Invitrogen). Em seguida, os DNAs plasmidiais foram quantificados por Nanodrop e as amostras tiveram suas concentrações ajustadas para o envio à Macrogen Corp, Coreia do Sul. Os cromatogramas foram analisados usando o programa Staden Package (Staden, 1996) versão 1.7.0. As sequências obtidas foram comparadas ao banco de dados completo (nr) do GenBank usando a ferramenta BLASTn.

RNAs defectivos-interferentes

Os RNAs defectivos-interferentes utilizados neste estudo foram descritos por Resende e colaboradores (1992) e são as formas mais estáveis (sempre encontradas em maior concentração) de DIs dos isolados BR-01 (TSWV) e SA-05 (GRSV). Os DIs foram inicialmente resgatados a partir de plasmídeos pBSK+ (Stratagene) por PCR utilizando os primers 'DI-sense' (5' AGAGCAATCAGGTAACAACG 3') e 'DI-antisense' (5'

AGAGCAATCAGGTAACAACACT 3') e clonados em pGEM-T easy (PROMEGA) de acordo com o manual do sistema de clonagem. Após a clonagem, os plasmídeos foram sequenciados (Macrogen Corp., Coreia do Sul) a fim de confirmar a integridade das suas ORFs e dos terminais 5' e 3'. A preparação dos clones para sequenciamento seguiu as mesmas recomendações descritas acima.

Para utilização nos experimentos de transcrição *in planta* foi desenhado um novo par de primers adicionando o promotor T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') ao primer 'DI-sense', resultando no primer DI T7 Promoter (5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAATCAGGTAACAACG 3') e o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *BspEI* (5' T[▼]CCGGA 3') ao primer 'DI-antisense' resultando no primer DI *BspEI* (5' TCCGGAGAGCAATCAGGTAACAACACT) (**Fig. 7**).

Os amplicons obtidos com esses primers foram mais uma vez clonados em pGEM-T easy e confirmados por digestão utilizando as enzimas de restrição *BspEI* (NEB) e *AccIII* (PROMEGA) (isoesquízômeros) de acordo com as instruções dos fabricantes (**Fig. 8**). Como ambas as enzimas são sensíveis a metilação do tipo dam presente nos plasmídeos replicados em células da linhagem DH5 α de *E. coli* comumente utilizada no laboratório para a produção de células eletrocompetentes, novas células eletrocompetentes foram produzidas para uma linhagem de *E. coli* deficiente na produção de metilações dos tipos dam e dcm, JM110 (Stratagene), a fim de confirmar a incorporação correta do sítio de restrição às moléculas dos DIs. Ainda outra enzima de restrição foi utilizada nos experimentos de infiltração para linearizar os plasmídeos contendo os DIs de GRSV e TSWV derivados de *E. coli* DH5 α , *SacI*-HF (NEB), localizada 49pb após o término da sequência dos DIs.

Construção do vetor binário pBinT7RPol

O vetor binário pBinT7RPol foi construído a partir da clonagem de um inserto derivado do vetor binário pRAPS-T7. O vetor pRAPS possui o promotor 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e o terminador da enzima nopalina-sintase, que não estão presentes em pBinplus. Tanto o vetor pRAPS quanto um produto de PCR de 2651pb correspondente ao gene da RNA polimerase DNA dependente do fago T7 foram digeridos com *NotI* e *XbaI* (NEB) para a clonagem do inserto. Em seguida, a subclonagem do inserto foi feita em um vetor pBinplus modificado, contendo os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *AsclI* e *PacI*. A marca seletiva do vetor pBinT7RPol é o antibiótico canamicina. A construção do

plasmídeo foi realizada pela pesquisadora M.Sc. Natália Lucinda. O plasmídeo foi gentilmente cedido para a realização dos experimentos de transcrição *in planta* dos DIs de GRSV e TSWV.

Agroinfiltração, inoculação dos DIs e inoculação mecânica de vírus

Células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV3101 foram transformadas com o plasmídeo pBinT7RPol, mantidas em meio SOC por uma hora após o choque e semeadas em meio LB-ágar à 1,4% (p/v) contendo os antibióticos rifampicina (50µg/mL) e kanamicina (100µg/mL). As placas foram mantidas a 28°C por 48hs. Os clones foram selecionados por amplificação via PCR do gene da T7RPol do extrato de DNA plasmidial produzido em pequena escala (mini-prep) (Sambrook e Russell, 2001).

O protocolo de expressão transiente por agroinfiltração seguiu as recomendações de Bucher *et al.* (2003). Brevemente, uma colônia isolada de um dos clones confirmados por PCR foi crescida em meio LB contendo os antibióticos rifampicina e canamicina por 16hs (overnight) sob agitação (200rpm) a 28°C. Frações de 600µL desta cultura foram inoculadas em 2,4mL de meio de indução completo contendo acetoseringona e os antibióticos rifampicina e canamicina e crescidas sob agitação (200rpm) por mais 16hs. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3.000rpm por 10 minutos em um rotor JA-14 (Beckman-Coulter), o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1mL de tampão MS completo. A densidade óptica (OD₆₀₀) da cultura foi medida e ajustada para 0,5 (para um valor de $2,5 \times 10^6$ céls. igual a OD₆₀₀ 1). A agroinfiltração foi realizada com o uso de seringas para insulina (vol. máx. 1mL) das quais as agulhas foram retiradas. Volumes iguais de inóculo foram infiltrados na parte abaxial das folhas de plantas de *Nicotiana benthamiana* jovens (5-7 folhas verdadeiras) regadas 20 minutos antes da infiltração.

Para a inoculação dos DIs, aproximadamente 3µg de DNA plasmidial (DIs em pGEM-T easy) de cada DI foi digerido overnight com *SacI*-HF (NEB), seguido por inativação da enzima a 65°C por 15 minutos. Em seguida, o DNA foi recuperado utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) de acordo com as instruções do protocolo incluso e outra digestão overnight feita com *BspEI* (NEB), seguida de inativação da enzima a 80°C por 20min. Quando o DNA utilizado para a inoculação era derivado de plasmídeos provindos de *E. coli* DH5α, no entanto, estes últimos dois passos eram suprimidos do protocolo.

O volume inteiro de digestão, contendo 3µg do DNA agora linearizado, é adicionado a 3mL de tampão MS completo e misturado por inversão em tubos de centrifuga de 15mL, resultando em uma concentração final de DNA de 1ng/µL. Tipicamente, 300µL desta solução foram infiltrados na porção abaxial das folhas previamente agroinfiltradas com T7RPol por meio da pressão do êmbolo de seringas para insulina (vol. máx. 1mL) cujas agulhas foram retiradas, ou então por meio de inoculação mecânica usando o agente abrasivo celite.

A inoculação mecânica dos isolados virais livres de DIs foi feita macerando-se tecido foliar sistemicamente infectado (guardado a -80°C ou a partir de tecido sintomático fresco de plantas previamente inoculadas – 7-10 d.p.i.) em 15mL de tampão de inoculação (Garcia-Cano, Resende *et al.*, 2006) contendo o agente abrasivo celite. Hastes flexíveis de algodão estéreis foram utilizadas para a aplicação do macerado na porção adaxial de no máximo 3 folhas por planta, excluindo-se preferencialmente as folhas mais jovens.

Extração de RNA total

A extração de RNA total a partir dos tecidos foliares infiltrados e inoculados foi feita utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Para evitar eventuais variações entre as diversas coletas, cada extração foi mantida em TRIzol a -80°C até a coleta da última folha de cada experimento, de modo que todas as amostras fossem processadas ao mesmo tempo. O RNA total foi quantificado em Nanodrop (Thermo Scientific) e os valores de concentração e absorbância 260/280 anotados para cada amostra. Todas as amostras de RNA total foram mantidas a -80°C.

Produção de sondas de DNA marcadas com digoxigenina

A incorporação de digoxigenina 11-dUTP aos produtos de PCR correspondentes aos DIs estáveis de GRSV (2,0kb) e TSWV (3,1kb) foi realizada com o kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche Applied Science) de acordo com as instruções do fabricante utilizando os primers “DI-sense” e “DI-antisense”. Os produtos de PCR foram analisados para a incorporação da 11-dUTP digoxigenina por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) e comparados a ampliações controle nas quais se utilizou uma mistura normal de dNTPs (**Fig. 9**).

Northern Blotting

O protocolo para northern blotting utilizado foi adaptado a partir de várias fontes (DIG Application Manual – Roche; Manual de Transformação Genética de Plantas (Brasileiro e Carneiro, 1998), The QIAGEN Guide to Analytical Gels (Autores, 2000) e Técnicas Básicas em Biologia Molecular (Autores, 2003)) e encontra-se nos anexos desta dissertação de mestrado.

Em resumo, 10µg de RNA total foram carregados por amostra e separados por eletroforese em gel desnaturante (contendo formaldeído) de agarose a 0,8% ou 1,5% (p/v) usando uma corrente constante de 80V. Após a eletroforese o gel foi lavado em tampão SSC 10X por 20 minutos, duas vezes. A transferência do RNA foi feita para uma membrana de náilon positivamente carregada (HYBOND-N+, GE Healthcare) por capilaridade usando tampão SSC 20X. Após a transferência overnight os RNAs foram fixados à membrana por exposição à radiação ultravioleta (UV) por 5 minutos.

A pré-hibridização foi realizada por 1h com tampão contendo esperma de salmão (120ng/µL) a 50°C. A membrana foi hibridizada com a sonda apropriada por 16hs na presença de esperma de salmão a 60°C. Em seguida, a membrana foi lavada por quatro vezes em tampões de baixa (SSC 0,5X + SDS 0,1%, duas lavagens de 5 minutos a temperatura ambiente) e alta estrigência (SSC 0,1X + SDS 0,1%, duas lavagens de 15 minutos a 68°C), respectivamente. A membrana foi bloqueada em solução de bloqueio de PBS 1X + Tween-20 (0,01% - v/v) contendo leite em pó desnatado a 5% (p/v) por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida os fragmentos Fab do anticorpo comercial anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina (Roche) foram adicionados à solução de bloqueio descrita acima de acordo com as instruções do fabricante em diluição 1:5.000. A membrana foi mantida em solução por mais 1 hora a temperatura ambiente e por fim lavada por três vezes com tampão PBS 1X + Tween-20 (0,01% - v/v).

A revelação da membrana utilizou NBT/BCIP Reagent Kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A revelação foi visualizada a cada 15 minutos por no máximo 1 hora a fim de evitar reações inespecíficas. Por fim, a membrana foi lavada com água Milli-Q por 3 vezes, secada em estufa a 37°C por 30-60 minutos e acondicionada em saco plástico para armazenamento e registro digital (escaneamento a 600dpi). Todas as etapas descritas acima, da pré-hibridização a revelação da membrana foram realizadas em forno de hibridização (HYBAID) com controle automatizado de temperatura sob movimento

constante usando reagentes e garrafas de hibridização (Electron – Thermo Scientific) livres de RNases (RNase-free).

3.3 Resultados e Discussão

DIs modificados

Os DIs estáveis de GRSV e TSWV foram amplificados por PCR e clonados em vetor pGEM-T easy para sequenciamento e confirmação da integridade das extremidades 5' e 3' e das ORFs truncadas das proteínas L. Para GRSV a integridade do DI foi mantida, no entanto não foi possível determinar a integridade do DI de TSWV, pois o sequenciamento do DNA plasmidial falhou (dados não mostrados). No entanto, decidiu-se utilizar ambos os DIs para os experimentos seguintes

A primeira estratégia de modificação das moléculas dos DIs envolvia a adição da sequência da ribozima do vírus da hepatite delta (HDV) ao terminal 3' por meio de fusão mediada por PCR. Uma vez adicionada a sequência da ribozima aos DIs, o conjunto DIs+HDV seria clonado em vetor binário pCAMAP (modificado a partir de pCAMBIA, incluindo dois sítios de restrição extras para *Ascl* e *Pacl*). Esta estratégia, no entanto não funcionou, pois a molécula de HDV utilizada para a fusão apresentava erros de sequência e o plasmídeo pCAMAP não havia sido completamente sequenciado e possivelmente também apresentava erros (prof. Dr. Tatsuya Nagata, comunicação pessoal, 2010).

Em consequência, outra estratégia foi utilizada para modificar os DIs, envolvendo a produção de transcritos de RNA run-off por meio da expressão transiente de T7RPol. Neste intuito foram adicionados o promotor T7 tipo-selvagem a extremidade 5' e o sítio de restrição da enzima *BspEI* a extremidade 3' das moléculas dos DIs, como demonstrado na **Figura 7**.



Figura 7. Esquema das modificações feitas aos cDNAs correspondentes às moléculas de RNA defectivas-interferentes estáveis de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, 3,1kb) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV, 2,0kb). O promotor T7 foi introduzido por PCR a extremidade 5' usando o iniciador (primer) DI T7 Promoter, descrito na sessão 3.2 – Metodologia. A sequência da enzima de restrição *BspEI* (5' T[▼]CCGGA 3') foi introduzida no terminal 3' da molécula usando o primer *DI**BspEI* também descrito na sessão 3.2 – Metodologia. Esta enzima de restrição gera uma extremidade coesiva prolongada na fita 3' → 5' (3' over-hang).

A enzima *BspEI* é uma endonuclease rara produzida por *Bacillus sp.* (Nwankwo, 1995) e possui sensibilidade a metilações do tipo dam e dcm, comumente encontradas em plasmídeos recuperados a partir de uma ampla gama de linhagens comerciais de *E. coli* (e.g. DH5 α , Top10, a linha XL, JM109, BL21, etc.), no entanto, *BspEI* e seus isoesquizômeros (entre eles *AccIII*) foram as únicas opções de enzimas disponíveis que não possuíssem sítios de restrição dentro da sequência dos DIs e cuja clivagem emulasse o terminal 3' do RNA L de tospovírus. A fim de promover a correta clivagem dos plasmídeos contendo os DIs, estes foram transformados em células eletrocompetentes de *E. coli* da linhagem JM110 (Stratagene) que possui genótipo *dam3-*, *dcm6-*. As células da linhagem JM110, no entanto, não são capazes de suprimir completamente a metilação do tipo dam e aproximadamente 0,4% de todas as metilações permanecem intactas (Russell e Hirata, 1989; Palmer e Marinus, 1994), o que resulta na impossibilidade de digestões totais do DNA plasmidial. Este fato foi confirmado realizando-se a digestão dos plasmídeos contendo os DIs de TSWV e GRSV produzidos em JM110 com as enzimas de restrição *BspEI* e *AccIII* (**Fig. 8**), ambas sensíveis a metilações dam e dcm.

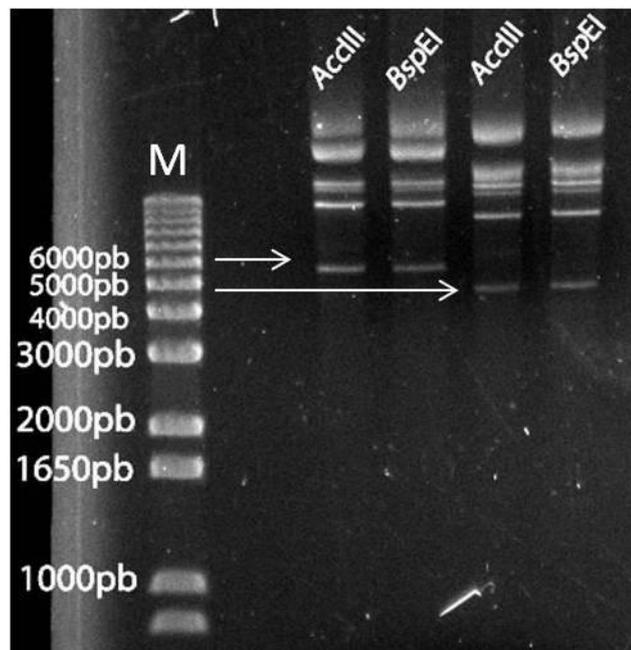


Figura 8. Perfil de restrição dos plasmídeos contendo os defectivos interferentes (DIs) de *Tomato spotted wilt virus* e *Groundnut ringspot virus* para as enzimas *BspEI* e *AccIII*. 300ng de DNA plasmidial foram aplicados por reação de digestão. Após 4h de reação a 65°C as digestões foram parciais para os dois plasmídeos, independentemente da enzima utilizada. Em adição, provou-se que a enzima *BspEI* retém atividade completa a 65°C, em contraposição ao protocolo fornecido pela fabricante (New England Biolabs - NEB). M – marcador 1kb plus (Invitrogen). As setas indicam o tamanho aproximado das bandas em relação ao marcador.

Os resultados apresentados na **Figura 8** demonstram que após 4 horas de digestão a 65°C com as enzimas *BspEI* e *AccIII* não há digestão completa de 300ng de DNA plasmidial obtido por uso do kit comercial PureLink™ Quick Plasmid Mini-prep Kit (Invitrogen). Apenas uma porção muito pequena do DNA plasmidial foi linearizada (linearização indicada pelas setas na figura). Este ensaio, no entanto demonstrou a conservação da atividade da enzima *BspEI* a 65°C, o que não era esperado.

Tendo em vista a baixa eficiência da digestão com *BspEI* e *AccIII*, e considerando que há um sítio único de *SacI* 49pb a jusante (downstream) do sítio de *BspEI* inserido por PCR, pensou-se em realizar uma digestão prévia overnight dos plasmídeos contendo os DIs com a enzima *SacI*-HF (NEB), seguida de digestão com *BspEI*, a fim de aumentar a quantidade de moléculas de DNA linearizadas que teriam as extremidades terminais conservadas. O produto da digestão dupla ou apenas da digestão com *SacI*-HF foi utilizado para a infiltração dos tecidos foliares vegetais de acordo com a sessão 3.2 – Metodologia. O uso do DNA plasmidial digerido apenas com *SacI*-HF ou com *SacI*-HF e *BspEI* está explicitado nos experimentos de hibridização.

Produção de sondas contendo digoxigenina para T7RPol e os DIs

Foram produzidas sondas para a detecção dos transcritos de RNA da enzima T7 RNA polimerase e dos DIs estáveis de TSWV e GRSV por meio de incorporação de digoxigenina em produtos de PCR amplificados com o uso dos primers “DI-sense” e “DI-antisense”, em acordo com o protocolo do kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche Applied Science). O tamanho das sondas é o mesmo tamanho dos DIs, 3,1kb e 2,0 kb, respectivamente, para TSWV e GRSV. A correta incorporação de digoxigenina aos produtos de PCR acarreta em um retardo migratório em comparação a controles negativos (PCR utilizando dNTPs normais ao invés de uma mistura entre dTTP e dUTP-11-DIG) em géis de agarose. As sondas produzidas para os três RNAs alvo (T7RPol, DI TSWV e DI GRSV) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) de 10% do volume total de cada reação de PCR. Para os ensaios de hibridização em membrana de náilon positivamente carregada as sondas foram aplicadas a concentração de 2µL/mL de tampão de hibridização de acordo com as especificações do fabricante (DIG Application Manual – Roche).

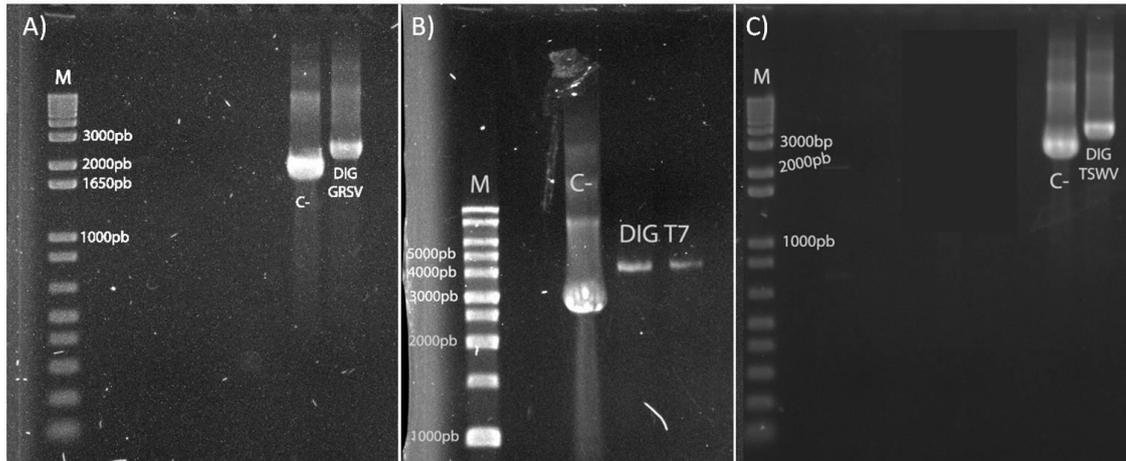


Figura 9. Síntese das sondas marcadas com digoxigenina utilizadas para os experimentos de Northern Blotting. A) e C) Obtenção das sondas para os cDNAs dos RNAs defectivos-interferentes (DIs) estáveis de *Groundnut ringspot virus* (GRSV, 2,0kb) em A), e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, 3,1kb) em C), a partir de PCR usando os primers DI-sense e DI-antisense, que se anelam às porções 5' e 3' terminais dos cDNAs. A correta incorporação da digoxigenina provoca retardo de migração eletroforética (amostras DIG GRSV e DIG TSWV). B) Obtenção da sonda para o gene da T7 RNA Polimerase (DIG T7) utilizando os primers desenhados para a sua clonagem no vetor binário pRAPS, gentilmente cedidos pela M.Sc. Natália Lucinda. M – Marcador 1kb plus (Invitrogen), C- (produtos de PCR amplificados com uso de dNTPs sem adição de digoxigenina).

Obtenção de isolados de TSWV e GRSV livres de DIs

Três isolados distintos de TSWV e GRSV foram analisados por Northern Blotting para a presença de bandas defectivas do RNA L (DIs). A obtenção de isolados de tospovírus livres de DIs é importante para a realização dos experimentos de transcrição e acumulação dos DIs estáveis na presença de vírus auxiliar. Como a diferenciação entre os DIs infiltrados e DIs naturalmente presentes nos inóculos virais utilizados seria de difícil realização, optou-se por buscar isolados livres de DIs. Os testes de detecção dos isolados livres de DIs serviram também para avaliar a especificidade e reatividade das sondas produzidas.

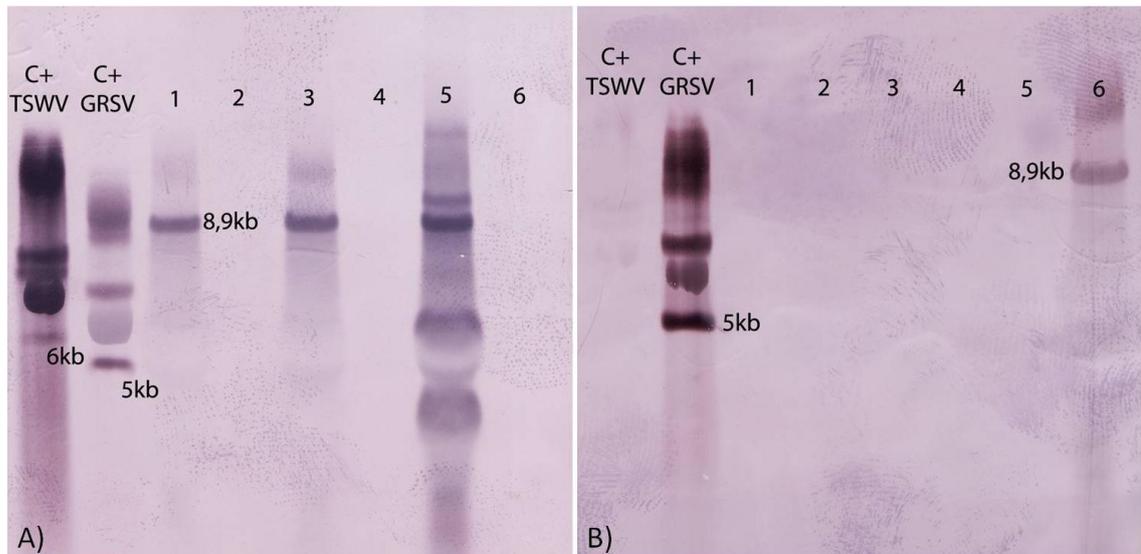


Figura 10. Detecção e classificação de três isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e três isolados de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) por hibridização (Northern Blotting) usando como sondas as sequências de cDNA dos RNAs defeitivos-interferentes estáveis de TSWV e GRSV. A) Detecção do RNA L dos seis isolados usando uma sonda para TSWV. B) Detecção do RNA L dos seis isolados usando uma sonda para GRSV. O único isolado que apresentou defeitivos interferentes foi o isolado 5. Os isolados 2 e 4 não reagiram para nenhuma das sondas e o isolado 3 (classificado como GRSV pela Embrapa-CNPH) hibridizou apenas com a sonda para TSWV. C+ TSWV – plasmídeo não linearizado contendo a sequência do cDNA do DI estável de TSWV (3,1kb); C+ GRSV – plasmídeo não linearizado contendo a sequência do DI estável de GRSV (2,0kb); 1 – Isolado TSWV SP; 2 – Isolado GRSV Tospo Campo; 3 – Isolados GRSV Tospo CNPH; 4 – Isolado TSWV Pimenta; 5 – Isolado TSWV Fruto; 6 – Isolado GRSV Fernanda. Os isolados foram nomeados pela Embrapa CNPH. As amostras foram resolvidas por eletrofores em gel desnaturante de agarose a 0,8% (p/v).

Os resultados deste experimento demonstram que o isolado 5 (TSWV Fruto) foi o único a apresentar acumulação de versões defeitivas do RNA L. Os isolados 1 (TSWV SP), 3 (GRSV Tospo CNPH) e 6 (GRSV Fernando) não apresentaram acumulação de DIs e foram selecionados como candidatos para os experimentos posteriores de transcrição e acumulação dos DIs. Os isolados 2 (GRSV Tospo Campo) e 4 (TSWV Pimenta) não foram reativos a nenhuma das duas sondas, o que indica que podem se tratar de escapes da inoculação mecânica ou ainda, de espécies distintas de tospovírus, não detectáveis com as sondas para os DIs de GRSV e TSWV.

As sondas apresentaram boa especificidade embora tenha havido reação cruzada entre os controles positivos, especialmente para a sonda do DI de TSWV em relação ao controle positivo para o DI de GRSV (pGEM-T easy contendo o cDNA do DI estável de GRSV). No entanto, é importante ressaltar que os controles positivos são moléculas de DNA e que a hibridização entre sonda e alvo homotípicos (DNA:DNA ou RNA:RNA) é muito facilitada em relação a hibridização (mais sensível) e menos estrigente em relação à especificidade do alvo, enquanto uma relação heterotípica entre sonda e alvo (DNA:RNA e RNA:DNA) garante

maior estringência, embora menor sensibilidade, já que a interação entre heterodímeros é mais fraca do que entre homodímeros (DIG Application Manual – Roche). Estes fatos garantem boa confiabilidade aos resultados de detecção obtidos.

Outro resultado importante destes ensaios foi a indicação de um possível equívoco entre a classificação do isolado 3 (GRSV Tospo CNPH) e a classificação obtida a partir das hibridizações descritas acima. Esta última classificação indica que o isolado 3 (ou pelo menos o seu RNA L) pertence a espécie TSWV e não GRSV. Tendo em vista o relato recente da ocorrência de rearranjo de segmentos inteiros do RNA genômico de *Tospovirus* entre espécies distintas embora filogeneticamente próximas (GRSV e TCSV) (Webster, Reitz *et al.*, 2011), e que a classificação de isolados de *Tospovirus* é feita rotineiramente por métodos sorológicos (DAS-ELISA) e sequenciamento da proteína do nucleocapsídeo (ptn. N), procedeu-se ao sequenciamento dos segmentos genômicos do isolado 3. Os isolados 1 e 6 também foram sequenciados para confirmar os resultados obtidos nos experimentos de hibridização.

Inicialmente foi realizada a amplificação dos RNAs virais por RT-PCR a partir do RNA total obtido para os isolados 1, 3 e 6 usando os primers J13 e UHP (Cortez, Saaijer *et al.*, 2001). Foram obtidos três fragmentos de PCR com tamanhos de 900pb, 1300pb e 1800pb. Os fragmentos foram clonados em pGEM-T easy e para os isolados que não apresentaram resultados positivos no sequenciamento foi feita mais uma rodada de RT-PCR, clonagem e sequenciamento, desta vez utilizando primers específicos para amplificar o gene da proteína N de TCSV, GRSV e TSWV (gentilmente cedidos pela Dra. Mariana Halwass da Embrapa-CNPH). Desta forma confirmou-se que o isolado 3 é de fato da espécie TSWV e não GRSV, como inicialmente classificado. O isolado 6 foi de fato confirmado como da espécie GRSV e o isolado 1 da espécie TSWV.

Expressão Transiente do Gene da T7 RNA Polimerase por Agroinfiltração

A estratégia de replicação escolhida para a amplificação dos DIs na presença de um vírus auxiliar é dependente de um momento inicial em que os cDNAs dos DIs que foram clonados em pGEM-T easy sejam novamente convertidos em RNA. A transcrição do cDNA em RNA é essencial, uma vez que a polimerase viral é dependente de moléculas de RNA para realizar suas várias atividades catalíticas. No modelo desenvolvido nesta dissertação o passo

inicial de transcrição dos cDNAs dos DIs em RNA é feito pela enzima T7 RNA polimerase transientemente expressa *in planta* por meio de agroinfiltração.

Logo, determinar a cinética de expressão de T7RPol é o primeiro passo para a sincronização da infiltração dos DIs e a inoculação mecânica do vírus auxiliar. No entanto, não havia anticorpos anti-T7RPol disponíveis para determinar a síntese proteica derivada da agroinfiltração do gene da T7RPol. A opção escolhida, portanto foi a detecção do mRNA de T7RPol, a partir de amostras de RNA total extraídas de folhas agroinfiltradas a 0h, 24h, 48h, 72h e 96h pós agroinfiltração (**Fig. 11**) por Northern Blotting usando a sonda produzida a partir do gene da T7RPol (**Fig. 9-B**).

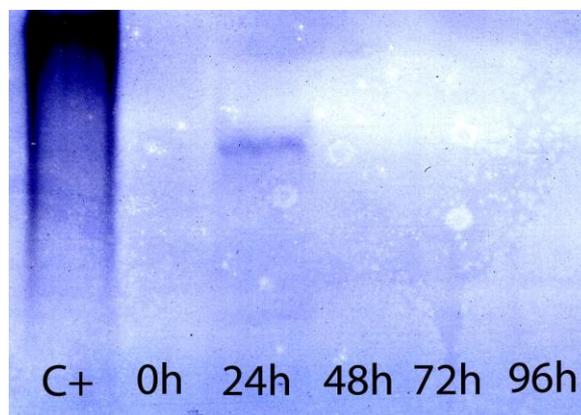


Figura 11. Detecção por Northern Blotting da transcrição *in planta* do mRNA do gene da T7 RNA Polimerase (T7RPol) mediada pelo vetor binário pBinT7RPol (T-DNA) transformado em *Agrobacterium tumefaciens*. Uma única banda hibridizou com a sonda produzida para o gene da T7RPol (**Fig. 9-B**) a 24h pós agroinfiltração. A expressão deste mRNA parece ser fortemente suprimida após 24h já que nenhuma outra banda referente ao mRNA de T7RPol foi detectada. As amostras foram resolvidas em gel desnaturante de agarose a 1,5% (p/v). C+ refere-se ao plasmídeo pBinT7RPol (\approx 12kb) não linearizado. As indicações de tempo são referentes ao número de horas pós agroinfiltração em que as amostras de RNA total das folhas infiltradas foram coletadas.

Os resultados obtidos para esta hibridização indicam que há um único ponto temporal dentre os escolhidos para a coleta das amostras em que a transcrição do mRNA de T7RPol é detectável, a 24hs pós agroinfiltração. Este resultado pode indicar o silenciamento da expressão do mRNA ou degradação dos RNAs nas coletas subsequentes. A supressão pode ter sido ainda mais intensa pelo tamanho do transcrito (2651nt) comparado a GFP (\approx 700nt), por exemplo, para o qual se sabe que a visualização de fluorescência sem a coexpressão de supressores de silenciamento gênico (e.g. ptn. HC-Pro de *Potyvirus*; ptn. P19 de *Tombusvirus*) ocorre até 72hs pós agroinfiltração (prof. Dr. Tatsuya Nagata, comunicação pessoal, 2011). Uma estratégia possível para aumentar a expressão do mRNA de T7RPol seria, portanto, a coexpressão de uma proteína supressora de silenciamento gênico. Ainda, a

análise de siRNA produzidos no silenciamento gênico do mRNA de T7RPol por eletroforese em gel desnaturante (ureia a 8M) de poliacrilamida a 12% (p/v) seria importante para caracterizar o silenciamento gênico, assim como a realização de Western Blotting para detectar a síntese da enzima T7 RNA Polimerase, não disponível durante o período de realização deste trabalho.

Transcrição in planta dos DIs de GRSV e TSWV mediada por T7 RNA Polimerase

A transcrição dos RNAs defectivos interferentes estáveis de GRSV e TSWV no ambiente celular deve ser rigidamente controlada quanto à presença de nucleotídeos extras nas terminações 5' e 3' dos transcritos, uma vez que as regiões terminais precisam formar uma estrutura secundária no formato de cabo de panela (panhandle) (Resende, De Haan *et al.*, 1992) e a ligação da proteína do nucleocapsídeo a esta estrutura é finamente controlada e necessária para os eventos de transcrição/replicação dos DIs (mini-genomas) (Conzelmann, 2004; Mir e Panganiban, 2004).

Inicialmente, pensou-se em clonar os DIs em vetores binários e expressá-los sob comando do promotor constitutivo 35S de CaMV e usando o terminador do gene da nopalina-sintase (*nos*-terminator). Esta estratégia, no entanto, dependia da modificação dos cDNAs dos DIs de TSWV e GRSV para a adição da ribozima de HDV no terminal 3' dos DIs e devido a problemas com a sequência da ribozima disponível, foi efetuada uma mudança na estratégia de transcrição *in planta* dos DIs. Neste intuito os cDNAs dos DIs de TSWV e GRSV clonados em pGEM-T easy foram modificados para a adição de um promotor T7 na porção 5' terminal e de um sítio de restrição na porção 3' terminal para a enzima *BspEI*. Desta forma, os plasmídeos contendo os DIs seriam linearizados por *BspEI* e infiltrados em folhas previamente agroinfiltradas com o vetor binário para a expressão transiente do gene da T7 RNA Polimerase. No entanto, durante a realização do primeiro experimento de detecção da transcrição dos RNAs dos DIs não possuíamos ainda a linhagem JM110 de *E. coli* e a enzima utilizada para a linearização dos plasmídeos contendo os DIs foi *SacI*-HF, cujo sítio de restrição localiza-se 49pb a jusante do sítio de *BspEI*.

Uma vez de posse da informação de que o pico de transcrição do mRNA da T7RPol ocorria 24hs após a agroinfiltração, procedeu-se inoculação dos plasmídeos contendo os DIs de GRSV e TSWV linearizados pela enzima *SacI*-HF no intuito de que a T7RPol fizesse transcritos run-off a partir do reconhecimento do promotor T7. A princípio foram testadas

duas formas distintas de entrega dos DIs no tecido foliar, por inoculação mecânica (IM) e por infiltração (II) utilizando a pressão do êmbolo de uma seringa de insulina sem agulha (**Fig. 12**).

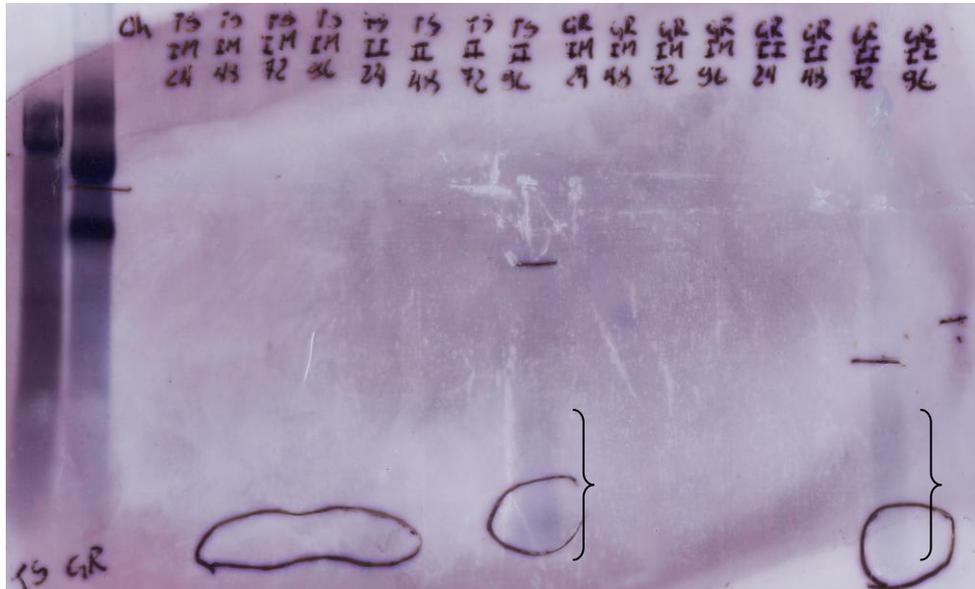


Figura 12. Transcrição *in planta* dos RNAs dos Defectivos-Interferentes estáveis (DIs) de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV) pela enzima T7 RNA Polimerase detectada por Northern Blotting. Os plasmídeos contendo os cDNAs dos DIs de TSWV e GRSV produzidos em *E. coli* DH5 α foram linearizados por digestão com a enzima *SacI*-HF e inoculados mecanicamente (IM) ou por infiltração (II). Os tempos correspondem ao número de horas pós-inoculação/infiltração dos plasmídeos linearizados. Os controles positivos (TS e GR) correspondem aos plasmídeos não digeridos contendo os DIs estáveis de TSWV e GRSV, respectivamente. A membrana foi hibridizada simultaneamente com as sondas para os DIs de TSWV e GRSV. Os resultados apontam que somente com a entrega por inoculação (II) dos plasmídeos houve algum tipo de hibridização das sondas. RNAs degradados foram detectados a 96hs pós-inoculação para o DI de TSWV e a 72hs para o DI de GRSV. As amostras foram resolvidas em gel desnaturante de agarose a 1,5% (p/v).

Os resultados demonstraram que quando o método de inoculação mecânica dos DIs foi utilizado não houve nenhuma hibridização de RNAs detectável, o que pode ser consequência da agressividade do método para com o tecido vegetal, ou ainda um efeito de degradação do RNA extraído destes tratamentos e aplicado ao gel. Quando os DIs foram inoculados por infiltração, no entanto, houve sinal de hibridização a 96hs pós-infiltração para o DI de TSWV e a 72hs pós-infiltração para o DI de GRSV. As marcações no entanto aparentam estar em uma posição na membrana mais baixa do que o esperado para os DIs, e ainda por cima apresentam-se como rastros e não bandas coesas, o que pode indicar a degradação do RNA transcrito, fruto do provável endereçamento dessas moléculas para a maquinaria de RNAi devido a formação de estrutura secundária (panhandle), ou ainda do uso de corrente elétrica muito alta durante a resolução das amostras por eletroforese. Para confirmar se a degradação de RNA vista na **Figura 12** é consequência da atividade da maquinaria de RNAi seria importante analisar a fração de siRNAs produzidos pela planta por

meio de eletroforese em gel desnaturante (ureia 8M) de poliacrilamida a 12% (p/v) usando sondas específicas para os RNAs dos DIs geradas a partir dos produtos de PCR dos cDNAs dos DIs gerados por primers randômicos.

Devido à qualidade do Northern Blotting realizado e ao uso das duas sondas para detecção dos DIs no mesmo processo de hibridização decidiu-se repetir o experimento para confirmar os resultados obtidos. Foram feitas novas agroinfiltrações de T7RPol e infiltrações dos DIs em plantas de *N. benthamiana*. Desta vez uma duplicata do experimento foi feita utilizando os plasmídeos obtidos da linhagem JM110 de *E. coli* linearizados com *SacI*-HF e *BspEI* (Fig. 13).

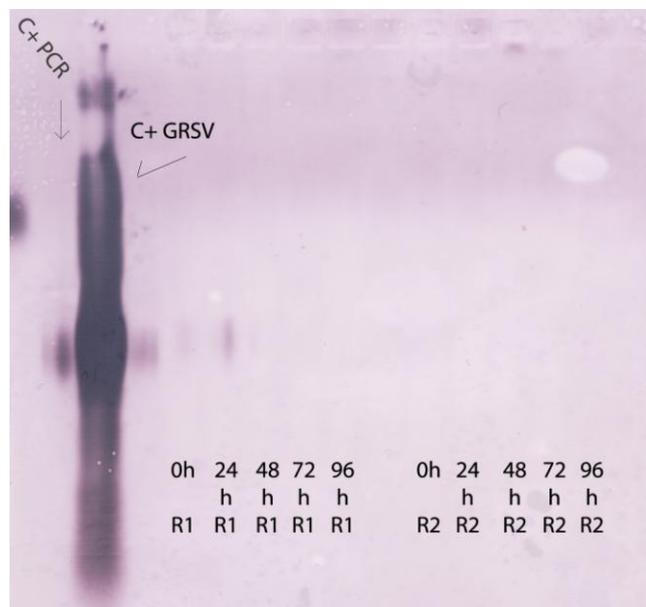


Figura 13. Detecção por Northern Blotting da transcrição *in planta* do RNA Defectivo-Interferente (DI) estável de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) mediada pela expressão transitente de T7 RNA Polimerase. O plasmídeo contendo o cDNA do DI de GRSV foi linearizado com as enzimas *SacI*-HF e *BspEI* e posteriormente inoculado por infiltração. Neste experimento foi utilizada apenas a sonda para o DI de GRSV e duas réplicas experimentais (R1 e R2). Os tempos indicam o número de horas pós-infiltração em que as amostras foliares foram coletadas e o RNA total extraído. C+ PCR – fragmento de PCR (2,0kb) correspondente a fase de leitura aberta (ORF) do DI de GRSV. C+ GRSV – plasmídeo contendo o cDNA do DI estável de GRSV. As amostras foram resolvidas em gel desnaturante de agarose a 0,8% (p/v).

Este experimento foi feito para os DIs de GRSV e TSWV, entretanto a membrana contendo a hibridização do DI de TSWV com sua respectiva sonda não apresentou marcações além dos controles positivos (dado não mostrado). Já para a detecção da transcrição do DI de GRSV houve marcação a 24hs pós-infiltração em uma das amostras (24h R1). Como a réplica deste tratamento (24h R2) e todas as outras amostras de R2 não apresentaram marcação, considerou-se ter havido algum problema na expressão da T7 RNA Polimerase neste experimento, não possibilitando a visualização do DI transcrito a 24hs pós infiltração.

A hibridização visualizada para a amostra 24h R1 aparece em tamanho próximo ao do controle positivo C+ PCR que é o produto de PCR da amplificação da ORF do DI de GRSV. A ORF deste DI tem aproximadamente 1.800pb e aparece em posição pouco mais baixa em relação a amostra 24h R1. Como o DI estável de GRSV possui tamanho de 2.000pb, a relação entre as duas amostras na membrana parece ser válida. Considerando que a relação de tamanho entre C+ PCR e 24h R1 é verdadeira, o controle positivo C+ GRSV, que é o plasmídeo contendo o cDNA do DI de GRSV digerido por *SacI*-HF e *BspEI*, parece estar degradado, visto que o seu tamanho, linearizado deveria ser de 5.000pb.

Transcrição dos DIs mediada por T7RPol na presença do vírus auxiliar

Em paralelo à preparação do experimento descrito acima outro experimento foi realizado utilizando a agroinfiltração de pBinT7RPol, a infiltração dos DIs e a inoculação mecânica do vírus auxiliar (no caso, os isolados 1 – TSWV SP e 6 – GRSV Fernanda). Neste experimento decidiu-se pela seguinte ordem de inoculação:

Agroinfiltração T7RPol ^{24h}→Infiltração do DI ^{24h}→Inoculação mecânica do vírus auxiliar (Os números mesclados às setas indicam que entre cada etapa do processo de inoculação seguiu-se um intervalo de 24h).

Esta organização da sequência de inoculação dos componentes levou em consideração dados produzidos por Kormelink *et al.* (1992) que indicam a acumulação dos RNAs virais a níveis detectáveis por Northern Blotting a partir de 72hs pós-inoculação mecânica de TSWV em plantas de *N. rustica*. Como os resultados indicavam que os transcritos de RNA dos DIs foram detectados no intervalo de 72-96hs (**Fig. 12**) tentou-se sincronizar a acumulação do RNA viral e a transcrição dos DIs.

Outra possibilidade de organização da inoculação dos componentes seria:

vírus auxiliar ^{24h}→T7RPol ^{24h}→DI.

No entanto considerou-se que nesta ordem de inoculação poderia haver influência do vírus auxiliar sobre a expressão transiente de T7RPol no ambiente celular. Independentemente da ordem de inoculações escolhida, a prova conceitual de que os DIs infiltrados estão sendo incorporados à replicação viral é dependente da demonstração de que folhas sistemicamente infectadas, nas quais não se infiltrou DIs, não se inoculou o vírus auxiliar, ou se agroinfiltrou pBinT7RPol acumularam não apenas o RNA L tipo-selvagem como também as suas formas defectivas (DIs).

Nos experimentos de prova conceitual da acumulação de DIs em folhas sistemicamente infectadas por incorporação dos DIs à replicação viral em folhas onde os três componentes (T7RPol, DIs e vírus auxiliar) foram inoculados, procedeu-se à coleta tanto das folhas inoculadas quanto de folhas sistemicamente infectadas a 8 d.p.i. Em adição, repetiu-se os experimentos de transcrição dos DIs mediada por T7RPol na ausência do vírus auxiliar usando novamente os plasmídeos contendo os cDNAs dos DIs produzidos em *E. coli* DH5 α e linearizados apenas com *SacI*-HF. Os resultados destes experimentos estão apresentados na

Figura 14.

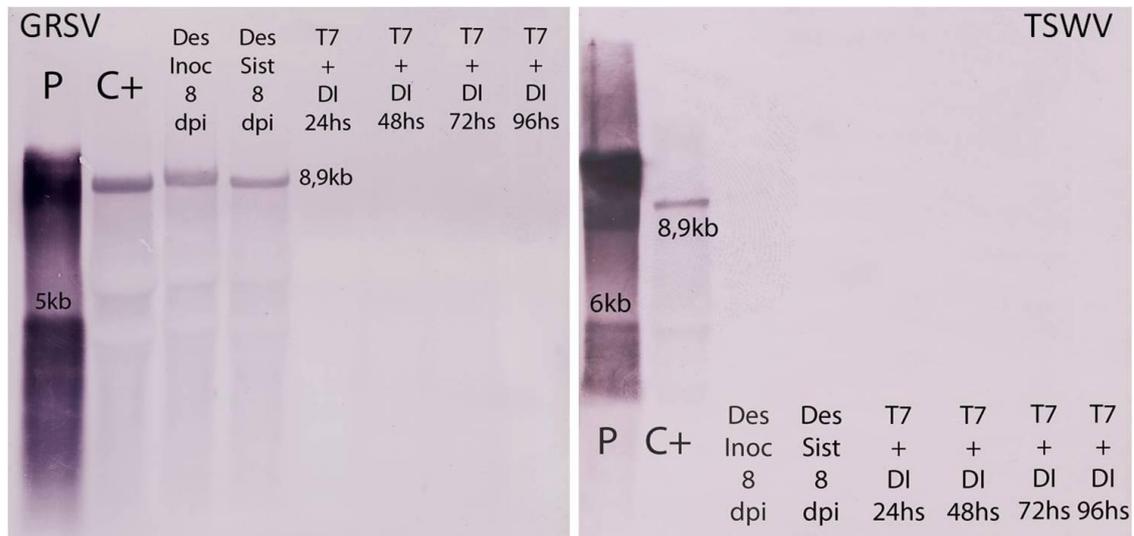


Figura 14. Prova conceitual de funcionamento do sistema de genética reversa para *Tospovirus*. A imagem acima apresenta os Northern Blottings realizados para a detecção da acumulação dos RNAs Defectivos-Interferentes estáveis (DIs) de *Groundnut ringspot virus* e *Tomato spotted wilt virus*. As amostras marcadas como 'Des' foram coletadas de plantas agroinfiltradas com o vetor pBinT7RPol, infiltradas com o respectivo DI e inoculadas com o respectivo vírus auxiliar. Na membrana GRSV usou-se apenas a sonda derivada do cDNA do DI de GRSV enquanto a membrana TSWV usou apenas a sonda derivada do cDNA do DI de TSWV. Os resultados indicam que para a membrana GRSV houve replicação viral (Isolado 1 – GRSV Fernanda) tanto nos tecidos inoculados quanto nos tecidos sistemicamente infectados a 8 d.p.i., mas não houve a acumulação do DI de GRSV. Para a membrana TSWV a 8 d.p.i. a replicação viral ainda não havia alcançado níveis detectáveis nas folhas sistemicamente infectadas, mas foi fracamente detectável nas folhas inoculadas. As amostras das séries T7 + DI são repetições do experimento apresentado na **Figura 12**. Em ambas as membranas, P – plasmídeo pGEM-T easy contendo os cDNAs dos respectivos DIs; C+ – Isolados 6 (GRSV Fernanda) e 1 (TSWV SP), livres de DI coletados a 8 d.p.i. de plantas controle de *N. benthamiana* sistemicamente infectadas. As amostras foram resolvidas para ambas as membranas em géis desnaturantes de agarose a 0,8% (p/v).

Para o experimento feito com o DI de TSWV o vírus auxiliar não havia ainda se acumulado nas folhas não inoculadas a 8 d.p.i. e a sua acumulação na folha inoculada, medida pela intensidade da banda hibridizada no experimento de Northern Blotting, foi baixa. Não há sinal de acumulação de partícula defectiva interferente na folha inoculada. Para o experimento com o DI de GRSV o vírus auxiliar foi capaz de replicar com intensidade tanto na folha inoculada quanto na folha sistemicamente infectada a 8 d.p.i. No entanto,

não há sinal de acumulação do DI de GRSV nas duas amostras em que o vírus auxiliar foi inoculado. A série T7 + DI em ambas as membranas é uma réplica dos experimentos realizados para a transcrição dos DIs na ausência do vírus auxiliar, como apresentado na **Figura 12**. Na réplica do experimento, no entanto, não houve acúmulo dos DIs ou de sinais de degradação dos RNAs.

Uma das causas para a não detecção dos DIs é a perda de funcionamento do clone de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor binário pBinT7RPol. Em todas as vezes que se preparou a agroinfiltração, com exceção do experimento da **Figura 11**, o inóculo bacteriano induzido para a agroinfiltração foi semeado a partir de um clone armazenado em meio líquido com glicerol a 40% (v/v) guardado em freezer a -80°C.

Experiências anteriores com um clone de expressão em bactéria (BL21) de um fragmento do gene *Sw5* de *Solanum lycopersicum* indicaram que o uso continuado de um inóculo a partir de clones armazenados a -80°C pode resultar em perda da capacidade de expressão. O mesmo pode ter ocorrido com o clone de *Agrobacterium tumefaciens* utilizado nos experimentos de transcrição dos DIs via T7RPol. A fim de evitar este tipo de perda de funcionalidade os clones utilizados para a transcrição dos RNAs defectivos interferentes de TSWV e GRSV serão sempre semeados a partir de colônias isoladas em placa.

Outra possível causa da não visualização dos DIs ou de sua degradação pode ter sido a realização de eletroforese desnaturante em gel de agarose a 0,8% ao invés de 1,5%. Os ácidos nucleicos migram diferentemente em géis nativos e desnaturantes e a proporção logarítmica entre migração no gel e tamanho da molécula para esses dois tipos de géis não é a mesma. Novos Northern Blottings devem ser realizados com concentração de agarose superior a 0,8%.

Ainda outra causa para a não acumulação dos DIs no experimento de co-inoculação com o vírus auxiliar pode ter sido a manutenção incorreta das extremidades 5' e 3'. O reconhecimento dos RNAs virais pelas RpRd é finamente regulado e qualquer nucleotídeo a mais presente na sequência dos DIs transcritos pela T7RPol pode ocasionar a perda completa do reconhecimento da RpRd viral (Neumann, Whitt *et al.*, 2002; Walpita e Flick, 2005).

3.4 Perspectivas do Trabalho

Dentre as perspectivas para este trabalho encontram-se a modificação da construção dos DIs já existentes, trocando o sítio de *Bsp*EI por uma sequência de ribozima de HDV. O promotor T7 utilizado também pode ser modificado, retirando-se os três resíduos de guanina presentes e que são incorporados ao transcrito (Walpita e Flick, 2005), ou pode ser introduzida uma sequência de ribozima entre o promotor e o cDNA dos DIs.

A clonagem dos cDNAs dos DIs em vetores binários é ainda outra estratégia a ser desenvolvida. Desta forma, não seria necessário fazer a infiltração dos plasmídeos linearizados e, pelo menos por uma janela de tempo de 24hs de acordo com os resultados obtidos para pBinT7RPol, o sinal de transcrição seria mais intenso.

Outras alternativas a serem testadas para a transcrição *in planta* dos DIs envolvem a mudança da ordem com que os componentes do ensaio de prova conceitual são inoculados na planta. Pode-se, por exemplo, usar a ordem vírus auxiliar^{24h}→T7RPol^{24h}→DI. Ainda outra mudança possível é a co-inoculação de um plasmídeo contendo um gene de proteína supressora do silenciamento gênico viral como HC-Pro ou outras proteínas de vírus de plantas com comprovada ação de supressão.

3.5 Agradecimentos

Este projeto de pesquisa foi apoiado financeiramente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

Conclusão

O uso de sistemas de genética reversa para o estudo da virologia gerou conhecimentos relevantes acerca da evolução e do funcionamento das proteínas virais e da dinâmica interação entre vírus e hospedeiro, em especial para os vírus de ssRNA(-). O uso desta ferramenta metodológica permitiu o desenvolvimento de linhagens virais atenuadas úteis para a vacinação em massa de seres humanos e animais de produção e, mais recentemente, levou à engenharia de partículas semelhantes a vírus (virus-like particles - VLP) além de alçar o desenvolvimento de sistemas de transgenia e silenciamento gênico baseados em clones infecciosos geneticamente modificados, muito úteis em estudos de biologia do desenvolvimento. O volume de conhecimento produzido por meio desta estratégia investigativa vem sendo importante na determinação de novas drogas e tratamentos antivirais, úteis para plantas e animais.

Os tospovírus (família *Bunyaviridae*) são importantes patógenos vegetais para os quais pouco ainda se sabe sobre os aspectos finos da regulação da expressão gênica e o funcionamento e interação de suas proteínas com as proteínas dos hospedeiros, para citar dois exemplos. Tendo em vista o salto qualitativo no conhecimento das propriedades biológicas e moleculares obtido para outros bunyavírus por meio do desenvolvimento de sistemas de genética reversa, é evidente que o uso desses sistemas proporcionaria o mesmo efeito para o conhecimento sobre tospovírus.

No entanto, algumas barreiras técnicas referentes à produção e manutenção de culturas celulares vegetais ainda permanecem por ser superadas. Ao que tudo indica a melhoria dos métodos de infecção destas culturas celulares por partículas virais maduras, o aumento da eficiência das técnicas de transfecção de células vegetais e o refinamento das condições de cultivo visando uma maior estabilidade das células vegetais em cultura serão passos decisivos para a superação de tais barreiras.

Durante o transcorrer de uma investigação científica pequenas descobertas podem alterar ou expandir o foco inicial de um estudo. No caso do trabalho relatado nesta dissertação, a caracterização molecular do RNA L de TCSV foi um desdobramento inesperado, contudo fortuito, da busca por novas moléculas de DIs.

A análise filogenética de TCSV baseada na proteína L levou a uma importante constatação: o uso da proteína L como critério taxonômico pode proporcionar um melhor entendimento da evolução do gênero *Tospovirus* do que o uso da proteína N. Este resultado está em consonância com uma tendência que possivelmente irá se estabelecer em futuros estudos de diversidade e evolução de tospovírus, tendo em vista a descoberta da ocorrência de rearranjos genômicos interespecíficos, a usar a informação de todo o genoma viral para a classificação de novas espécies em detrimento à visão ortodoxa da taxonomia baseada na proteína N.

Os resultados preliminares apresentados nesta dissertação indicam que o uso de RNAs defectivos-interferentes como mini-genomas para o desenvolvimento de genética reversa de *Tospovirus* é viável, embora alguns aspectos técnicos precisem ser superados como a eficiência da expressão transiente de T7RPol mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e a reprodução exata dos terminais 5' e 3' das moléculas dos DIs.

Referências Bibliográficas

ADKINS, S. et al. An RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions of tomato spotted wilt virus, a plant- and insect-infecting bunyavirus. **Virology**, v. 207, n. 1, p. 308-11, Feb 20 1995.

ALIMOHAMMADI, M.; BAGHERIEH-NAJJAR, M. B. Agrobacterium-mediated transformation of plants: Basic principles and influencing factors. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 20, p. 5142-5148, Oct 19 2009.

ATARASHI, Y.; SAYAMA, H. **Novel defective interfering RNA isolated from tomato spotted wilt virus 19B strain, useful for preventing tomato spotted wilt virus infection in plants belonging to Compositae family**: Nippon Del Monte Kk.

AUTORES, D. **The QIAGEN Guide to Analytical Gels. Part IV: Preparing formaldehyde agarose gels for RNA analysis.**: QIAGEN News 2000.

AUTORES, V. **TECNICAS BASICAS EM BIOLOGIA MOLECULAR**. UNB, 2003. ISBN 9788523006853.

AXELOS, M. et al. A PROTOCOL FOR TRANSIENT GENE-EXPRESSION IN ARABIDOPSIS-THALIANA PROTOPLASTS ISOLATED FROM CELL-SUSPENSION CULTURES. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 123-128, Jan-Feb 1992.

BALL, L. A.; JOHNSON, K. L. Reverse genetics of nodaviruses. **Advances in Virus Research, Vol 53**, v. 53, p. 229-244, 1999 1999.

BALTIMORE, D. EXPRESSION OF ANIMAL VIRUS GENOMES. **Bacteriological Reviews**, v. 35, n. 3, p. 235-&, 1971 1971.

BANDLA, M. D. et al. Interaction of Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV) Glycoproteins with a Thrips Midgut Protein, a Potential Cellular Receptor for TSWV. **Phytopathology**, v. 88, n. 2, p. 98-104, Feb 1998.

BEIKZADEH, N. et al. Infection of Alstroemeria Plants with Tomato yellow ring virus in Iran. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 1, p. 45-47, Jan 2012.

BERTRAN, A. G. M. et al. Molecular characterization of the RNA-dependent RNA polymerase from groundnut ringspot virus (genus Tospovirus, family Bunyaviridae). **Arch Virol**, v. 156, n. 8, p. 1425-9, Aug 2011.

BERTRAN, A. G. M. et al. Erratum to: Molecular characterization of the RNA-dependent RNA polymerase from groundnut ringspot virus (genus Tospovirus , family Bunyaviridae). **Archives of Virology**, v. 156, n. 8, p. 1431-1432, 2011.

BEZERRA, I. C. et al. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, v. 89, n. 9, p. 823-830, Sep 1999.

BLAKQORI, G.; VAN KNIPPENBERG, I.; ELLIOTT, R. M. Bunyamwera Orthobunyavirus S-Segment Untranslated Regions Mediate Poly(A) Tail-Independent Translation. **Journal of Virology**, v. 83, n. 8, p. 3637-3646, Apr 15 2009.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Serviço de Produção de Informação - SPI, 1998. ISBN 9788573830309.

BRENDEL, V. et al. METHODS AND ALGORITHMS FOR STATISTICAL-ANALYSIS OF PROTEIN SEQUENCES. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 6, p. 2002-2006, 1992.

BRENNAN, B. et al. Creation of a Recombinant Rift Valley Fever Virus with a Two-Segmented Genome. **Journal of Virology**, v. 85, n. 19, p. 10310-10318, Oct 2011.

BRIDGEN, A.; ELLIOTT, R. M. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 26, p. 15400-15404, Dec 24 1996.

BRIDGEN, A. et al. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 2, p. 664-669, Jan 16 2001.

BUCHER, E. et al. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. **J Virol**, v. 77, n. 2, p. 1329-36, Jan 2003.

BURAND, J. P. et al. Infection with the insect virus Hz-2v alters mating behavior and pheromone production in female *Helicoverpa zea* moths. **Journal of Insect Science**, v. 5, Mar 24 2005.

CHANCELLOR, T. C. B. et al. The flight activity and infectivity of the major leafhopper vectors (Hemiptera:Cicadellidae) of rice tungro viruses in an irrigated rice area in the Philippines. **Bulletin of Entomological Research**, v. 87, n. 3, p. 247-258, Jun 1997.

CHAPMAN, E. J.; HILSON, P.; GERMAN, T. L. Association of L protein and in vitro tomato spotted wilt virus RNA-dependent RNA polymerase activity. **Intervirology**, v. 46, n. 3, p. 177-81, 2003.

CHEN, G. et al. RICE TUNGRO BACILLIFORM VIRUS - TRANSCRIPTION AND TRANSLATION IN PROTOPLASTS. **Virology**, v. 204, n. 1, p. 91-100, Oct 1994.

CHUDAKOV, D. M. et al. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 1103-1163, Jul 2010.

COCHRANE, J. C.; STROBEL, S. A. Catalytic strategies of self-cleaving ribozymes. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 8, p. 1027-1035, Aug 2008.

COHEN, S. N. et al. CONSTRUCTION OF BIOLOGICALLY FUNCTIONAL BACTERIAL PLASMIDS IN-VITRO. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 11, p. 3240-3244, 1973 1973.

COLE, C.; BARBER, J. D.; BARTON, G. J. The Jpred 3 secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. W197-W201, 2008.

COMBET, C. et al. NPS@: Network Protein Sequence Analysis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 3, p. 147-150, 2000.

CONZELMANN, K. K. Reverse genetics of Mononegavirales. **Biology of Negative Strand Rna Viruses: the Power of Reverse Genetics**, v. 283, p. 1-41, 2004 2004.

CORTEZ, I. et al. Identification and characterization of a novel tospovirus species using a new RT-PCR approach. **Arch Virol**, v. 146, n. 2, p. 265-78, 2001.

DE ÁVILA, A. C. et al. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. **J Gen Virol**, v. 74 (Pt 2), p. 153-9, Feb 1993.

DE ÁVILA, A. C. et al. Distinct levels of relationships between tospovirus isolates. **Arch Virol**, v. 128, n. 3-4, p. 211-27, 1993.

DE ÁVILA, A. C. et al. SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF 20 ISOLATES OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 2801-2807, 1990.

DE HAAN, P. et al. TOMATO SPOTTED WILT VIRUS-L RNA ENCODES A PUTATIVE RNA-POLYMERASE. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2207-2216, 1991.

DE HAAN, P. et al. THE S-RNA SEGMENT OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS HAS AN AMBISENSE CHARACTER. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 1001-1007, 1990.

DE MEDEIROS, R. B. et al. Expression of a viral polymerase-bound host factor turns human cell lines permissive to a plant- and insect-infecting virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 4, p. 1175-80, Jan 25 2005.

DE OLIVEIRA, A. S. et al. An RNA-dependent RNA polymerase gene of a distinct Brazilian tospovirus. **Virus Genes**, v. 43, n. 3, p. 385-9, Dec 2011.

DEPOLO, N. J.; GIACHETTI, C.; HOLLAND, J. J. CONTINUING COEVOLUTION OF VIRUS AND DEFECTIVE INTERFERING PARTICLES AND OF VIRAL GENOME SEQUENCES DURING UNDILUTED PASSAGES - VIRUS MUTANTS EXHIBITING NEARLY COMPLETE RESISTANCE TO FORMERLY DOMINANT DEFECTIVE INTERFERING PARTICLES. **Journal of Virology**, v. 61, n. 2, p. 454-464, Feb 1987.

DIMMOCK, N.; EASTON, A. **Use of cloned, defective interfering virus in the prevention or treatment of virus infection or disease e.g. influenza A virus, or hepatitis B virus in an individual**: Univ Warwick.

DIMMOCK, N. J.; BECK, S.; MCLAIN, L. PROTECTION OF MICE FROM LETHAL INFLUENZA - EVIDENCE THAT DEFECTIVE INTERFERING VIRUS MODULATES THE IMMUNE-RESPONSE AND NOT VIRUS MULTIPLICATION. **Journal of General Virology**, v. 67, p. 839-850, May 1986.

DONG, J. H. et al. Characterization of Tomato zonate spot virus, a new tospovirus in China. **Archives of Virology**, v. 153, n. 5, p. 855-864, 2008

DUBY, G. et al. The proteome complement of Nicotiana tabacum Bright-Yellow-2 culture cells. **Proteomics**, v. 10, n. 13, p. 2545-2550, Jul 2010.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 4, p. 267-276, Apr 2008.

DUIJSINGS, D.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. In vivo analysis of the TSWV cap-snatching mechanism: single base complementarity and primer length requirements. **EMBO J**, v. 20, n. 10, p. 2545-52, May 15 2001.

EASTON, A. J. et al. A novel broad-spectrum treatment for respiratory virus infections: Influenza-based defective interfering virus provides protection against pneumovirus infection in vivo. **Vaccine**, v. 29, n. 15, p. 2777-2784, Mar 24 2011.

ESCHARMIS, C.; LAZARO, E.; MANRUBIA, S. C. Population bottlenecks in quasispecies dynamics. **Quasispecies: Concept and Implications for Virology**, v. 299, p. 141-170, 2006 2006.

FAKHFAKH, H. et al. Cell-free cloning and biolistic inoculation of an infectious cDNA of potato virus Y. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 519-523, Mar 1996.

FAUQUET, C.; MAYO, M. Part II: The Viruses - The Virus Diagrams. In: FAUQUET, C.; MAYO, M., *et al* (Ed.). **Virus Taxonomy: Eih Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier Academic Press, 2005. ISBN 0-12-249951-4.

FERRON, F. et al. The Hexamer Structure of the Rift Valley Fever Virus Nucleoprotein Suggests a Mechanism for its Assembly into Ribonucleoprotein Complexes. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 5, May 2011.

FIGLEROWICZ, M.; BUJARSKI, J. J. RNA recombination in brome mosaic virus, a model plus strand RNA virus. **Acta Biochimica Polonica**, v. 45, n. 4, p. 847-868, 1998.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, Feb 19 1998.

FRANK, S. A. Within-host spatial dynamics of viruses and defective interfering particles. **Journal of Theoretical Biology**, v. 206, n. 2, p. 279-290, Sep 21 2000.

FUERST, T. R. et al. EUKARYOTIC TRANSIENT-EXPRESSION SYSTEM BASED ON RECOMBINANT VACCINIA VIRUS THAT SYNTHESIZES BACTERIOPHAGE-T7 RNA-POLYMERASE. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 21, p. 8122-8126, Nov 1986.

GARCIA-CANO, E. et al. Synergistic Interaction Between Tomato chlorosis virus and Tomato spotted wilt virus Results in Breakdown of Resistance in Tomato. **Phytopathology**, v. 96, n. 11, p. 1263-9, Nov 2006.

GASTEIGER, E. et al. Identification and analysis tools on the ExPasy server. In: WALKER, J. (Ed.). **The proteomics protocols handbook**: Humana Press, 2005. p.571-607.

GEERTS-DIMITRIADOU, C. et al. Analysis of the *Tomato spotted wilt virus* ambisense S RNA-encoded hairpin structure in translation. **PLOS ONE**, v. In press, 2011.

GELVIN, S. B.; KIM, S.-I. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression**, v. 1769, n. 5-6, p. 410-421, May-Jun 2007.

GHERARDINI, P.; HELMER-CITTERICH, M. Structure-based function prediction: approaches and application. **Brief Funct Genomic Proteomic**, v. 7, n. 4, p. 291-302, 2008.

GRAY, S. M. Plant virus proteins involved in natural vector transmission. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 259-264, Jul 1996.

HAMILTON, A. J.; BAULCOMBE, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 950-2, Oct 1999.

HAQUE, A.; MIR, M. A. Interaction of Hantavirus Nucleocapsid Protein with Ribosomal Protein S19. **Journal of Virology**, v. 84, n. 23, p. 12450-12453, Dec 2010.

HARDY, S. et al. Reverse genetics in eukaryotes. **Biology of the Cell**, v. 102, n. 10, p. 561-580, Oct 2010.

HAVELDA, Z.; DALMAY, T.; BURGYN, J. Secondary structure-dependent evolution of Cymbidium ringspot virus defective interfering RNA. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1227-1234, Jun 1997.

HASSANI-MEHRABAN, A. et al. A distinct tospovirus causing necrotic streak on *Alstroemeria* sp in Colombia. **Archives of Virology**, v. 155, n. 3, p. 423-428, 2010

HEIM, R.; PRASHER, D. C.; TSIEN, R. Y. WAVELENGTH MUTATIONS AND POSTTRANSLATIONAL AUTOXIDATION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12501-12504, Dec 1994.

HOFFMANN, E. et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 11, p. 6108-6113, May 23 2000.

HUANG, A. S.; WAGNER, R. R. INHIBITION OF CELLULAR RNA SYNTHESIS BY NONREPLICATING VESICULAR STOMATITIS VIRUS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 54, n. 6, p. 1579-&, 1965 1965.

_____. DEFECTIVE T PARTICLES OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS .2. BIOLOGIC ROLE IN HOMOLOGOUS INTERFERENCE. **Virology**, v. 30, n. 2, p. 173-&, 1966 1966a.

_____. HOMOLOGOUS INTERFERENCE BY A NONREPLICATIVE TRUNCATED (T) FORM OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS (VSV). **Federation Proceedings**, v. 25, n. 2P1, p. 491-&, 1966 1966b.

HUHNS, S. et al. Tomato spotted wilt virus (TSWV) infection of *Physcomitrella patens* gametophores. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 75, n. 2, p. 183-187, Nov 2003.

HUISKONEN, J. T. et al. Electron Cryotomography of Tula Hantavirus Suggests a Unique Assembly Paradigm for Enveloped Viruses. **Journal of Virology**, v. 84, n. 10, p. 4889-4897, May 2010.

ICHIKI, T. U. et al. Integration of mutations responsible for the attenuated phenotype of Pepper mild mottle virus strains results in a symptomless cross-protecting strain. **Archives of Virology**, v. 150, n. 10, p. 2009-2020, Oct 2005.

INOUE-NAGATA, A. K. et al. Effects of Temperature and Host on the Generation of Tomato Spotted Wilt Virus Defective Interfering RNAs. **Phytopathology**, v. 87, n. 11, p. 1168-73, Nov 1997.

INOUE-NAGATA, A. K. et al. Molecular characterization of tomato spotted Wilt virus defective interfering RNAs and detection of truncated L proteins. **Virology**, v. 248, n. 2, p. 342-56, Sep 1 1998.

INOUE, K. et al. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. **Journal of Virological Methods**, v. 107, n. 2, p. 229-236, Feb 2003.

JAKUBIEC, A. et al. Proteolytic processing of Turnip Yellow Mosaic Virus replication proteins and functional impact on infectivity. **Journal of Virology**, v. 81, n. 20, p. 11402-11412, Oct 2007.

JANZAC, B. et al. A Point Mutation in the Polymerase of Potato virus Y Confers Virulence Toward the Pvr4 Resistance of Pepper and a High Competitiveness Cost in Susceptible Cultivar. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 6, p. 823-830, Jun 2010.

KAWOKA, Y. **Biology of negative stranded RNA viruses: the power of reverse genetics**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2004. 347 ISBN 978-3-540-40661-7.

KIKKERT, M. et al. Tomato spotted wilt virus particle morphogenesis in plant cells. **J Virol**, v. 73, n. 3, p. 2288-97, Mar 1999.

KIKKERT, M. et al. A protoplast system for studying tomato spotted wilt virus infection. **J Gen Virol**, v. 78 (Pt 7), p. 1755-63, Jul 1997.

KIRKWOOD, T. B. L.; BANGHAM, C. R. M. CYCLES, CHAOS, AND EVOLUTION IN VIRUS CULTURES - A MODEL OF DEFECTIVE INTERFERING PARTICLES. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 18, p. 8685-8689, Aug 30 1994.

KOHL, A. et al. Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. **Journal of Virology**, v. 77, n. 14, p. 7999-8008, Jul 2003.

KOHL, A. et al. Complementarity, sequence and structural elements within the 3' and 5' non-coding regions of the Bunyamwera orthobunyavirus S segment determine promoter strength. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 3269-3278, Nov 2004.

KOHL, A. et al. A Bunyamwera virus minireplicon system in mosquito cells. **Journal of Virology**, v. 78, n. 11, p. 5679-5685, Jun 2004.

KOHL, A. et al. Genetic elements regulating packaging of the Bunyamwera orthobunyavirus genome. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 177-187, Jan 2006.

KORMELINK, R. et al. VIRAL-RNA SYNTHESIS IN TOMATO SPOTTED WILT VIRUS-INFECTED NICOTIANA-RUSTICA PLANTS. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 687-693, Mar 1992.

KORMELINK, R. et al. THE NONSTRUCTURAL PROTEIN (NSS) ENCODED BY THE AMBISENSE-S RNA SEGMENT OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS IS ASSOCIATED WITH FIBROUS STRUCTURES IN INFECTED-PLANT CELLS. **Virology**, v. 181, n. 2, p. 459-468, 1991.

KORMELINK, R. et al. Expression and subcellular location of the NSM protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. **Virology**, v. 200, n. 1, p. 56-65, Apr 1994.

KORMELINK, R. et al. NONVIRAL HETEROGENEOUS SEQUENCES AT THE 5' ENDS OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS MESSENGER-RNAs. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 2125-2128, Aug 1992.

LAW, M. D.; MORRIS, T. J. DE-NOVO GENERATION AND ACCUMULATION OF TOMATO BUSHY STUNT VIRUS DEFECTIVE INTERFERING RNAs WITHOUT SERIAL HOST PASSAGE. **Virology**, v. 198, n. 1, p. 377-380, Jan 1994.

LAW, M. D.; SPECK, J.; MOYER, J. W. The M RNA of impatiens necrotic spot Tospovirus (Bunyaviridae) has an ambisense genomic organization. **Virology**, v. 188, n. 2, p. 732-41, Jun 1992.

LEONARD, V. H. J. et al. Interaction of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein with mediator protein MED8: a mechanism for inhibiting the interferon response. **Journal of Virology**, v. 80, n. 19, p. 9667-9675, Oct 2006.

LEWANDOWSKI, D. J.; ADKINS, S. The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. **Virology**, v. 342, n. 1, p. 26-37, Nov 10 2005.

LEWANDOWSKI, D. J.; DAWSON, W. O. Deletion of internal sequences results in tobacco mosaic virus defective RNAs that accumulate to high levels without interfering with replication of the helper virus. **Virology**, v. 251, n. 2, p. 427-437, Nov 25 1998.

LI, B. Y. et al. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA using an RNA polymerase II promoter. **Archives of Virology**, v. 156, n. 6, p. 979-986, Jun 2011.

LI, W. et al. Characterization of Tomato spotted wilt virus NSm protein domains involved in tubule formation, movement and symptoms. **Phytopathology**, v. 99, n. 6, p. S71-S72, Jun 2009a.

_____. Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. **Virology**, v. 390, n. 1, p. 110-21, Jul 20 2009b.

LI, X. H. et al. TURNIP CRINKLE VIRUS DEFECTIVE INTERFERING RNAs INTENSIFY VIRAL SYMPTOMS AND ARE GENERATED DENOVO. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 23, p. 9173-9177, Dec 1989.

LIMA, M. F. et al. Levantamento e identificação de espécies de tospovírus em tomateiro e pimentão no sub-médio do Vale do São Francisco e no Distrito Federal. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 205-210, 2000.

LOKESH, B. et al. NSs encoded by groundnut bud necrosis virus is a bifunctional enzyme. **Plos One**, v. 5, n. 3, p. e9757, 2010.

LOPEZ, C. et al. Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 1, p. 210-5, Jan 2011.

LOVATO, F. A. et al. The N protein of Tomato spotted wilt virus (TSWV) is associated with the induction of programmed cell death (PCD) in Capsicum chinense plants, a hypersensitive host to TSWV infection. **Virus Research**, v. 137, n. 2, p. 245-252, Nov 2008.

LOVISOLO, O.; HULL, R.; ROSLER, O. Coevolution of viruses with hosts and vectors and possible paleontology. **Advances in Virus Research, Vol 62**, v. 62, p. 325-379, 2003 2003.

LOWEN, A. C.; ELLIOTT, R. M. Mutational analyses of the nonconserved sequences in the bunyamwera orthobunyavirus S segment untranslated regions. **Journal of Virology**, v. 79, n. 20, p. 12861-12870, Oct 2005.

LOWEN, A. C. et al. Efficient bunyavirus rescue from cloned cDNA. **Virology**, v. 330, n. 2, p. 493-500, Dec 20 2004.

LUYTJES, W. et al. AMPLIFICATION, EXPRESSION, AND PACKAGING OF A FOREIGN GENE BY INFLUENZA-VIRUS. **Cell**, v. 59, n. 6, p. 1107-1113, Dec 22 1989.

MACDONALD, L. E.; ZHOU, Y. W.; MCALLISTER, W. T. TERMINATION AND SLIPPAGE BY BACTERIOPHAGE-T7 RNA-POLYMERASE. **Journal of Molecular Biology**, v. 232, n. 4, p. 1030-1047, Aug 20 1993.

MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, p. 387-402, 2008 2008.

MARRIOTT, A. C.; DIMMOCK, N. J. Defective interfering viruses and their potential as antiviral agents. **Reviews in Medical Virology**, v. 20, n. 1, p. 51-62, Jan 2010.

MCALLISTER, W. T.; RASKIN, C. A. THE PHAGE RNA-POLYMERASES ARE RELATED TO DNA-POLYMERASES AND REVERSE TRANSCRIPTASES. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-6, Oct 1993.

MCCULLEN, C. A.; BINNS, A. N. Agrobacterium tumefaciens and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 101-127, 2006 2006.

MCLAIN, L.; ARMSTRONG, S. J.; DIMMOCK, N. J. ONE DEFECTIVE INTERFERING PARTICLE PER CELL PREVENTS INFLUENZA VIRUS-MEDIATED CYTO-PATHOLOGY - AN EFFICIENT ASSAY SYSTEM. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 1415-1419, Jun 1988.

MEDINA-ORTEGA, K. J. et al. Rhopalosiphum padi (Hemiptera: Aphididae) Responses to Volatile Cues From Barley Yellow Dwarf Virus-Infected Wheat. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 3, p. 836-845, Jun 2009.

MILNE, R. G.; FRANCKI, R. I. B. SHOULD TOMATO SPOTTED WILT VIRUS BE CONSIDERED AS A POSSIBLE MEMBER OF THE FAMILY BUNYAVIRIDAE. **Intervirology**, v. 22, n. 2, p. 72-76, 1984.

MIR, M. A. et al. Hantavirus N protein exhibits genus-specific recognition of the viral RNA panhandle. **J Virol**, v. 80, n. 22, p. 11283-92, Nov 2006.

MIR, M. A.; PANGANIBAN, A. T. Trimeric hantavirus nucleocapsid protein binds specifically to the viral RNA panhandle. **Journal of Virology**, v. 78, n. 15, p. 8281-8288, Aug 2004.

_____. The bunyavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone: Possible roles in viral RNA panhandle formation and genome replication. **Rna-a Publication of the Rna Society**, v. 12, n. 2, p. 272-282, Feb 2006.

NAGATA, T. et al. Occurrence of different *Tospovirus* in six states of Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 90-95, 1995.

NAGATA, T. et al. Impeded thrips transmission of defective Tomato spotted wilt virus isolates. **Phytopathology**, v. 90, n. 5, p. 454-459, May 2000.

NAGATA, T.; NEMOTO, Y.; HASEZAWA, S. TOBACCO BY-2 CELL-LINE AS THE HELA-CELL IN THE CELL BIOLOGY OF HIGHER-PLANTS. **International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology**, v. 132, p. 1-30, 1992.

NAGATA, T. et al. Multiplication of tomato spotted wilt virus in primary cell cultures derived from two thrips species. **Virus Res**, v. 49, n. 1, p. 59-66, May 1997.

NELSON, G. W.; PERELSON, A. S. MODELING DEFECTIVE INTERFERING VIRUS THERAPY FOR AIDS - CONDITIONS FOR DIV SURVIVAL. **Mathematical Biosciences**, v. 125, n. 2, p. 127-153, Feb 1995.

NEUMANN, G. et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 16, p. 9345-9350, Aug 3 1999.

NEUMANN, G.; WHITT, M. A.; KAWAOKA, Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2635-2662, Nov 2002.

NICHOT, S. et al. Bunyviridae. In: FAUQUET, C.; MAYO, M., *et al* (Ed.). **Virus Taxonomy: VIIIth Report of the ICTV**. San Diego: Elsevier/Academic Press, 2005. p.695-716.

NOBLE, S.; DIMMOCK, N. J. DEFECTIVE INTERFERING TYPE-A EQUINE INFLUENZA-VIRUS (H3N8) PROTECTS MICE FROM MORBIDITY AND MORTALITY CAUSED BY HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS SUBTYPES OF INFLUENZA-A VIRUS. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 3485-3491, Dec 1994.

NWANKWO, D. O. CLONING OF A PAIR OF GENES ENCODING ISOSCHIZOMERIC RESTRICTION ENDONUCLEASES FROM BACILLUS SPECIES - THE BSPEI AND BSPMII RESTRICTION AND MODIFICATION SYSTEMS. **Gene**, v. 157, n. 1-2, p. 31-35, May 19 1995.

O'REILLY, E. K.; KAO, C. C. Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. **Virology**, v. 252, n. 2, p. 287-303, 1998.

OKADA, Y. Historical overview of research on the tobacco mosaic virus genome: genome organization, infectivity and gene manipulation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 354, n. 1383, p. 569-582, Mar 1999.

OLIVEIRA, V. C. et al. A silencing suppressor protein (NSs) of a tospovirus enhances baculovirus replication in permissive and semipermissive insect cell lines. **Virus Res**, v. 155, n. 1, p. 259-67, Jan 2011.

OREILLY, D. R. BACULOVIRUS-ENCODED ECDYSTEROID UDP-GLUCOSYLTRANSFERASES. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 5, p. 541-550, May 1995.

PAAPE, M. et al. At-4/1, an interactor of the Tomato spotted wilt virus movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 19, n. 8, p. 874-83, Aug 2006.

PACURAR, D. I. et al. Agrobacterium tumefaciens: From crown gall tumors to genetic transformation. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 76, n. 2, p. 76-81, Aug 2011.

PALMER, B. R.; MARINUS, M. G. THE DAM AND DCM STRAINS OF ESCHERICHIA-COLI - A REVIEW. **Gene**, v. 143, n. 1, p. 1-12, May 27 1994.

PAPPU, H. R.; JONES, R. A.; JAIN, R. K. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. **Virus Res**, v. 141, n. 2, p. 219-36, May 2009.

PATHAK, K. B.; NAGY, P. D. Defective Interfering RNAs: Foes of Viruses and Friends of Virologists. **Viruses-Basel**, v. 1, n. 3, p. 895-919, Dec 2009.

PERROTTA, A. T.; BEEN, M. D. THE SELF-CLEAVING DOMAIN FROM THE GENOMIC RNA OF HEPATITIS DELTA-VIRUS - SEQUENCE REQUIREMENTS AND THE EFFECTS OF DENATURANT. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 23, p. 6821-6827, Dec 11 1990.

POGANY, J. et al. DE-NOVO GENERATION OF DEFECTIVE INTERFERING-LIKE RNAs IN BROAD BEAN MOTTLE BROMOVIRUS. **Virology**, v. 212, n. 2, p. 574-586, Oct 1 1995.

POWER, A. G. Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 4, p. 336-340, Aug 2000.

POZZER, L et al. CHARACTERIZATION OF A TOSPOVIRUS ISOLATE OF IRIS YELLOW SPOT VIRUS ASSOCIATED WITH A DISEASE IN ONION FIELDS IN BRAZIL. **Plant Disease**, v. 83, n. 4, p. 345-350, 1999

PYLE, A. M. RIBOZYMES - A DISTINCT CLASS OF METALLOENZYMES. **Science**, v. 261, n. 5122, p. 709-714, Aug 6 1993.

QUEVILLON, E. et al. InterProScan: protein domains identifier. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. W116-W120, 2005.

RACANIELLO, V. R.; BALTIMORE, D. CLONED POLIOVIRUS COMPLEMENTARY-DNA IS INFECTIOUS IN MAMMALIAN-CELLS. **Science**, v. 214, n. 4523, p. 916-919, 1981 1981.

RAGHUPATHY, M. B. et al. Transfection of Arabidopsis protoplasts with a Plum pox virus (PPV) infectious clone for studying early molecular events associated with PPV infection. **Journal of Virological Methods**, v. 136, n. 1-2, p. 147-153, Sep 2006.

REGUERA, J.; WEBER, F.; CUSACK, S. Bunyaviridae RNA Polymerases (L-Protein) Have an N-Terminal, Influenza-Like Endonuclease Domain, Essential for Viral Cap-Dependent Transcription. **Plos Pathogens**, p. -, SEP 2010 2010.

RESENDE, R. O. et al. GENERATION OF ENVELOPE AND DEFECTIVE INTERFERING RNA MUTANTS OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS BY MECHANICAL PASSAGE. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2375-2383, Oct 1991.

RESENDE, R. O. et al. Defective interfering L RNA segments of tomato spotted wilt virus retain both virus genome termini and have extensive internal deletions. **J Gen Virol**, v. 73 (Pt 10), p. 2509-16, Oct 1992.

RESENDE, R. O. et al. New tospoviruses found in Brazil. Proceedings of the International Symposium on *Tospovirus* and Thrips of Floral and Vegetable Crops. **Acta horticulturae**, v. 431, p. 78-89, 1996.

RIBEIRO, D. et al. Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. **Virology**, v. 383, n. 1, p. 121-30, Jan 5 2009.

RIBEIRO, D. et al. Tomato spotted wilt virus glycoproteins induce the formation of endoplasmic reticulum- and Golgi-derived pleomorphic membrane structures in plant cells. **J Gen Virol**, v. 89, n. Pt 8, p. 1811-8, Aug 2008.

RIBEIRO, D.; GOLDBACH, R.; KORMELINK, R. Requirements for ER-arrest and sequential exit to the golgi of Tomato spotted wilt virus glycoproteins. **Traffic**, v. 10, n. 6, p. 664-72, Jun 2009.

RICHMOND, K. E. et al. Characterization of the nucleic acid binding properties of tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein. **Virology**, v. 248, n. 1, p. 6-11, Aug 15 1998.

ROMERO, J. et al. CHARACTERIZATION OF DEFECTIVE INTERFERING RNA COMPONENTS THAT INCREASE SYMPTOM SEVERITY OF BROAD BEAN MOTTLE VIRUS-INFECTIONS. **Virology**, v. 194, n. 2, p. 576-584, Jun 1993.

RONG, M. Q. et al. Promoter specificity determinants of T7 RNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 2, p. 515-519, Jan 20 1998.

ROZENBERG, Y.; ANDERSON, W. F. **Defective interfering HIV particles**: Univ Southern California; Rozenberg Y; Anderson W F.

RUBIO, T. et al. Expression of defective interfering RNAs in transgenic plants confers broad spectrum resistance to virus infection. **Plant Physiology**, v. 114, n. 3, p. 1573-1573, Jul 1997.

RUSSELL, D. W.; HIRATA, R. K. THE DETECTION OF EXTREMELY RARE DNA MODIFICATIONS - METHYLATION IN DAM- AND HSD- ESCHERICHIA-COLI STRAINS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 18, p. 10787-10794, Jun 25 1989.

SAIKI, R. K. et al. ENZYMATIC AMPLIFICATION OF BETA-GLOBIN GENOMIC SEQUENCES AND RESTRICTION SITE ANALYSIS FOR DIAGNOSIS OF SICKLE-CELL ANEMIA. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985 1985.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell**. Cold Spring Harbor, N.Y. : : Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. ISBN 0879695773 (pbk.)
0879695765 (hbk.).

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA SEQUENCING WITH CHAIN-TERMINATING INHIBITORS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHNELL, M. J.; MEBATSION, T.; CONZELMANN, K. K. INFECTIOUS RABIES VIRUSES FROM CLONED CDNA. **Embo Journal**, v. 13, n. 18, p. 4195-4203, Sep 15 1994.

SCHNETTLER, E. et al. Diverging affinity of tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. **J Virol**, v. 84, n. 21, p. 11542-54, Nov 2010.

SCHOLTHOF, K.-B. G. et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 9, p. 938-954, Dec 2011.

SCHUBERT, M. et al. TARGETED DEFECTIVE INTERFERING HIV PARTICLES AS AN ANTIVIRAL STRATEGY. **Aids Research and Human Retroviruses**, v. 8, n. 5, p. 863-863, May 1992.

SCOTT, P. D. et al. Defective interfering influenza virus confers only short-lived protection against influenza virus disease: Evidence for a role for adaptive immunity in DI virus-mediated protection in vivo. **Vaccine**, v. 29, n. 38, p. 6584-6591, Sep 2 2011.

SEYA, T.; MATSUMOTO, M.; SHINGAI, M. **Agent useful for immunotherapy of tumor, and as pharmaceutical for enhancing natural killer activity or promoting production of interferon-beta, contains defective interfering RNA having RNA sequence derived from measles virus**: Univ Hokkaido Nat Corp.

SHARMA, P. K. et al. Characterization of silencing suppressor activity of NSs from Iris yellow spot virus (Genus Tospovirus). **Phytopathology**, v. 101, n. 6, p. S164-S164, Jun 2011.

SHI, X. et al. Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 16, p. 8089-8099, Aug 2006.

SHI, X. et al. Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis. **Journal of Virology**, v. 81, n. 18, p. 10151-10160, Sep 2007.

SHI, X. et al. Visualizing the Replication Cycle of Bunyamwera Orthobunyavirus Expressing Fluorescent Protein-Tagged Gc Glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 84, n. 17, p. 8460-8469, Sep 2010.

SHI, X. H.; BRAUBURGER, K.; ELLIOTT, R. M. Role of N-linked glycans on Bunyamwera virus glycoproteins in intracellular trafficking, protein folding, and virus infectivity. **Journal of Virology**, v. 79, n. 21, p. 13725-13734, Nov 2005.

SHI, X. H.; LAPPIN, D. F.; ELLIOTT, R. M. Mapping the golgi targeting and retention signal of Bunyamwera virus glycoproteins. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10793-10802, Oct 2004.

SIMON-LORIERE, E.; HOLMES, E. C. Why do RNA viruses recombine? **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 617-626, Aug 2011.

SOELLICK, T. et al. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 5, p. 2373-8, Feb 29 2000.

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

STEINECKE, P. et al. Early events of tomato spotted wilt transcription and replication in protoplasts. **New Microbiol**, v. 21, n. 3, p. 263-8, Jul 1998.

STEITZ, T. A. The structural changes of T7 RNA polymerase from transcription initiation to elongation. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, n. 6, p. 683-690, Dec 2009.

STORMS, M. M. et al. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. **Virology**, v. 214, n. 2, p. 485-93, Dec 20 1995.

STRAHLE, L.; GARCIN, D.; KOLAKOFSKY, D. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. **Virology**, v. 351, n. 1, p. 101-111, Jul 20 2006.

STRATMANN, J. W.; HIND, S. R. Gene silencing goes viral and uncovers the private life of plants. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v. 140, n. 2, p. 91-102, Aug 2011.

STREITENFELD, H. et al. Activation of PKR by Bunyamwera virus is independent of the viral interferon antagonist NSs. **Journal of Virology**, v. 77, n. 9, p. 5507-5511, May 2003.

TABOR, S.; RICHARDSON, C. C. A BACTERIOPHAGE-T7 RNA-POLYMERASE PROMOTER SYSTEM FOR CONTROLLED EXCLUSIVE EXPRESSION OF SPECIFIC GENES. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 4, p. 1074-1078, 1985 1985.

TAKEDA, A. et al. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. **FEBS Lett**, v. 532, n. 1-2, p. 75-9, Dec 4 2002.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, Oct 2011.

TANIGUCHI, T.; PALMIERI, M.; WEISSMANN, C. Q-BETA DNA-CONTAINING HYBRID PLASMIDS GIVING RISE TO Q-BETA PHAGE FORMATION IN BACTERIAL HOST. **Nature**, v. 274, n. 5668, p. 223-228, 1978 1978.

TENTCHEV, D. et al. Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 4, p. 961-73, Apr 2011.

TORRES, R. et al. Pepper necrotic spot virus, a new tospovirus infecting solanaceous crops in Peru. **Arch Virol**, Jan 5 2012.

TSAI, K.-N. et al. Defective interfering RNAs of Japanese encephalitis virus found in mosquito cells and correlation with persistent infection. **Virus Research**, v. 124, n. 1-2, p. 139-150, Mar 2007.

ULLMAN, D. E. et al. COMPARTMENTALIZATION, INTRACELLULAR-TRANSPORT, AND AUTOPHAGY OF TOMATO SPOTTED WILT TOSPOVIRUS PROTEINS IN INFECTED THRIPS CELLS. **Phytopathology**, v. 85, n. 6, p. 644-654, 1995.

VAN KNIPPENBERG, I.; GOLDBACH, R.; KORMELINK, R. Purified tomato spotted wilt virus particles support both genome replication and transcription in vitro. **Virology**, v. 303, n. 2, p. 278-86, Nov 25 2002.

VAN KNIPPENBERG, I. et al. Tomato spotted wilt virus transcriptase in vitro displays a preference for cap donors with multiple base complementarity to the viral template. **Virology**, v. 335, n. 1, p. 122-30, Apr 25 2005.

VAN POELWIJK, F. et al. DETECTION OF THE L-PROTEIN OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 468-470, 1993.

VAN POELWIJK, F.; KOLKMAN, J.; GOLDBACH, R. Sequence analysis of the 5' ends of tomato spotted wilt virus N mRNAs. **Archives of Virology**, v. 141, n. 1, p. 177-184, 1996 1996.

VASHIST, S. et al. Model systems for the study of human norovirus biology. **Future Virology**, v. 4, n. 4, p. 353-367, Jul 2009.

VERKLEIJ, F. N.; DEVRIES, P.; PETERS, D. EVIDENCE THAT TOMATO SPOTTED WILT VIRUS-RNA IS A POSITIVE STRAND. **Journal of General Virology**, v. 58, n. FEB, p. 329-338, 1982 1982.

VISSER, P. B. et al. Nematode transmission of tobacco rattle virus serves as a bottleneck to clear the virus population from defective interfering RNAs. **Virology**, v. 263, n. 1, p. 155-165, Oct 10 1999.

VON BARGEN, S. et al. Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1083-1093, Dec 2001.

VON MAGNUS, P. PROPAGATION OF THE PR8 STRAIN OF INFLUENZA A VIRUS IN CHICK EMBRYOS .3. PROPERTIES OF THE INCOMPLETE VIRUS PRODUCED IN SERIAL PASSAGES OF UNDILUTED VIRUS. **Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica**, v. 29, n. 2, p. 157-181, 1951 1951.

WALPITA, P.; FLICK, R. Reverse genetics of negative-stranded RNA viruses: A global perspective. **Fems Microbiology Letters**, v. 244, n. 1, p. 9-18, Mar 1 2005.

WALTER, C. T.; BARR, J. N. Bunyamwera virus can repair both insertions and deletions during RNA replication. **Rna-a Publication of the Rna Society**, v. 16, n. 6, p. 1138-1145, Jun 2010.

WANG, J. B. et al. Agroinoculation of the Crinivirus, Lettuce infectious yellows virus, for systemic plant infection. **Virology**, v. 392, n. 1, p. 131-136, Sep 2009.

WEBER, F. et al. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs counteracts the induction of alpha/beta interferon. **Journal of Virology**, v. 76, n. 16, p. 7949-7955, Aug 2002.

WEBER, F. et al. The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. **Virology**, v. 281, n. 1, p. 67-74, Mar 1 2001.

WEBSTER, C. et al. Identification of Groundnut ringspot virus in tomato in south Florida. **Phytopathology**, v. 100, n. 6, p. S134-S134, Jun 2010.

WEBSTER, C. G. et al. A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. **Virology**, v. 413, n. 2, p. 216-25, May 10 2011.

WHELAN, S. P. J.; BARR, J. N.; WERTZ, G. W. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. **Biology of Negative Strand Rna Viruses: the Power of Reverse Genetics**, v. 283, p. 61-119, 2004 2004.

WHITE, K. A.; BANCROFT, J. B.; MACKIE, G. A. CODING CAPACITY DETERMINES INVIVO ACCUMULATION OF A DEFECTIVE RNA OF CLOVER YELLOW MOSAIC-VIRUS. **Journal of Virology**, v. 66, n. 5, p. 3069-3076, May 1992.

WHITFIELD, A.; ULLMAN, D.; GERMAN, T. Tospovirus-thrips interactions. **Annual Review of Phytopathology**, p. 459-489, 2005 2005.

WICKHAM, T. J. et al. BACULOVIRUS DEFECTIVE INTERFERING PARTICLES ARE RESPONSIBLE FOR VARIATIONS IN RECOMBINANT PROTEIN-PRODUCTION AS A FUNCTION OF MULTIPLICITY OF INFECTION. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 7, p. 483-488, Jul 1991.

WILLIAMS, D. C.; SOPER, S. A. ULTRASENSITIVE NEAR-IR FLUORESCENCE DETECTION FOR CAPILLARY GEL-ELECTROPHORESIS AND DNA-SEQUENCING APPLICATIONS. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 19, p. 3427-3432, Oct 1 1995.

XU, J.; GE, X.; DOLAN, M. C. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 278-299, May-Jun 2011.

YAO, C. Q. et al. Leishmania chagasi: A tetracycline-inducible cell line driven by T7 RNA polymerase. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 205-213, Jul 2007.

YAO, X. J. et al. Baculovirus mediated production of infectious hepatitis C virus in human hepatoma cells stably expressing T7 RNA polymerase. **Molecular Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 186-194, Oct 2008.

YOON, J. Y. et al. Agrobacterium-mediated infection of whole plants by yellow dwarf viruses. **Virus Research**, v. 160, n. 1-2, p. 428-434, Sep 2011.

YOU, Y.; SHIRAKO, Y. Bymovirus reverse genetics: requirements for RNA2-encoded proteins in systemic infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 3, p. 383-394, May 2010.

ZAMOTO-NIIKURA, A. et al. Rift Valley Fever Virus L Protein Forms a Biologically Active Oligomer. **Journal of Virology**, v. 83, n. 24, p. 12779-12789, Dec 15 2009.

ZHOU, J. et al. Molecular characterization of a new Tospovirus infecting soybean. **Virus Genes**, v. 43, n. 2, p. 289-95, Oct 2011.

ZOBEL, A.; NEUMANN, G.; HOBOM, G. RNA POLYMERASE-I CATALYZED TRANSCRIPTION OF INSERT VIRAL CDNA. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 16, p. 3607-3614, Aug 11 1993.

Agradecimentos

Quem disse que essa é a parte mais difícil realmente tinha razão... Não tenho como começar sem agradecer as pessoas para as quais dedico essa dissertação, minha mãe, Miriam, e meu pai, Paulo. Deles herdei o gosto pela ciência e racionalização e a vontade de trabalhar na fronteira do conhecimento. Minha família sempre serviu de exemplo e constitui importante interlocutora e motivadora deste trabalho.

Certamente, não teria chegado até aqui não fosse pela confiança e amizade do prof. Dr. Renato de Oliveira Resende. Nos conhecemos em meu primeiro dia de aulas como calouro do curso de Ciências Biológicas da UnB. Desde então, ele me abriu as portas do mundo científico e me proporcionou trabalhar no Laboratório de Virologia Vegetal. Agradeço por ele ter me aceito como seu aluno de mestrado após um ano distante do laboratório. Creio, Renato, que fui capaz de cumprir a promessa que lhe fiz! Agradeço ainda aos professores Bergmann, Tatsuya, Sônia e José Raimundo pela amizade, discussões e conselhos proporcionados nestes dois anos de mestrado.

Não há como mencionar (em retribuição), o papel do grande mestre Jedi Érico Dianese. Boa sorte nos ensinamentos da mais jovem padawan, Helena. Que a força esteja sempre com vocês!

Em dois anos muitas coisas podem acontecer na vida de uma pessoa... Comigo não foi diferente e o período do mestrado me fez amadurecer tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Não há como negar a importância de alguns atores neste processo: Mariana, Athos e a Dra. Renata foram verdadeiros pontos de inflexão na minha curva da vida. Dedico a eles muito do que aprendi sobre a Biologia, e em especial, sobre a vida.

O respeito e coleguismo de todos nos laboratórios de Virologia Animal, Virologia Vegetal e Baculovírus fez do dia a dia da bancada uma experiência muito divertida. A todos, obrigado. A todos a quem de alguma forma ou de outra contribuíram para esses dois anos e que por acaso não foram aqui lembrados, também agradeço.

Por fim, a companhia dos onipresentes, onipotentes e intergalácticos “mans” Alexandre Mendes, André Garotti e especialmente, Karoline dos Anjos, fez desta jornada uma aventura mais do que prazerosa, pela qual valeu a pena lutar!