



# Universidade de Brasília

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Tese de Doutorado

**Desenvolvimento de um Sistema de Genética  
Reversa para *Tomato spotted wilt virus* e Descoberta  
de Formas Diméricas do S RNA em tospovírus**

Aluno - André Gustavo Machado Bertran

Orientador – Renato de Oliveira Resende

Co-orientador (Brasil) – Tatsuya Nagata

Co-orientador sanduíche (Itália) – Massimo Turina

## Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>iii</b>
<b>1. Resumo .....</b>	<b>I</b>
<b>2. Abstract .....</b>	<b>III</b>
<b>3. Revisão do Estado da Arte .....</b>	<b>1</b>
<b>4. Justificativa .....</b>	<b>31</b>
<b>5. Objetivos Gerais .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Capítulo 1: Host-specific accumulation and temperature effects on the generation of dimeric viral RNA species derived from the S RNA of members of the <i>Tospovirus</i> genus .....</b>	<b>33</b>
<b>7. Capítulo 2: Comparação entre dois diferentes isolados de TSWV para geração de RNAs defectivos interferentes (DI-RNAs) e RNAs imperfeitos Diméricos (ID-RNAs) e estudo do efeito dos ID-RNAs sobre a expressão de proteínas virais .....</b>	<b>72</b>
<b>8. Capítulo 3: Estratégias para o desenvolvimento de um sistema de genética reversa para o gênero <i>Tospovirus</i>.....</b>	<b>92</b>
<b>9. Bibliografia .....</b>	<b>166</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de uma partícula viral típica da família *Bunyaviridae*. As partículas virais possuem entre 80-120nm de diâmetro. As glicoproteínas virais (Gn e Gc) estão incorporadas na matriz lipídica do envelope, roubado da célula hospedeira. Os três segmentos virais (RNA) são completamente envoltos pela proteína do capsídeo (N) e por poucas unidades da polimerase viral (L). Fonte: Viralzone..... 1
- Figura 2. Filogenia da família *Bunyaviridae* pela análise da proteína L (polimerase viral) incluindo os novos gêneros-tentativa. Utilizou-se o algoritmo de Maximum Likelihood com bootstraps. Os números sobre os ramos indicam a probabilidade da separação entre os ramos. As folhas dos ramos representam as espécies utilizadas para as análises, apresentadas na forma de acrônimos. Como grupo externo utilizou-se a sequência de membros da Família *Orthomyxoviridae*. O gênero *Tenuivirus* não pertence oficialmente a família *Bunyaviridae*. Sua organização genômica é tetra-segmentada e morfológicamente os tenuivírus não são envelopados. Os membros da família *Arenaviridae* possuem genomas bi-segmentados e partículas virais envelopadas. Adaptado de Marklewitz et al. 2015..... 3
- Figura 3. Ciclo de vida dos tripes. O desenho esquemático demonstra o tempo de duração do ciclo de desenvolvimento de tripes do ovo ao adulto correspondente a 7 a 15 dias. Fonte: IPM Labs ..... 8
- Figura 4. Fases de desenvolvimento do tripes *Frankliniella occidentalis* e suas relações com a aquisição e transmissão de tospovírus. Na parte superior da figura, as pontas de setas voltadas para cima representam períodos de atividade alimentar do inseto. Na parte mais basal da figura, demonstra-se que a deposição dos ovos dessa espécie de tripes é feita no interior da folha parasitada. O período de aquisição viral pelo inseto é representado pela barra branca grossa e corresponde a 2 a 4 dias pós eclosão da larva. Fonte Moritz et al. 2004..... 9
- Figura 5. Representação esquemática da passagem de partículas de tospovírus pelos diferentes órgãos e tecidos do corpo do tripes vetor em diferentes fases de desenvolvimento do inseto. Os elementos circulares apresentados representam as partículas virais. As diferentes faixas verticais representam os tecidos/órgãos por onde passam as partículas virais. Os diferentes estádios de desenvolvimento formam faixas horizontais. Fonte: Moritz et al. 2004. ....10
- Figura 6. Organização genômica dos diferentes membros da família *Bunyaviridae*. Em especial, é destacada no retângulo vermelho a organização genômica do gênero *Tospovirus*, distinta daquela dos outros bunyavírus. N - proteína do capsídeo; NSs – proteína não estrutural do segmento S; Gn e Gc – glicoproteínas

viraís; NSm – proteína não estrutural do segmento M; L – polimerase viral.  
Fonte: Plyusnin et al. (2011).....14

Figure 7. Schematic representation of the viral RNA species of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV). Primers and the regions used for RNA probe design are marked by dashed lines. Scheme is illustrative of feature positions, but not represented to scale. Text written upside-down represents viral open reading frames codified by the complementary strand to the viral strand presented in the scheme. UTR – Untranslatable region; IGR M– Intergenic region of the M RNA; IGR S – Intergenic region of the S RNA; ID-RNA – Imperfect Dimer S RNA molecules. The rectangles labelled A, B and C represent the deletions found in Plg13/2 and Plg6 across the junction dimer region.....45

Figure 8. Detection of a novel S RNA-associated viral RNA species for isolates Plg6 and Plg13/2 of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) in *Nicotiana benthamiana*. Northern blots were performed with total RNA from systemically infected *N. benthamiana* and tomato leaves (10dpi) using radioactive riboprobes for the NSs mRNA. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. ID – novel RNA species associated to the S RNA; g – genomic size S RNA species; sg – sub-genomic size NSs mRNAs. H – healthy *N. benthamiana*. Bottom panel, ribosomal RNA loading visualized by Methylene Blue staining..46

Figure 9. Size estimates of the novel S RNA-associated viral RNA species. Detection of a novel RNA species related to the S RNA of isolates Plg3 and Plg13/2 of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV). A) Size estimate by comparison to an RNA ladder. B) Size estimate by comparison to the M RNA genomic segment. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. M – RNA Ladder Marker; I – Systemically infected *Nicotiana benthamiana* leaves (8dpi); H – healthy young *N. benthamiana* leaves; g – genomic size RNA species; sg – sub-genomic size RNA species; ID – novel RNA species associated to the S RNA. Bottom panel, ribosomal RNA loading visualized by Methylene Blue staining..47

Figure 10. Imperfect Dimer RNA (ID-RNA) is present in purified nucleocapsids. *Nicotiana benthamiana* leaves infected with isolate Plg13/2 of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) were harvested 2 weeks after mechanical inoculation. RNA was extracted from the original homogenate (pre-purification) or from purified nucleocapsids. Arrows point to the ID RNA, and to the subgenomic NSs mRNA. In this specific sample, gRNA was not detectable.....47

Figure 11. Northern blots for the S, M and L RNAs of three biological replicates of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolates Plg6/1 and Plg13/2 systemically infecting *Nicotiana benthamiana*. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. In the hybridization profiles of Plg6 and Plg13/2 for the M RNA (Probe Gn/Gc) instead of three biological replicates for isolate Plg6 only two are presented due to insufficient amount of total RNA left for the third replicate. g – genomic size RNA species; sg – sub-genomic size RNA species; ID –

novel RNA species associated to the S RNA. Bottom panels, ribosomal RNA loading visualized by Methylene Blue staining.....48

Figure 12. Host specificity for novel S-derived RNA species accumulation. The probe used for each blot is specified at the bottom of the blot. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. An asterisk defines a cross reactivity with a ribosomal RNA band in panel C. In panel A field samples from *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) infected *Polygonum dumetorum* compared to infected *Nicotiana benthamiana*. In panel B and C PolRSV was mechanically inoculated from infected *N. benthamiana* to *Solanum lycopersicum*, *N. rustica*, *N. tabacum*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *Datura stramonium* and *Gomphrena globosa*. ID – novel S RNA-associated viral RNA species; g – genomic size S RNA molecules; sg – sub-genomic size NSs mRNA molecules. Bottom panels display ribosomal RNA loading visualized by Methylene Blue staining.....49

Figure 13. Imperfect Dimer (ID) RNA biogenesis and dynamics are influenced by temperature. A) *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolate Plg3 was passaged from its original host to *Nicotiana benthamiana* plants kept at either 18°C or 30°C and systemically infected leaves were assayed for northern blot at 8dpi. B) PolRSV isolates Plg6 and Plg13/2 were serially passaged in *N. benthamiana* at 25°C and 18°C in parallel. Systemically infected leaves of passages were assayed using riboprobes for the NSs mRNA. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. Sample labels in the figure show temperature in which plants were kept and replicates of each treatment (when applicable) as low case letters or roman numerals (e.g. a, b, V). ID – Imperfect Dimer S RNA-associated viral RNA species; g – genomic size S RNA molecules; sg – sub-genomic size NSs mRNA molecules. Bottom panels display ribosomal RNA loading visualized by Methylene Blue staining.....51

Figure 14. Imperfect Dimer (ID) formation is host-specific even at higher temperatures. Plants of tomato (Tom) and *Nicotiana benthamiana* (benth) were mechanically inoculated with *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolate Plg3 and kept for three successive passages at 30°C. Systemically infected leaves were assayed at 8dpi and probed with riboprobes derived from a fragment of the NSs mRNA. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. Sample labels in the figure show the host plant in which the virus was passaged (tom and benth), the temperature as numerals, and the replicates of each treatment (when applicable) as low case letters (e.g. a, b). ID – novel S RNA-associated viral RNA species; g – genomic size S RNA molecules; sg – sub-genomic size NSs mRNA molecules. Bottom panel is a Methylene blue stain of the membrane, representing ribosomal RNA loadings.....52

Figure 15. Imperfect Dimer (ID) RNAs are generated by an Italian isolate (p105) of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) after serial passage but not by other two TSWV isolates (803 and p105RBMar) (A) and neither by *Iris yellow spot virus* (IYSV) kept at 30°C (B). Systemically infected leaves were assayed with

riboprobes as specified beside the blots. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. Sample labels in the figure show the temperature as numerals and the number of serial passages as Roman numbers. ID – novel S RNA-associated viral RNA species; g – genomic size S RNA molecules; sg – sub-genomic size NSs and N mRNA molecules. ....53

Figure 16. Imperfect dimer (ID) RNAs are generated at the late stages of systemic infection during the first passage of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolate Plg6 from tomato to *Nicotiana benthamiana*. Samples were taken at two time points after infection for the northern blot: at the beginning of systemic infection (Early – 5dpi) and at a late phase of systemic infection (Late – 12dpi). Plg13/2 was used as positive control for ID-RNAs. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. Sample labels in the figure indicate the host plant (tom – tomato, benth – *N. benthamiana*), temperature as numerals and the number of serial passages as Roman numbers. ID – novel S RNA-associated viral RNA species; g – genomic size S RNA molecules; sg – sub-genomic size NSs mRNA molecules. ....54

Figure 17. Imperfect dimer (ID) RNAs are not circular RNA species. RNase R assays were performed for isolates Plg13/2 (in *Nicotiana benthamiana*) and Plg6/1 (in tomato) of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) for one hour. As a control, total RNAs from systemically infected leaves were incubated only with the reaction buffer. Digested total RNA samples were collected at 10 and 60 minutes from the beginning of the enzymatic reactions. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. Sample labels in the figure indicate the host plant (tom – tomato, benth – *N. benthamiana*, and the number of serial passages as Roman numbers. ID – novel S RNA-associated viral RNA species; g – genomic size S RNA molecules; sg – sub-genomic size NSs mRNA molecules.....55

Figure 18. Allocation of reads obtained by RNAseq analysis of ribosomal RNA-depleted total RNA from *Nicotiana benthamiana* leaves infected with *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolates Plg13/2 and Plg6. A) Percentage of total reads mapping to the host genome/transcriptome and to the viral reference genomes for sample Plg13/2 and Plg6. B) Percentage of the total reads mapping to the genomic segments of PolRSV isolates Plg13/2 and Plg6. C) Percentage of recombinant reads for each viral genomic segment.....58

Figure 19. Alignment of recombinant reads against the *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) genomic segments. A) Plg13/2-infected *Nicotiana benthamiana*. B) Plg6-infected *N. benthamiana*. ....59

Figure 20. Prediction of the junction site of highly abundant recombinant reads from the S segment of isolates Plg13/2 and Plg6 of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV). A) Mapping of a subset of predicted recombinant reads from position 1-150 (red color) and 355-500 (blue color) in sample Plg13/2 restores peaks in position 1850-1911 and 2300-2476, respectively, showing that peaks are

originated from recombinant reads with a 1911-1 and a 2476-355 junction, respectively. B) Mapping of a subset of reads from position 1-150 in sample Plg6 restores peak 2300-2475, showing that peaks are originated from recombinant reads with head to tail S segment junction.....60

Figure 21. Alignment against simulated recombinant sequences of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolate Plg13/2. A) Alignment of Plg13/2 S segment recombinant reads from position 1-150 against a simulated reference sequence at junction 1911-1 of a putative head to tail dimer segment. B) Alignment of Plg13/2 S segment recombinant reads from position 355-500 against a simulated reference sequence at junction 2476-355 of a putative head to tail dimer. C) Alignment of 26700 recombinant S segment reads from position 1-150 against a simulated reference sequence at junction 2475-1 of a putative head to tail dimer.....61

Figure 22. Alignment of cDNA clones obtained from RT-PCR amplifying fragments across the putative (and predicted) dimer junction. A putative full-length dimer junction is represented in each alignment. The width of the gaps of each clone compared to an *in silico* perfect head to tail dimer, are reported. Arrows point to the dimer junction (sequence tct-aca). A) Alignments of cDNA clones from *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolates Plg13/2, Plg6 and Plg3. B) Alignments of cDNA clones from *Tomato spotted wilt virus isolate* (TSWV) p105. ....62

Figura 24. Perfil de bandeamento de RNAs virais marcados com sonda para o L RNA de dois isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantidos em *Nicotiana benthamiana*. Os isolados BR-20 (A) e p105 (B) foram mantidos por inoculação mecânica em plantas de *N. benthamiana*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P – número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G – RNA viral de tamanho genômico. DI – RNAs defectivos-interferentes. rRNA – controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno. ....80

Figura 25. Perfil de bandeamento de RNAs virais marcados com sonda para o L RNA de dois isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantidos em *Nicotiana rustica*. Os isolados BR-20 (A) e p105 (B) foram mantidos por inoculação mecânica em plantas de *N. rustica*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P – número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G – RNA viral de tamanho genômico. DI – RNAs defectivos-interferentes. rRNA – controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno. ....81

Figura 26. Perfil de bandeamento de RNAs virais marcados com sonda para o gene N do S RNA de dois isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantidos em

*Nicotiana benthamiana*. Os isolados BR-20 (A) e p105 (B) foram mantidos por inoculação mecânica em plantas de *N. benthamiana*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P – número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G – RNA viral de tamanho genômico. Dimer? – nova espécie de RNA viral associada ao S RNA com tamanho compatível com o de um dímero. rRNA – controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno. ....82

Figura 27. Perfil de bandeamento de RNAs virais marcados com sonda para o gene N do S RNA de dois isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantidos em *Nicotiana rustica*. Os isolados BR-20 (A) e p105 (B e C) foram mantidos por inoculação mecânica em plantas de *N. rustica*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P – número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G – RNA viral de tamanho genômico. Dimer? – nova espécie de RNA viral associada ao S RNA com tamanho compatível com o de um dímero. rRNA – controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno. ....82

Figura 28. Perfil de bandeamento de RNAs virais marcados com sonda para o gene NSs do S RNA do isolado p105 de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantido em *Nicotiana benthamiana*. O isolado p105 foi mantido por inoculação mecânica em plantas de *N. benthamiana*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P – número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G – RNA viral de tamanho genômico. Dimer? – nova espécie de RNA viral associada ao S RNA com tamanho compatível com o de um dímero. rRNA – controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno. ....83

Figura 29. Perfil de bandeamento de RNAs virais marcados com sonda para o gene NSs do S RNA dos isolados BR-20 (A) e p105 (B) de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantido em *Nicotiana rustica*. Os isolados BR-20 e p105 foram mantidos por inoculação mecânica em plantas de *N. benthamiana* e passados para *N. rustica*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P – número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G – RNA viral de tamanho genômico. Dimer? – nova espécie de RNA viral associada ao S RNA com tamanho compatível com o de um dímero. rRNA – controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno. ....84

Figura 30. Estimativa do tamanho do novo RNA viral associado ao S RNA do isolado p105 de *Tomato spotted wilt virus*. Amostras de RNA total de plantas da 3ª e 17ª passagens (A) e 2ª e 16ª passagens (B) seriadas do isolado p105 de TSWV foram hibridizadas com duas sondas diferentes em cada experimento. Em A), a



dupla marcação foi feita com sondas para o gene N e o gene NSm e em B) com sondas para o gene N e para o gene L. L – RNA genômico L. M – RNA genômico M. S – RNA genômico S. sg – RNA subgenômico do gene N (segmento S). Dimer? – nova espécie de RNA viral associada ao segmento S. rRNA – banda de RNA ribossomal utilizada como controle de carregamento das amostras de RNA total (membrana corada com azul de metileno).....85

Figura 31. Comparação do padrão de expressão gênica das proteínas NSm, NSs e N entre a 3ª e a 17ª passagens do isolado p105 de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em *Nicotiana benthamiana*. A) Detecção da proteína NSm. B) Detecção da proteína NSs. C) Detecção da proteína N. Anticorpos contra as proteínas NSs e NSm são cortesia do Dr. Richard Kormelink (WUR, Holanda). As setas na lateral direita das imagens indicam cada banda específica detectada e seu peso molecular estimado. Números 3 e 17 indicam o número seriado da passagem coletada. I, II e III são réplicas biológicas experimentais (i.e., diferentes plantas inoculadas com uma mistura de material infectado proveniente da 2ª e 16ª passagens, respectivamente). Os valores numéricos abaixo de cada *blot* indicam a intensidade de pixels de cada banda comparada a banda de maior intensidade em cada *blot*. .....86

Figura 32. Esquema dos diversos cassetes de transcrição de DI-RNAs e moléculas tipo-DI. Os componentes funcionais de cada item são apresentados na forma de caixas e o nome dos plasmídeos é apresentado no lado direito. As chaves agrupam construções clonadas no mesmo tipo de vetor. O símbolo do relâmpago indica sequências de DNA de sítios de restrição. T7 – sequência de DNA promotor do bacteriófago T7; Sp6 - Sequência de DNA promotor do bacteriófago Sp6; UTR – região não traduzível; HHRZ – sequência complementar ao RNA da ribozima modificada de *Avocado sunblotch viroid*; HDVRZ – sequência complementar ao RNA da ribozima do *Hepatitis delta virus*; 35S e 35S-P – sequência de DNA promotor de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); 35S-T – sequência de DNA do terminador de CaMV; NOS – sequência de DNA do terminador do gene nopalina sintase; ORF – fase de leitura aberta de um gene; DI – RNA defectivo interferente; TSWV – *Tomato spotted wilt virus*; GRSV – *Groundnut ringspot virus*; mGFP4 – proteína verde fluorescente otimizada para expressão em plantas; + e – indicam se o RNA transcrito a partir do cassete é imediatamente traduzível (+) ou deve ser replicado (-); ∅ – cassetes sem vetor; transcritos produzidos a partir de produtos de PCR purificados..... 106

Figura 33. Esquema das construções utilizadas para transcrição citosólica dos RNAs genômicos virais e construções de mini-genomas contendo genes-repórter no vetor pTVT7'R. Os esquemas apresentam representações lineares de moléculas circulares (i.e., plasmídeos), portanto, dependendo de como foi montada a molécula no programa de banco de dados, elementos dos plasmídeos (e.g. T7 Promoter no GGG) podem ser vistos em posições distintas. Os transcritos gerados por esses plasmídeos começam sempre no promotor T7 (T7 Promoter

no GGG) e terminam em dois elementos: HDV-RZ (ribozima do *Hepatitis delta virus*) e um terminador transcricional do fago T7 (T7 Terminator). As cinco primeiras construções de cima para abaixo apresentam os segmentos genômicos completos do isolado BR-20 de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV BR-20) clonados no vetor pTVT7'R. As últimas três construções apresentam mini-genomas, i.e., genes-repórter flanqueados por extremidades não traduzíveis (UTR, na sigla em inglês) regulatórias do segmento L de TSWV BR-20. Para as construções de mini-genoma as regiões UTR são representadas tais quais as do segmento L-VC. V - orientação genômica viral encontrada predominantemente nas partículas virais maduras; é negativa para a produção das proteínas virais estruturais (N, Gn/Gc e L). VC - orientação genômica viral complementar; é positiva para a produção das proteínas virais estruturais. IGR - região intergênica, presente nos segmentos S e M. RLuc - enzima catalizadora de luminescência do organismo *Renilla reniformis*. hRLuc - versão modificada do gene RLuc para qual foi realizada otimização de códons para o padrão de *codon usage* humano e mudança de um aminoácido. mGFP-4 - gene-repórter codificante para a proteína verde fluorescente em versão otimizada para expressão em células vegetais. NSm e NSs - proteínas não-estruturais (i.e., não encontradas no vírion maduro) codificadas nos segmentos M e S, respectivamente, dos tospovírus. Amp (R) - gene de resistência ao antibiótico Ampicilina; marca seletiva para clonagem molecular..... 107

Figura 34. Esquema das construções utilizadas para dirigir expressão heteróloga das proteínas N e L (RdRp) de *Tomato spotted wilt virus* em células de mamífero (pTM1) e inseto (pSTI). Os esquemas apresentam representações lineares de moléculas circulares (i.e., plasmídeos). A expressão de proteínas no vetor pTM1 é dirigida pela indução do acoplamento da subunidade ribossomal menor das células hospedeiras diretamente ao mRNA, que por ser transcrito por um promotor T7 e terminado por um promotor T7, não possui CAP 5' nem cauda de poli-A. Esta indução à montagem ribossomal é dirigida por uma sequência IRES (*internal ribosome entry site*, da sigla em inglês) de *Encephalomyocarditis virus* (EMCV IRES). A expressão das proteínas virais é dirigida em células de mosquito por um promotor do gene Poli-ubiquitina 5 de *Drosophila melanogaster* (polyUb). Os mRNAs virais produzidos nessas células possuem CAP 5', dirigida pelo promotor eucariótico e cauda poli-A, dirigida pelo elemento SV40 poly-A. Amp(R) e Bla(R) - gene de resistência ao antibiótico ampicilina; marca de seleção para clonagem molecular em bactérias. Hyg-eGFP - gene de resistência a higromicina (Hyg) fusionado ao gene da proteína verde fluorescente em versão otimizada para expressão em células de mamífero (eGFP); marca de seleção para transdução e expressão constitutiva em cultura de células animais. IRES - sequência de internal ribosome entry site obtida do genoma do pulgão *Rhopalosiphum padi*..... 108

Figura 35. Estratégia de genética reversa baseada em replicação de DI-RNAs por vírus *helper* através da geração de transcritos de DI-RNA gerados por promotor

35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) via expressão transiente mediada por agrobactéria. Foram utilizados nessa estratégia diferentes vetores binários (i.e., plasmídeos para expressão transiente via agrobactéria) que são apresentados no texto da figura. Os diferentes vetores binários e suas características estão explicitados na figura 32. Foram testadas moléculas de DI-RNAs que possuem ou não possuem sequências de ribozimas flanqueando as duas extremidades da molécula. Foram testadas moléculas de DI-RNAs clonadas em duas orientações distintas em relação ao promotor 35S de CaMV, denominadas vg e vc (fig. 32). Como explicitado no texto da figura, foram utilizadas em esquema de co-infiltração agrobactérias transformadas com plasmídeos expressando as proteínas supressoras de silenciamento gênico (SSG e Sup. Sil. Gen) p19 de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) e NSs de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) expressados pelo vetor pBin61. Os dois desenhos experimentais traçados para a estratégia de expressão de DI-RNAs via agrobactéria estão representados, da esquerda para a direita, nos itens A) e B). Em A) primeiro infectava-se a planta com o vírus *helper* (TSWV ou *Groundnut ringspot virus* – GRSV) e nas mesmas folhas inoculadas com vírus fazia-se o tratamento de co-infiltração das agrobactérias para transcrição de DI-RNAs com 1, 2 e 4 dias de defasagem entre tratamentos. Em B), primeiro infiltrava-se folhas jovens das plântulas de *Nicotiana benthamiana* com as agrobactérias transcrevendo DI-RNAs e expressando SSG e depois promovia-se a infecção das mesmas folhas com o vírus *helper*. Os experimentos foram realizados em combinações de DI-RNA e vírus *helper* intra- e inter-específicas, i.e., DI-RNA TSWV + *helper* TSWV, DI-RNA GRSV + *helper* TSWV e assim sucessivamente. GFP – proteína verde fluorescente usado como controle positivo de agroinfiltração (expresso em vetor pBin61). ..... 117

Figura 36. Northern blot com ribossonda derivada de um fragmento do L RNA demonstrando expressão de DI-RNAs por agrobactéria. Amostras de RNA total foram extraídas de plantas infiltradas com pJL89 contendo a sequência do DI mais estável de *Tomato spotted wilt virus* BR-01 em orientação viral genômica (vgRNA) ou viral complementar (vcRNA). As amostras 1 e 2 (A e B) depois de agroinfiltradas com pJL89 foram inoculadas mecanicamente com TSWV BR-20 com 72h de defasagem. As amostras 3A e 3B foram agroinfiltradas com proteína fluorescente verde (GFP) e posteriormente (72h depois) inoculadas com TSWV BR-20. Vir BR-20 – controle positivo de infecção viral, planta não tratada com agrobactéria; DI VC e DI VG – controles de expressão transiente dos DI-RNAs nas orientações vc e vgRNA, coletados a 72h pós infiltração; I – amostras de folhas infiltradas com agrobactéria, inoculadas mecanicamente com vírus um dia após a agroinfiltração e coletadas a 5 dpi da inoculação do vírus; S – amostras de folhas sistemicamente infectadas coletadas a 10 dias após inoculação do vírus. .... 119

Figura 37. Esquema de genética reversa baseada em entrega de DI-RNAs via inoculação mecânica em plantas infectadas com vírus *helper*. ..... 120

Figura 38. Estratégias de genética reversa baseada em replicação de DI-RNAs e RNAs tipo-DI (mini-genoma contendo mGFP4) via co-transfecção de protoplastos de *N. benthamiana* com partículas virais completas envelopadas e RNA alvo. Em A) os protoplastos transfetados foram produzidos à partir de folhas removidas de plântulas de *N. benthamiana* cultivadas de modo asséptico em Magenta Box. Em B) plantas crescidas em casa de vegetação eram inoculadas com TSWV e folhas sistemicamente infectadas eram coletadas para produção de protoplastos e posterior transfecção com as moléculas-alvo. .... 122

Figura 39. Western blot para a proteína N de protoplastos transfetados com partículas virais completas de *Tomato spotted wilt virus*. Amostras de protoplastos foram coletadas a 0, 24 e 48h após transfecção com o vírus purificado. As amostras foram transfetadas com 10µl do purificado viral (1, 2 e 3) ou com 1µl do purificado viral (4, 5 e 6). S – protoplastos sadios não transfetados; V – amostra da purificação viral diluída 1:2; P – protoplastos produzidos a partir de material foliar sistemicamente infectado; M – marcador. .... 123

Figura 40. Microscopia confocal para estratégia de genética reversa em protoplastos com moléculas “tipo-DI” detalhada na figura 38. Nas composições a esquerda (A, B, C e D), exemplo de resultado para transfecção de RNA de um controle TBSV-GFP. Nas composições a direita (E, F, G, H), resultados obtidos para co-transfecção de partículas virais e moléculas tipo-DI carregando cópia do gene mGFP. As barras representam unidades de distância medidas em µm. .... 124

Figura 41. Primeiro ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 33°C, baseado em expressão do gene reporter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC). Os diferentes tratamentos (A-F) foram realizados em placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 33°C em estufa de cultivo celular com pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 48h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP – eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP – construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7’R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV; BUNV N e BUNV L - proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de *Bunyamwera virus* (BUNV). O mini-genoma de BUNV (BUNV-MG-NSs-GFP) é detalhado no trabalho de van Knippenberg *et al.* 2013. .... 128

Figura 42. Primeiro ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 28°C, baseado em expressão do gene reporter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC). Os diferentes tratamentos (A-F) foram realizados em

placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 28°C em estufa de cultivo celular com pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 48h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP – eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP – construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7'R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV; BUNV N e BUNV L - proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de *Bunyamwera virus* (BUNV). O mini-genoma de BUNV (BUNV-MG-NSs-GFP) é detalhado no trabalho de van Knippenberg *et al.* 2013..... 129

Figura 43. Primeiro ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 24°C, baseado em expressão do gene reporter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC). Os diferentes tratamentos (A-F) foram realizados em placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 28°C em estufa de cultivo celular sem pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 48h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP – eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP – construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7'R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV; BUNV N e BUNV L - proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de *Bunyamwera virus* (BUNV). O mini-genoma de BUNV (BUNV-MG-NSs-GFP) é detalhado no trabalho de van Knippenberg *et al.* 2013..... 130

Figura 44. Representações dos esquemas de misturas de DNA realizados por tratamento e da distribuição dos tratamentos em placas de 24 poços para os ensaios das figuras 41-43..... 132

Figura 45. Ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) com melhor eficiência de transfecção em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 33°C, baseado em expressão do gene reporter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC). Os diferentes tratamentos (A-F) foram realizados em placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 33°C em estufa de cultivo celular com pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 48h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP – eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP – construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em

orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7'R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV expressas por vetor pTM1; BUNV N e BUNV L - proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de *Bunyamwera virus* (BUNV) expressas por vetor pTM1. O mini-genoma de BUNV (BUNV-MG-NSs-GFP) é detalhado no trabalho de van Knippenberg *et al.* 2013..... 133

Figura 46. Ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) com melhor eficiência de transfecção em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 33°C, baseado em expressão do gene reporter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC). Os diferentes tratamentos (A-E) foram realizados em placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 33°C em estufa de cultivo celular com pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 72h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP – eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP – construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7'R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV expressas por vetor pTM1. .... 134

Figura 47. Ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) com melhor eficiência de transfecção em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 33°C, baseado em expressão do gene reporter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC). Os diferentes tratamentos (A-E) foram realizados em placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 33°C em estufa de cultivo celular com pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 96h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP – eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP – construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7'R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV expressas por vetor pTM1. .... 135

Figura 48. Efeito da adição do segmento S RNA do isolado BR-20 de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em orientação viral genômica (vg) sobre a atividade do gene-repórter mGFP4 do mini-replicon de TSWV. O segmento S RNA em orientação vg pode servir diretamente como mRNA codificante para a proteína NSs. Nesta figura não mostro os controles de transfecção expressando eGFP pelo vetor pTM1 pois são os mesmos das figuras 45 a 47. Foi observado um efeito de retardo da atividade do mini-replicon de TSWV, possivelmente associado ao controle da expressão gênica, ou a competição entre o mini-genoma de TSWV e

o segmento S RNA, provocado pela adição do segmento S RNA vg. Assim como para TS-MG-GFP, 10ng/poço da construção do segmento S RNA foram utilizados neste experimento (ver Fig. 44). TS-MG-GFP – mini-genoma de TSWV (*DI-like*, ver texto do Material e Métodos do capítulo 3) carregando o gene mGFP4 em orientação invertida em relação ao promotor T7 do vetor pTVT7'R; N e L – proteínas estruturais de TSWV: capsídeo e polimerase, respectivamente, expressos a partir do vetor pTM1; S-VG – segmento S RNA do isolado BR-20 de TSWV transcrito a partir do vetor pTVT7'R..... 136

Figura 49. Ensaio de atividade de mini-replicon de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) baseado em emissão de luminescência (RLuc) em células BSR-T7. Após a transfecção, as células foram mantidas por 16h a 33°C e por 32h a 28°C com 5% de pressão positiva de CO<sub>2</sub>. Os resultados apresentados para cada tratamento nos dois gráficos são valores de média +/- desvio padrão de triplicatas biológicas. Estes valores não possuem uma unidade e são considerados valores brutos de luminescência. O gráfico superior apresenta os dados em escala numérica proporcional ao maior valor obtido para RLuc. O gráfico de baixo é idêntico ao de cima, mas apresenta os dados em escala cortada a fim de melhor representar as nuances de valores entre os resultados dos diferentes tratamentos. pTM1-GFP – tratamento negativo para atividade de luminescência pois o vetor transfectado não contém RLuc. TS MR RLUC – mini-genoma de TSWV contendo o gene-repórter RLuc em orientação invertida. BUN MR - mini-genoma de *Bunyamwera virus* (BUNV) contendo o gene-repórter hRLuc em orientação invertida. N e L – proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase de TSWV e *Bunyamwera virus* (BUNV) expressas pelo vetor pTM1 (neste experimento as proteínas estruturais virais de TSWV foram usadas apenas em combinação com mini-genoma de TSWV, assim como para BUNV). Favor desconsiderar o ultimo tratamento da esquerda para a direita. .... 137

Figura 50. Valores do controle *firefly* luciferase (FLuc) para o ensaio de atividade de mini-replicon de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) baseado em emissão de luminescência pelo gene-repórter RLuc em células BSR-T7 apresentado na Fig. 49. Após a transfecção, as células foram mantidas por 16h a 33°C e por 32h a 28°C com 5% de pressão positiva de CO<sub>2</sub>. Os resultados apresentados no gráficos são valores de média +/- desvio padrão de triplicatas biológicas realizadas para cada tratamento. Estes valores não possuem uma unidade e são considerados valores brutos de luminescência. O gráfico superior apresenta os dados em escala numérica proporcional ao maior valor obtido para RLuc. O gráfico de baixo é idêntico ao de cima, mas apresenta os dados em escala cortada a fim de melhor representar as nuances de valores entre os resultados dos diferentes tratamentos. pTM1-GFP – tratamento negativo para atividade de luminescência pois o vetor transfectado não contém RLuc. TS MR RLUC – mini-genoma de TSWV contendo o gene-repórter RLuc em orientação invertida. BUN MR - mini-genoma de *Bunyamwera virus* (BUNV) contendo o gene-repórter hRLuc em orientação invertida. N e L – proteínas virais estruturais: capsídeo e

polimerase de TSWV e *Bunyamwera virus* (BUNV) expressas pelo vetor pTM1 (neste experimento as proteínas estruturais virais de TSWV foram usadas apenas em combinação com mini-genoma de TSWV, assim como para BUNV). Favor desconsiderar o ultimo tratamento da esquerda para a direita. .... 138

Figura 52. Desenho experimental do ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células BSR-T7 e resumo dos ensaios *a posteriori*. Na parte superior da figura estão representados os diferentes tratamentos realizados no ensaio de resgate de infecção de TSWV evidenciando a quantidade de replicas para cada tratamento (coluna da esquerda). São mostrados também quais elementos compõem cada tratamento e as principais características dos plasmídeos utilizados (coluna da direita). Na parte de baixo da figura, estão apresentados os principais pontos dos três tipos de ensaios realizados com as amostras biológicas coletadas dos resgates de infecção. .... 142

Figura 53. Comparação da atividade de fluorescência entre os tratamentos posCGFP-pTM1 e VLP (A) e análise de efeito citopático (CPE, na sigla em inglês) para os tratamentos (B) do ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) feito em células BSR-T7. A descrição dos diferentes tratamentos e de como foram feitas as transfeções, coletas e análises estão no texto do capítulo 3 e na Fig. 52 ..... 144

Figura 54. Efeito da co-transfecção de construções de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) [pTM1-N-TSWV, pTM1-L-TSWV, pTVT7'R-S-V-TSWV e pTVT7'R-M-VC-TSWV] sobre a atividade do mini-replicon de *Bunyamwera virus* (BUNV) em ensaios de luminescência (gene repórter hRLuc) em células BSR-T7. O vetor pTM1 foi utilizado para expressar as proteínas estruturais N e L de TSWV e BUNV e o vetor pTVT7'R foi utilizado para transcrição citosólica dos segmentos genômicos virais S RNA em orientação vg (ver texto) e o segmento M RNA em orientação vc. A co-transfecção do segmento M-VC aumentou aproximadamente 4 vezes o valor de expressão do controle *firefly* luciferase (FLuc) e 3 vezes o valor de expressão do gene-repórter hRLuc do mini-genoma de BUNV. A medição da atividade de luciferase foi feita a aprox. 42h p.t. A co-transfecção do vetor pTM1-L-TSWV interferiu negativamente na atividade de mini-replicon de BUNV. Na parte direita da figura são apresentadas as características deste ensaio. Diferentemente do padrão seguido para todos os ensaios de atividade realizados, nesse as células foram incubadas após a transfecção a 37°C ao invés de 33°C..... 145

Figura 55. Detecção por western blotting da proteína N de TSWV utilizando anticorpo policlonal contra a proteína N purificada de plantas infectadas por TSWV-p105 em amostras de sobrenadante e lisados celulares do ensaio de resgate de infecção de TSWV em células BSR-T7 coletadas a 6d.p.t. A) Amostras de sobrenadante do ensaio, das quais 5plm e minusL são positivas para a expressão da proteína N. B) Amostras de sobrenadante do ensaio, das quais 5plm e minus L são positivas para a expressão da proteína N. Os tratamento



3plm, 5plm e minusL são explicados em detalhe na figura 52. Healthy – amostras de proteína total de folha de *N. benthamiana* não infectada. Infec-Plant – amostra de proteína total de folha de *N. benthamiana* sistemicamente infectada por TSWV p105. A seta a direita indica a posição nas membranas e a massa molecular da proteína N de TSWV. .... 147

Figura 56. Detecção por western blotting da proteína NSs de TSWV em amostras de lisados celulares do ensaio de resgate de infecção de TSWV em células BSR-T7 coletadas a 6d.p.t. Os tratamentos 3plm, 5plm e minusL são explicados em detalhe na figura 52. Healthy – amostras de proteína total de folha de *N. benthamiana* não infectada. Infec-Plant – amostra de proteína total de folha de *N. benthamiana* sistemicamente infectada por TSWV p105. A seta a direita indica a posição nas membranas e a massa molecular da proteína NSs de TSWV. .... 147

Figura 57. Ensaio de expressão de luminescência (RLuc) por atividade de mini-replicon de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7. Após a transfecção as células foram mantidas a 33°C por 72h até coleta e mensuração da luminescência. O controle positivo BUNVMR + N + L foi o único a apresentar atividade entre todos os tratamentos. Neste ensaio foi realizada uma titulação do plasmídeo pSTI expressando a proteína L. Foram usados 100, 10, 1 e 0,1 ng/μl do vetor pSTI-L-TSWV nas misturas de DNA. pSTI-GFP – controle negativo do ensaio. TSWVWTRLUOnly – tratamento apenas com o mini-genoma de TSWV carregando o gene RLuc em orientação invertida. N e L são proteínas estruturais (capsídeo e polimerase viral, respectivamente) de TSWV e *Bunyamwera virus* (BUNV)..... 148

Figura 58. Ensaio de expressão de luminescência (hRLuc) por atividade de mini-replicon de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7. Após a transfecção as células foram mantidas a 33°C por 72h até coleta e mensuração da luminescência. O controle positivo BUNVMR + N + L foi o único a apresentar atividade entre todos os tratamentos. Neste ensaio foi realizada uma titulação do plasmídeo pSTI expressando a proteína L. Foram usados 100, 10, 1 e 0,1 ng/μl do vetor pSTI-L-TSWV nas misturas de DNA. pSTI-GFP – controle negativo do ensaio. TSWVhRLUOnly – tratamento apenas com o mini-genoma de TSWV carregando o gene hRLuc em orientação invertida. N e L são proteínas estruturais (capsídeo e polimerase viral, respectivamente) de TSWV e *Bunyamwera virus* (BUNV). No gráfico de baixo os números 1 a 8 representam os tratamentos descritos no gráfico de cima, na mesma ordem. .... 150

Figura 59. Desenho experimental do ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7 e resumo dos ensaios *a posteriori*. Na parte superior da figura estão representados os diferentes tratamentos realizados no ensaio de resgate de infecção de TSWV evidenciando a quantidade de replicas para cada tratamento (coluna da esquerda). São mostrados também quais elementos compõem cada tratamento e as principais

características dos plasmídeos utilizados (coluna da direita). Na parte de baixo da figura, estão apresentados os principais pontos dos três tipos de ensaios realizados com as amostras biológicas coletadas dos resgates de infecção. .... 151

Figura 60. Análise de efeitos citopáticos (CPE na sigla em inglês) observados a 48h p.t. para o ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7. Os diferentes tratamentos são explicados em detalhe na figura 59. Para o tratamento posCGFP-pSTI apresento na foto superior a aparência do campo claro (luz transmitida) e na foto inferior a fluorescência emitida por eGFP (controle de transfeção). Para os tratamentos 3plm e 5plm apresento fotos de duas das quatro replicas experimentais realizadas. Nestas, é possível observar alteração da morfologia celular de C6/36-T7 apresentando sinais de sincício celular. .... 152

Figura 61. Análise de efeitos citopáticos (CPE na sigla em inglês) observados a 72h p.t. para o ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7. Os diferentes tratamentos são explicados em detalhe na figura 59. Para o tratamento posCGFP-pSTI apresento na foto superior a aparência do campo claro (luz transmitida) e na foto inferior a fluorescência emitida por eGFP (controle de transfeção). Para o tratamento 5plm apresento fotos de duas das quatro replicas experimentais realizadas. Para os tratamentos posCGFP-pSTI, 3plm e 5plm é possível observar alteração da morfologia celular de C6/36-T7 apresentando sinais de sincício celular..... 153

Figura 62. Análise de surgimento de efeitos citopáticos (CPE, na sigla em inglês) associados a coloração do meio de cultura para o tratamento 3plm (ver Fig. 59) em células C6/36-T7. Na figura, a coloração amarelada do meio (Yellow media) correlacionou-se à presença de sincícios celulares e uma coloração do meio arroxeadada (Purple media) correlacionou-se à ausência de CPE, seja a 48h p.t. que a 72h p.t..... 154

Figura 63. Análise de microscopia eletrônica por contrastação negativa de uma amostra de lisado celular do tratamento 5plm (ver figura 59) do ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7 a 3d.p.i. Nas duas figuras vê-se partículas agrupadas (painel superior) e partículas individuais, mas proximamente localizadas (painel inferior). Para os outros tratamentos do ensaio de resgate de infecção de TSWV (figura 59) não houve visualização de partículas virais, *virus-like* (VLP) ou ribonucleoproteínas (RNPs). A barra de medida é equivalente a 50nm. .... 155

## 1. Resumo

As espécies do gênero *Tospovirus* são importantes patógenos vegetais e fontes de prejuízo à produção agrícola mundial. Os tospovírus são membros da família *Bunyaviridae* de vírus de (-)ssRNA com genoma tri-segmentado denominado L, M e S RNAs. A relação entre o vetor e o vírus é do tipo circulativa-propagativa e sabe-se que a presença de RNAs Defectivos-Interferentes (DI-RNAs) pode interferir negativamente na habilidade de um isolado viral ser transmitido pelo inseto vetor. Nesta tese de doutorado, os capítulos 1 e 2 apresentam a descoberta, a caracterização molecular e estrutural, o estudo da dinâmica de acumulação e efeitos biológicos de um novo tipo de RNA defeutivo viral: RNAs Diméricos-Imperfeitos (ID-RNAs). OS ID-RNAs são moléculas de RNA viral resultantes de duplicações do segmento S RNA apresentando deleções, ou na região 3'UTR do primeiro monômero, ou na região 5'UTR do segundo monômero, mas nunca nas duas regiões UTR simultaneamente. Os ID-RNAs foram encontrados até o momento em *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) e TSWV infectando a planta modelo *Nicotiana benthamiana*. O acúmulo de ID-RNAs é modificado pela temperatura de incubação das plantas: a baixas temperaturas (18°C) há inibição, enquanto a altas temperaturas (30°C) há incremento. Interessantemente, os ID-RNAs caracterizados para o isolado p105 de TSWV parecem ter influenciado negativamente o acúmulo das proteínas virais NSm e N. O capítulo 3 apresenta o resultado de diversas estratégias para o desenvolvimento de um sistema de genética reversa para tospovírus em modelos vegetais *in vivo* e *in vitro* e modelos animais *in vitro* (células de hamster e mosquito). Dentre as abordagens testadas, a expressão heteróloga das proteínas N e L de TSWV em células de hamster foi capaz de reconhecer, replicar e transcrever em mRNA o gene-repórter mGFP4 presente em uma construção sintética de mini-genoma tipo-DI-RNA. Curiosamente, a transfecção do mini-genoma apenas na presença da expressão heteróloga da proteína L também levou a atividade do gene-repórter. Demonstrou-se ainda que a adição a esse sistema de um plasmídeo dirigindo a

transcrição do S RNA de TSWV foi capaz de retardar a expressão do gene-repórter. Adicionalmente, descobriu-se que a transfecção do segmento M de TSWV em orientação viral complementar foi capaz de aumentar a atividade detectada para o gene-repórter hRLuc em um sistema de genética reversa para *Bunyamwera virus*. Foram também realizados ensaios de resgate de infecção de TSWV em células de hamster e mosquito nos quais verificou-se a expressão da proteína NSs para um tratamento composto por um conjunto mínimo de plasmídeos dirigindo a transcrição dos três segmentos genômicos virais, sem a expressão heteróloga das proteínas N e L (hamster) e a ocorrência de efeitos citopáticos caracterizados por mudanças morfológicas e formação de sincícios celulares (mosquito). Os resultados qualitativos apresentados no capítulo 3 constituem a primeira demonstração científica em toda a literatura científica de um sistema de genética reversa funcional para TSWV baseado em atividade de mini-replicon.

Palavras-chave: *Polygonum ringspot virus*, RNAs defectivos, S RNA dimérico, genética reversa, mini-replicon, *Tomato spotted wilt virus*.

## 2. Abstract

The tospoviruses are important plant pathogens that cause considerable damage to many crops worldwide. The *Tospovirus* genus is part of the *Bunyaviridae* family of negative ssRNA viruses with tripartite genomes (L, M and S RNAs). Tospoviruses have a circulative-propagative interaction with their insect vectors. It is known that the presence of Defective-Interfering RNAs (DI-RNAs) in an inoculum can alter the transmissibility of an isolate and interfere with symptom development attenuating it. This doctorate thesis adds to the list of known defective viral RNAs for tospoviruses the Imperfect-Dimer RNAs (ID-RNAs), which are described in length in chapter one and chapter two regarding their molecular characterization, structural properties, the dynamics of their accumulation and their biological effects. ID-RNAs are dimer forms of the S RNA that carry in their junction sites a deletion at either the 3'UTR of the first monomer or the 5'UTR of the second monomer and are generated specifically in the infection of the plant host *Nicotiana benthamiana*. ID-RNAs were detected so far for *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) and TSWV. ID-RNA accumulation is modulated by temperature: low incubation temperatures (18°C) inhibit ID-RNA accumulation, whereas high incubation temperatures (30°C) enhance it. The accumulation of ID-RNAs for TSWV isolate p105 had a negative effect over the protein expression of the NSm and N viral proteins. Lastly, chapter 3 presents the results of diverse approaches that were tested for the development of a reverse genetics system for tospoviruses using *in vivo* and *in vitro* plant models and *in vitro* animal models (hamster and mosquito cell lines). In one of the approaches, the heterologous expression of the N and L proteins of TSWV was carried out in hamster cells and was able to recognize, replicate and transcribe the mRNA of the mGFP4 reporter-gene contained in a synthetic DI-RNA-like mini-genome. Interestingly, the expression of only the L protein in association to the transfection of the mini-genome also led to the reporter-gene activity. It was also shown that the

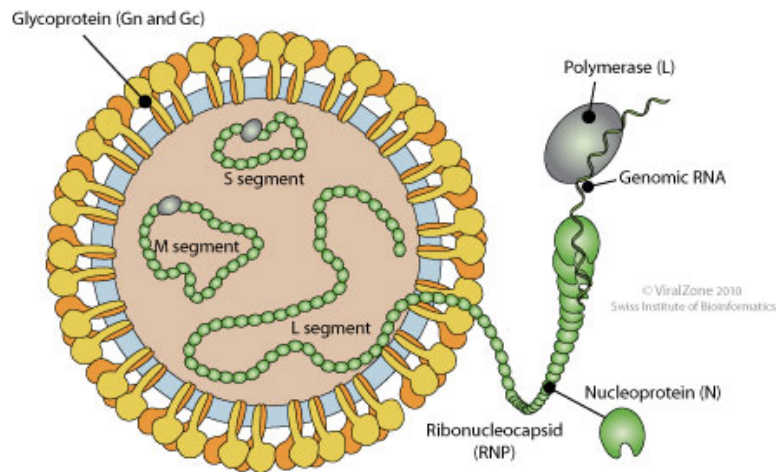
transfection of a plasmid that drives the cytosolic transcription of the genomic S RNA in concert with the heterologous expression of the N and L proteins and the transfection of the reporter-carrying mini-genome had a delaying effect on the reporter-gene expression. Moreover, it is shown that the transfection of a plasmid driving the transcription of the M RNA from TSWV in viral complementary sense in the context of a *Bunyamwera virus* mini-replicon system promoted an enhancement of the activity of the reporter-gene hRLuc. Infectivity rescue assays were also performed in both hamster and mosquito cells. Protein NSs expression was faintly detected for the former in a treatment composed only of transcription plasmids for the L, M and S RNAs in virus complementary sense, without heterologous expression of the L and N proteins. For the latter, cytopathological effects characterized by alteration of cell morphology and syncytia formation were observed. Taken together, the qualitative results presented in chapter 3 constitute the first efficient scientific demonstration of a reverse genetics system for tospovirus and represent an important hallmark of research for the genus *Tospovirus*.

Keywords: *Polygonum ringspot virus*, defective RNAs, S RNA dimer, reverse genetics, mini-replicon, *Tomato spotted wilt virus*.

### 3. Revisão do Estado da Arte

#### Características gerais da família *Bunyaviridae*

Os tospovírus (Figura1) fazem parte da família *Bunyaviridae* de vírus de RNA fita simples senso negativo, (-)ssRNA, de acordo com a classificação de Baltimore (Baltimore, 1971). O gênero *Tospovirus* é o único em sua família a ter como hospedeiros espécies vegetais. Os outros quatro gêneros que constituem a família, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus* e *Nairovirus* possuem como hospedeiros finais mamíferos, incluindo os seres humanos (Plyusnin et al., 2011). Em todos os casos, as infecções por bunyavírus podem ser letais e o potencial epidemiológico de muitas espécies dentro dos diversos gêneros é avaliado por órgãos de saúde e controle fitossanitário.



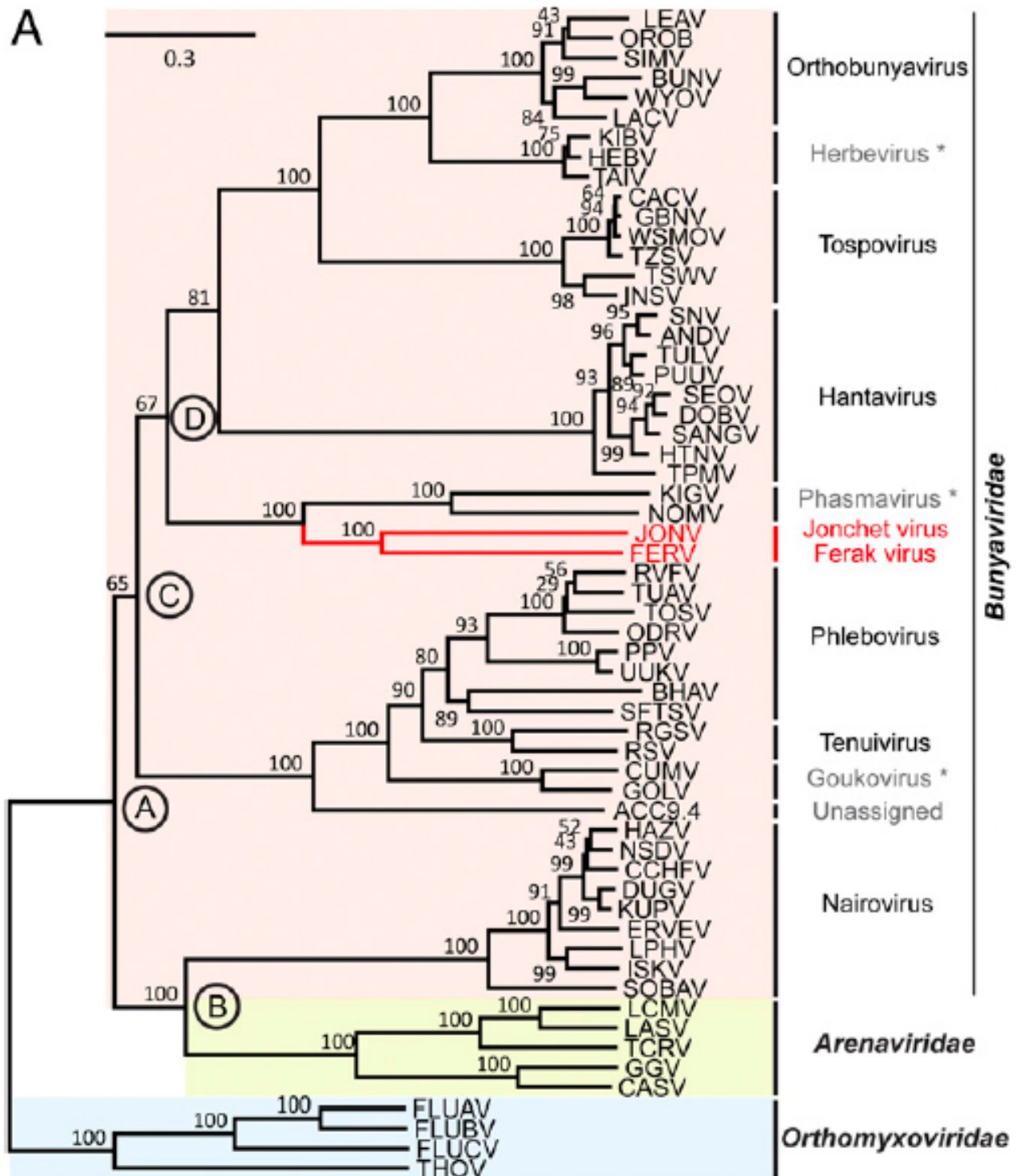
**Figura 1. Esquema de uma partícula viral típica da família *Bunyaviridae*.** As partículas virais possuem entre 80-120nm de diâmetro. As glicoproteínas virais (Gn e Gc) estão incorporadas na matriz lipídica do envelope, roubado da célula hospedeira. Os três segmentos virais (RNA) são completamente envolvidos pela proteína do capsídeo (N) e por poucas unidades da polimerase viral (L). Fonte: Viralzone.

Novas espécies de bunyavírus têm sido encontradas com a rápida disseminação e utilização de técnicas de metagenômica, metatranscriptômica e sequenciamento em massa de segunda e terceira gerações (e.g., Illumina e PACBio, respectivamente). As novas espécies encontradas são significativamente distintas

das muitas já conhecidas para esta família a ponto de constituírem novos gêneros-tentativa como Phasmavirus, composto por espécies virais encontradas em ácaros, integradas ao genoma dos aracnídeos ou ativamente infectando-os (Ballinger et al., 2014); Herbevirus, encontrados em mosquitos na Costa do Marfim e Uganda (Junglen et al., 2009, Marklewitz et al., 2013); e Goukovirus, encontrados também na África (Marklewitz et al., 2011, Marklewitz et al., 2015). Ainda, Marklewitz e colaboradores (2015) encontraram mais duas espécies, Ferak e Jonchet virus que não se encaixam a nenhum dos gêneros-tentativa novos dentro da família *Bunyaviridae* (Marklewitz et al., 2015). A Figura 2 apresenta a mais atual filogenia para os diferentes membros da família *Bunyaviridae* baseada na sequência de aminoácidos da proteína L, a polimerase viral. Esta análise filogenética revela ainda uma importante proximidade do gênero *Tenuivirus* a família *Bunyaviridae* (Figura 2).

Tendo em vista que a maior parte das espécies novas e divergentes relatadas para a família foram encontradas em artrópodes, sem evidências de transmissão para mamíferos na natureza, e considerando que estes novos vírus são capazes de infectar experimentalmente células de inseto (*Dipterae*) mas não mamíferos, considerou-se a hipótese de que a família *Bunyaviridae* fosse originalmente uma família de vírus que infectava insetos e que se diversificou para outros organismos hospedeiros (Marklewitz et al., 2013, Marklewitz et al., 2015). Esta hipótese foi tratada formalmente em testes evolutivos estatísticos de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*) e considerada a mais provável em comparação a uma origem desses vírus em hospedeiros animais com aquisição posterior da capacidade de infecção de seus insetos vetores (Marklewitz et al., 2015).





**Figura 2. Filogenia da família *Bunyaviridae* pela análise da proteína L (polimerase viral) incluindo os novos gêneros tentativa.** Utilizou-se o algoritmo de Maximum Likelihood com bootstraps. Os números sobre os ramos indicam a probabilidade da separação entre os ramos. As folhas dos ramos representam as espécies utilizadas para as análises, apresentadas na forma de acrônimos. Como grupo externo utilizou-se a sequência de membros da Família *Orthomyxoviridae*. O gênero *Tenuivirus* não pertence oficialmente a família *Bunyaviridae*. Sua organização genômica é tetra-segmentada e morfologicamente os tenuívirus não são envelopados. Os membros da família *Arenaviridae* possuem genomas bi-segmentados e partículas virais envelopadas. Adaptado de Marklewitz et al. 2015.

Em comum, os membros da família *Bunyaviridae* infectam e são transmitidos por artrópodes de diversas ordens, de pulgas e carrapatos a moscas e tripes. Os bunyavírus que tem como hospedeiro final mamíferos são classificados dentro do grande grupo dos arbovírus (*Arthropod-borne virus* – vírus transmitidos por artrópodes)(Goddard, 2008). No caso do gênero *Hantavirus*, foram levantadas controvérsias a respeito do seu meio de transmissão: se o aerossol das excretas de roedores infectados ou mordidas de carrapatos (Houck et al., 2001, Yu and Tesh, 2014). Não obstante, tem-se como método canônico de transmissão dos vírus desse gênero a inalação das partículas virais presentes no aerossol de excretas de roedores.

Os bunyavírus, à exceção de Jonchet virus, possuem partículas virais envelopadas esféricas ou quasi-esféricas com diâmetro médio entre 80 e 120nm. Todos os bunyavírus possuem genoma tri-segmentado classificado em L, M e S de acordo com o tamanho do RNA genômico viral (i.e., L – large, M – medium, S – small). Os três RNAs genômicos virais codificam as proteínas estruturais do vírus: a polimerase (RNA polimerase dependente de RNA –RdRp, ou ptn. L) no segmento L, as glicoproteínas associadas ao envelope (Gn e Gc) no segmento M, e a proteína do nucleocapsídeo (N) no segmento S. Além das proteínas estruturais, são conhecidas duas proteínas não-estruturais (NSs e NSm) que possuem funções diversas, e em alguns casos desconhecidas, dependendo do gênero viral (Nichot et al., 2005).

A proteína NSs é produzida para membros dos gêneros *Tospovirus*, *Phlebovirus* e *Orthobunyavirus*, embora por meio de estratégias de codificação e expressão diversas (codificação ambisenso para os dois primeiros e *leaky scanning* para o último) e possivelmente desempenhando funções biológicas diversas, enquanto NSm é produzida, aparentemente em modo vestigial e sem função conhecida para o gênero *Nairovirus*, como um subproduto do precursor glicoproteico para o gênero *Orthobunyavirus* e como uma proteína de movimento viral para o gênero *Tospovirus*. As extremidades de cada segmento genômico

(regiões 5' e 3'UTR – UTR do inglês, regiões não-traduzíveis) dos membros da família *Bunyaviridae* são parcialmente complementares promovendo a estruturação secundária dos RNAs genômicos na forma de “cabo de panela” (*panhandle*, do termo em inglês). Os primeiros seis nucleotídeos das duas extremidades de todos os genomas dos membros do gênero *Tospovirus* são universalmente conservados: AGAGCA.

Embora sejam classificados como vírus de (-)ssRNA, todas as espécies do gênero *Tospovirus* possuem organização genômica ambisenso para os segmentos S e M – i.e., as fitas de RNA viral de senso (-), correspondentes ao RNA encapsidado nos vírions, e (+), produzidos pela polimerase viral na replicação, codificam proteínas e são moldes para a transcrição dos mRNAs subgenômicos – e essa é uma característica exclusiva do gênero *Tospovirus* dentro da família *Bunyaviridae*. Apenas o gênero *Phlebovirus* também apresenta codificação ambisenso, mas somente para o segmento S. De fato, o caráter ambisenso do segmento S do gênero *Phlebovirus* foi um dos argumentos usados pela comunidade científica para propor a inclusão do gênero *Tospovirus* como um novo gênero da família *Bunyaviridae*. Os outros argumentos utilizados foram i) a presença dos nucleotídeos terminais complementares conservados e a estrutura pseudo-circular dos RNAs genômicos deles derivada, ii) a forte similaridade do domínio transmembrana das glicoproteínas do envelope iii) e a não formação de mRNAs subgenômicos, mas sim de tamanho similar ao genômico, para o RNA viral L. O pedido de inclusão do gênero *Tospovirus* na família *Bunyaviridae* se deu na reunião de 1990 do Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (ICTV, sigla em inglês) em Berlim, seis anos após a primeira sugestão científica dessa relação em um artigo (Milne and Francki, 1984).

## **O gênero *Tospovirus***

### *Características gerais*

O gênero *Tospovirus* deriva das iniciais da espécie-tipo, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV - **TO**mato **SP**Otted wilt virus), e é constituído atualmente por 11 espécies descritas na última revisão do ICTV em 2014 (ICTV, 2015), com pelo menos outras 17 espécies-tentativa. Dentre todas as espécies descritas até o momento apenas uma, *Polygonum ringspot virus* (PolRSV), foi descoberta em um hospedeiro que não é aproveitado comercialmente para cultivo (agrícola ou ornamental): as ervas-daninhas *Polygonum convolvulus* e *Polygonum dumetorum*, encontradas naturalmente infectadas nas regiões norte e central da Itália em áreas degradadas pela atividade humana e também em áreas de montanha, a cerca de 2000m de altitude - o que denota uma possível sub-amostragem da diversidade real das espécies de tospovírus existentes atualmente (Ciuffo et al. 2008). Ao todo foram coletados 14 isolados distintos de PolRSV em diversos pontos de coleta na Itália (Ciuffo et al., 2008). Embora restrita na natureza aos hospedeiros mencionados acima devido a estreita correlação entre o inseto-vetor *Dictyothrips betae* e as plantas da família *Polygonaceae* (Ciuffo et al., 2010), experimentalmente o espectro de hospedeiros de PolRSV é amplo, sendo capaz de causar morte de *N. benthamiana* e infectar sistemicamente tomate e pimentão (Ciuffo et al., 2008).

De modo geral a distribuição geográfica de cada espécie de tospovírus é correlacionada à presença do inseto-vetor, tripes, e vai de zonas de clima tropical e sub-tropical a zonas de clima temperado e possivelmente na região polar Antártica (Polischuk et al. 2006). Assim sendo, embora as espécies do gênero *Polygonum* que se encontram no Brasil estejam presentes no cultivo de pastagens como braquiária sendo importantes ervas-daninhas (Dra. Inoue-Nagata, comunicação pessoal), a presença da espécie de tospovírus PolRSV não é esperada, visto a ausência de relatos da ocorrência do inseto-vetor em regiões neotropicais (Riley, 2011). PolRSV é mais próximo filogeneticamente das espécies *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Tomato yellow (fruit) ring virus* (TYRV) (Margaria et al., 2014b, Ciuffo et al., 2008).

Considerando-se coletivamente as espécies vegetais já descritas até o momento como hospedeiras do gênero *Tospovirus* (naturalmente infectadas ou por meio de inoculação mecânica), estima-se que o gênero seja capaz de infectar mais de

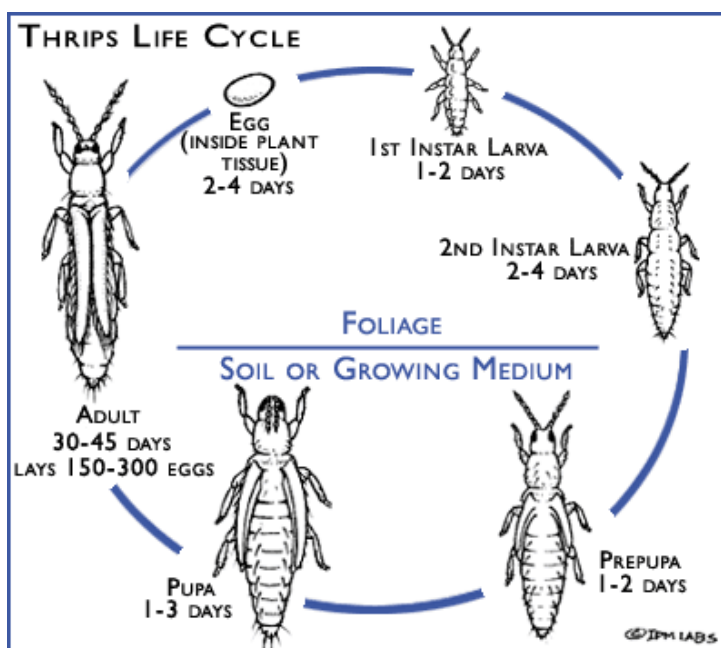
mil espécies diferentes, tendo como grupos taxonômicos mais suscetíveis solanáceas, cucurbitáceas, asteráceas (*Compositae*), membros do gênero *Allium*, leguminosas e liliáceas (Pappu et al., 2009). Morfologicamente os tospovírus possuem partículas virais envelopadas de forma esférica ou quase-esférica variando entre 80 e 120nm de diâmetro (Plyusnin et al., 2011). O interior das partículas é mais elétron-lúcido que o perímetro, onde estão fusionadas as glicoproteínas transmembrânicas. As partículas se encontram frequentemente agrupadas, envoltas por membranas bastante distorcidas derivadas do aparato de Golgi dentro das células infectadas, frequentemente associadas ao retículo endoplasmático (Milne, 1970). Assim como as partículas completas, as ribonucleoproteínas (RNA genômico encapsidado por inúmeras cópias da proteína N e algumas cópias da proteína L) foram visualizadas ao microscópio eletrônico para *Uukuniemi virus* e apresentam estrutura pseudo-circular, na qual o *panhandle* foi visualizado (Hewlett et al. 1977).

#### Transmissão e relação com o inseto-vetor

Até o momento 12 espécies são reconhecidas como transmissoras de tospovírus dentre as centenas de espécies de relevância agronômica, que por sua vez constiutem apenas uma fração das cerca de seis mil espécies identificadas pertencendo a ordem *Thysanoptera* (Mound, 2005). As espécies de tripes transmissoras mais importantes são *Frankliniella occidentalis* (*western flower thrips*, nome popular em inglês), *Frankliniella schultzei*, *Thrips palmi* (*Melon thrips*, nome popular em inglês) e *Thrips tabaci* (*Onion thrips*, nome popular em inglês). Os tripes são insetos voadores polípagos comumente presentes em ambientes naturais e agrícolas e tidos como pragas de plantações, causando danos significativos por seu parasitismo (geralmente pontilhados prateados em folhas e danos as flores). Os tripes são insetos hemimetábolos (i.e., as fases larvais se assemelham em grande parte ao inseto adulto e não há uma verdadeira metamorfose) de ciclo de desenvolvimento curto - entre uma a duas semanas - da oviposição ao adulto em condições favoráveis de clima (Figura 3). Quando adultos, tripes predadores podem

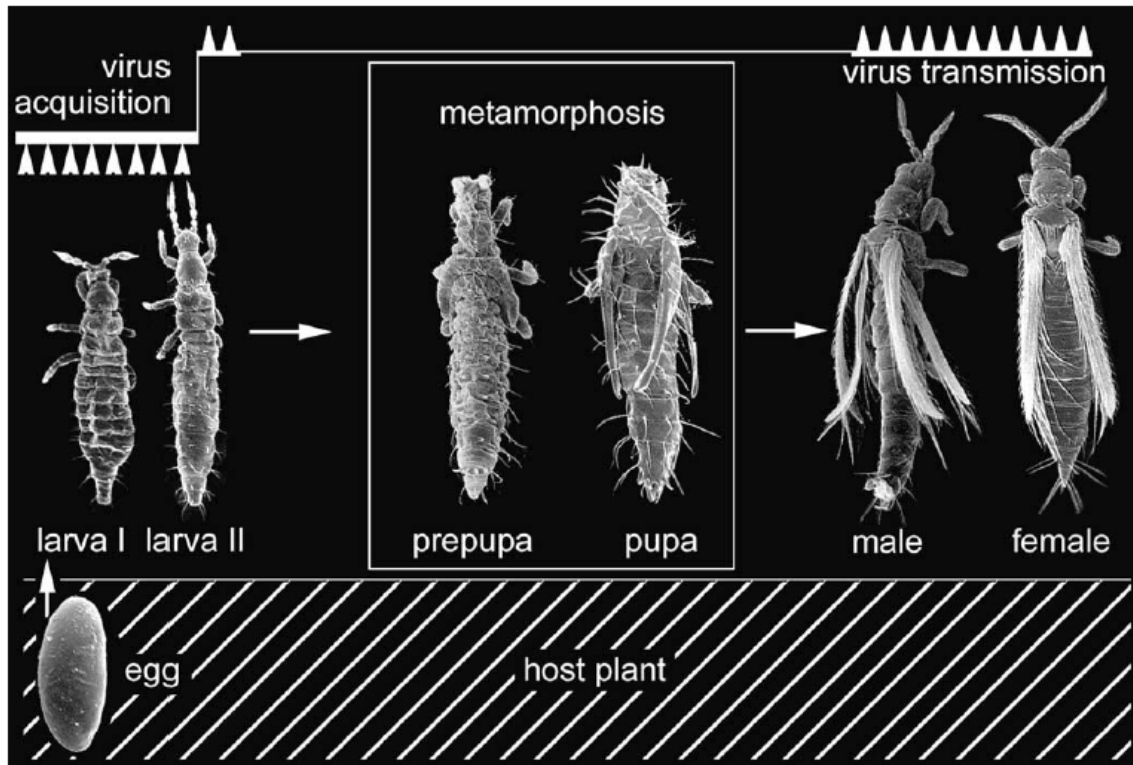
ter até 14mm de comprimento, sendo que as espécies fitófagas costumam ter entre 1-3mm de comprimento (Whitfield et al., 2005).

Plantas de pimenta (*Capsicum annum*) e *Datura stramonium* infectadas com TSWV provaram ser mais atraentes para visitaço e deposiço de ovos do inseto-vetor do que plantas não infectadas (Maris et al., 2004). Observou-se ainda que a saído das larvas dos ovos e a pupaço para fase adulta tiveram tempos mais curtos para indivíduos crescidos em plantas infectadas (Maris et al. 2004).



**Figura 3. Ciclo de vida dos trips.** O desenho esquemático demonstra o tempo de duração do ciclo de desenvolvimento de trips do ovo ao adulto correspondente a 7 a 15 dias. Fonte: IPM Labs

Tanto machos quanto fêmeas podem ser infectados pelos tospovírus e são capazes de transmitir o vírus para as plantas. Sabe-se que insetos machos infectados realizam até três vezes mais picadas de prova - aquelas nas quais o inseto insere o aparelho bucal pela cutícula da folha, saliva no interior das células, mas não suga ou destrói o conteúdo celular - do que machos não infectados (Stafford et al. 2011). Os trips são suscetíveis à infecção pelos tospovírus durante toda a sua vida. No entanto apenas durante o primeiro e segundo estádios larvais os insetos infectados tornam-se transmissores (Figura 4).



**Figura 4. Fases de desenvolvimento do tripe *Frankliniella occidentalis* e suas relações com a aquisição e transmissão de tospovírus.** Na parte superior da figura, as pontas de setas voltadas para cima representam períodos de atividade alimentar do inseto. Na parte mais basal da figura, demonstra-se que a deposição dos ovos dessa espécie de tripe é feita no interior da folha parasitada. O período de aquisição viral pelo inseto é representado pela barra branca grossa e corresponde a 2 a 4 dias pós eclosão da larva. Fonte Moritz et al. 2004.

Essa restrição do período de aquisição do vírus pelo inseto vetor diz respeito ao posicionamento dos órgãos do inseto durante as fases larvais, nas quais estão presentes ligamentos de tecido muscular que conectam as camadas exteriores do aparelho intestinal do inseto as glândulas salivares, a partir de onde o vírus é transmitido durante o ato alimentar do tripe vetor (Moritz et al., 2004, Nagata et al., 1999)(Figura 5). A relação vírus/vetor entre tospovírus e tripe é do tipo circulativa-propagativa pois os vírus se locomovem do aparelho bucal até o intestino, onde infectam (reproduzem-se; relação propagativa) células epiteliais e migram pelos tecidos do inseto vetor se acumulando em grandes quantidades por fim, nas glândulas salivares de onde são expelidos junto com a saliva nas picadas (relação circulativa). Embora infectem diferentes tecidos do inseto-vetor, os vírions

não estão presentes na hemocele e não há evidências de transmissão vertical dos tospovírus (Mound, 2005).

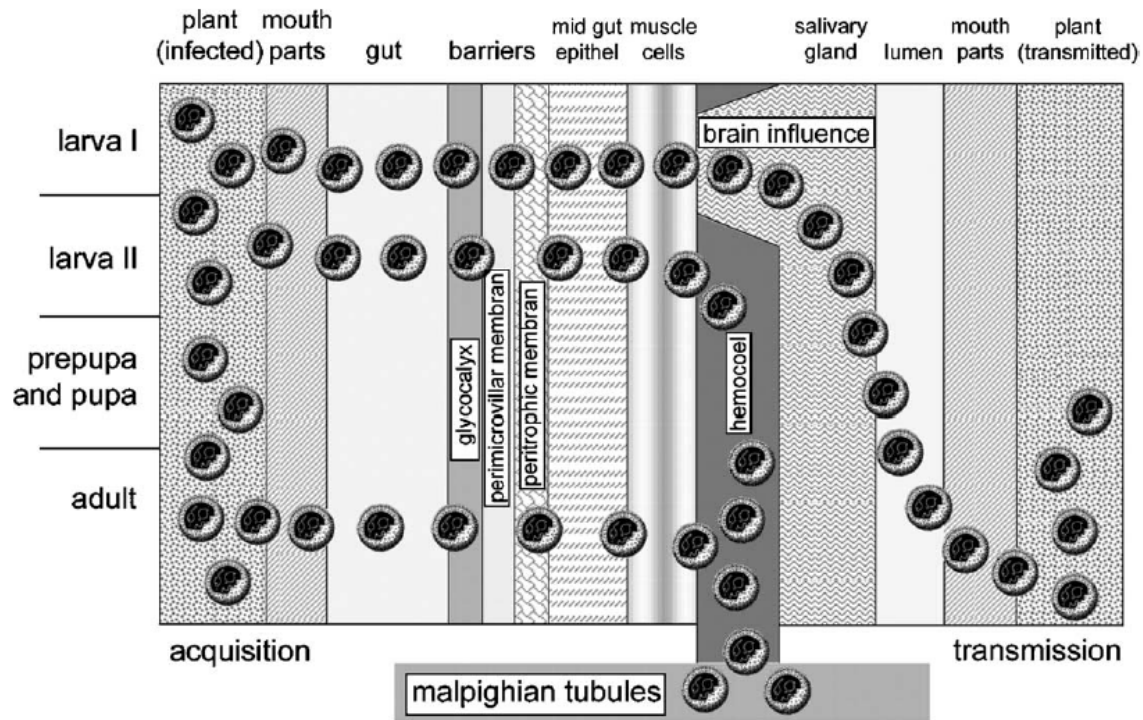


Figura 5. Representação esquemática da passagem de partículas de tospovírus pelos diferentes órgãos e tecidos do corpo do tripses vetor em diferentes fases de desenvolvimento do inseto. Os elementos circulares apresentados representam as partículas virais. As diferentes faixas verticais representam os tecidos/órgãos por onde passam as partículas virais. Os diferentes estádios de desenvolvimento formam faixas horizontais. Fonte: Moritz et al. 2004.

Recentemente, Groves e colaboradores (2016) demonstraram evidências que suportam a transmissão da espécie tentativa Soybean vein necrosis (associated) virus (SVNaV) por meio de sementes de soja com uma taxa de transmissão de 6% entre sementes sintomáticas e plântulas a partir de um lote de sementes infectadas, contrariando o padrão de transmissão viral na natureza exclusivamente por meio do inseto-vetor. No trabalho, Groves e colaboradores usam RT-PCR para os três segmentos virais da espécie-tentativa SVNaV e também RNA-seq comparando uma amostragem mista (*pool*) de folhas infectadas obtidas das plântulas germinadas das sementes contaminadas com uma amostra de campo de soja infectada pelo vírus. Falta neste trabalho, no entanto, confirmação da expressão das proteínas virais ou a



utilização de uma técnica de detecção que não envolva a amplificação do material biológico inicial (e.g., DAS-ELISA). Não obstante, esse foi o primeiro relato de transmissão de um tospovírus por meio de sementes na literatura.

### Taxonomia

O principal critério taxonômico para a separação das espécies do gênero *Tospovirus* é a diferença de identidade para a sequência de aminoácidos da proteína do capsídeo (N) estabelecida por de Ávila e colaboradores em 1993 (de Avila et al., 1993a, de Avila et al., 1993b). O valor limite para considerar dois isolados como pertencentes a uma mesma espécie é de no mínimo 90% de identidade (Plyusnin et al., 2011). Qualquer valor abaixo de 90% indica tratar-se de uma nova espécie. Critérios taxonômicos auxiliares são a sintomatologia, o círculo de hospedeiros, espécies do inseto-vetor transmissoras e a soro-reatividade que, em pelo menos um caso, serviram para evidenciar incongruências na aplicação da regra taxonômica (Hassani-Mehraban et al. 2007). Embora a literatura para tospovírus apresente alguns estudos sobre mutação e evolução de populações de TSWV provando ocorrência de rearranjos entre diferentes isolados (Qiu et al., 1998, Tentchev et al., 2011, Lian et al., 2013, Margaria et al., 2015), foram os trabalhos de Webster e colaboradores (2011a, b) os primeiros a demonstrar a ocorrência de um isolado viral derivado de rearranjo interespecífico entre duas espécies distintas: *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV). O vírus híbrido fruto deste rearranjo é um isolado com segmentos S e L de GRSV e segmento M de TCSV.

Se apenas o critério da sequência do nucleocapsídeo tivesse sido usado para classificar esse isolado, a comunidade científica não saberia da existência de rearranjo interespecífico para o gênero *Tospovirus*. GRSV e TCSV, no entanto, são espécies muito próximas filogeneticamente, o que pode ter favorecido o valor de *fitness* do híbrido. No local da descoberta, o sul do estado da Flórida, EUA, nunca havia registrado presença de nenhuma das espécies parentais, logo, não havia pressão populacional (competição) após introdução para o não estabelecimento do

híbrido. Após a publicação dos trabalhos de Webster e colaboradores, a comunidade científica dos tospovírus não poupou esforços para encontrar outros exemplos de rearranjos de igual caráter, no entanto, até o momento, novos isolados rearranjados não foram descritos ocorrendo na natureza. Ainda outros trabalhos dos últimos 5 anos desafiam o conceito filogenético estabelecido para o gênero, propondo a mudança do critério para a análise da sequência de aminoácidos da proteína L ao invés da proteína N ou a análise concatenada de todos os segmentos virais (Bertran et al. 2011; de Oliveira et al. 2011).

Em termos filogenéticos, o gênero *Tospovirus* é comumente separado em dois clados: americano e eurasiático, representando dois centros de diversificação de espécies a partir de um ancestral comum. No clado americano estão espécies que são mais similares a TSWV, enquanto espécies mais próximas a *Watermelon silver mottle virus* estão no clado eurasiático. No entanto, *Iris yellow spot virus* (IYSV) representa um caso curioso: como doença “tipo-tospovírus” foi descrita pela primeira vez por de Ávila e colaboradores [1981, *apud* (Bag et al., 2015)] em cebolas no Brasil, mas de acordo com sua filogenia é uma espécie classificada no clado eurasiático, próxima a espécies como PolRSV, Tomato yellow ring virus (TYRV) e *Hippeastrum chlorotic ringspot virus* (HCRV). Não obstante, IYSV, caracterizado como nova espécie por Cortês e colaboradores na Holanda em 1998, possui grande relevância nos Estados Unidos da América, onde causa danos severos de rendimento a plantações de cebola. IYSV também foi encontrado em Israel, Irã e Holanda, indicando que a divisão filogenética de cunho geográfico pode não ser bem correlacionada à história do vírus. O exemplo da espécie IYSV demonstra claramente a introdução de vírus pertencentes a um clado em outra região geográfica, provavelmente devido ao fluxo de material vegetal contaminado.

Nos últimos cinco anos foram descobertas novas espécies que não se enquadram perfeitamente na divisão de clados atual porque divergiram em um tempo mais remoto do ancestral comum (i.e., acumularam mais mutações do que todas as outras espécies que se assemelham aos “nós” dos clados: TSWV e WSMoV). Dentre essas, destacam-se Bean necrotic mosaic virus (BeNMV)(de Oliveira et al.,

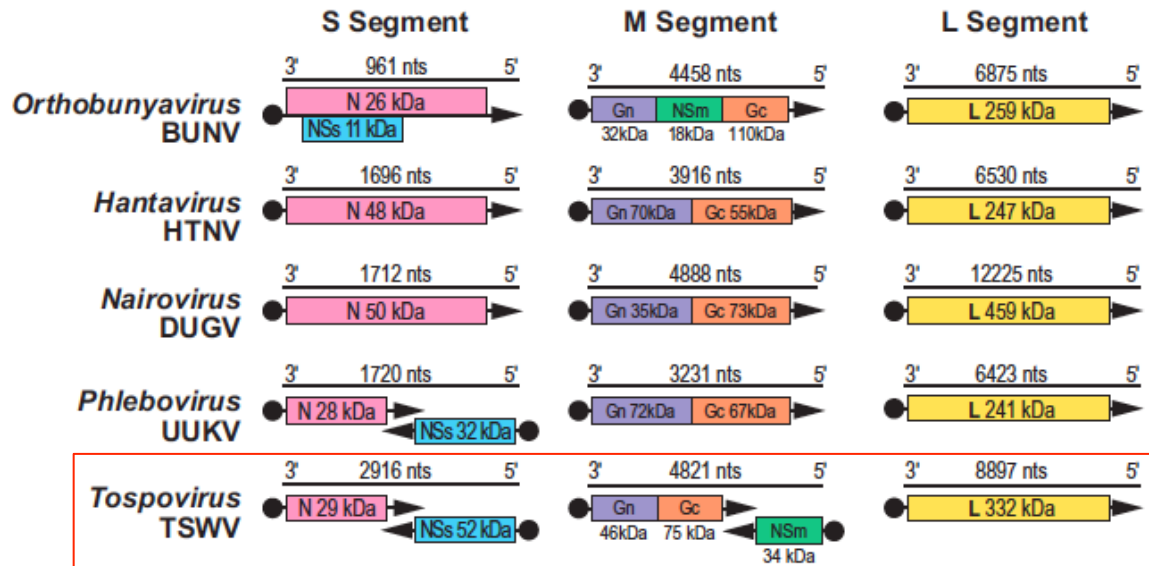
2012), Soybean vein necrosis associated virus (SVNaV)(Zhou et al., 2011) e Lisianthus necrotic ringspot virus (LNRSV)(Shimomoto et al. 2014). Peanut yellow spot virus (PYSV)(Satyanarayana et al., 1996) e Peanut chlorotic fan-spot virus (PCFV)(Chu et al., 2001) possuem, assim como as demais espécies citadas acima, diferenças marcantes de distribuição filogenética em relação as espécies que formam os dois nós de clados dentro do gênero (TSWV e WSMoV). Algumas dessas espécies vêm sendo alvo de estudos mais aprofundados sobre suas características moleculares e epidemiologias (Zhou and Tzanetakis, 2013, Leastro et al., 2015, Groves et al., 2016).

### Organização genômica

Os genomas de todos os tospovírus conhecidos até o momento possuem organização e número de genes iguais e podem ser descritos por um mesmo padrão (Figura 6): O S RNA, de estratégia de codificação ambisenso, apresenta dois genes, NSs (Kormelink et al., 1991, Takeda et al., 2002) e N (de Haan et al., 1989, de Haan et al., 1990). O M RNA, assim como o S RNA, também codifica dois genes, a proteína NSm (Kormelink et al., 1992a, Kormelink et al., 1994) e o precursor das glicoproteínas virais Gn e Gc (Kormelink et al., 1992a), enquanto o L RNA carrega o gene para a polimerase viral, a proteína L (de Haan et al., 1991).

Os RNAs genômicos S e M possuem uma região repetitiva em adeninas e uracilas na posição intermediária das fitas, denominada região intergênica (IGR - *intergenic region*, na sigla em inglês) que é capaz de formar fortes estruturas secundárias (van Knippenberg et al., 2005a) que atuam como reguladores da expressão gênica e terminadores transcricionais (Geerts-Dimitriadou et al., 2012). Com exceção do gene codificado pelo L RNA, todos os outros são traduzidos a partir de mRNAs subgenômicos (i.e., de tamanho inferior ao tamanho do segmento genômico correspondente). Todos os mRNAs gerados pelo vírus sofrem a adição de uma sequência de aproximadamente 10-15 nucleotídeos “roubados” de mRNAs celulares incluindo um CAP 5' pela atividade de *cap-snatching* da proteína L

(Kormelink et al., 1992c, van Knippenberg et al., 2005b).



**Figura 6. Organização genômica dos diferentes membros da família *Bunyviridae*.** Em especial, é destacada no retângulo vermelho a organização genômica do gênero *Tospovirus*, distinta daquela dos outros bunyavírus. N - proteína do capsídeo; NSs - proteína não estrutural do segmento S; Gn e Gc - glicoproteínas virais; NSm - proteína não estrutural do segmento M; L - polimerase viral. Fonte: Plyusnin et al. (2011).

Em termos de suas funções sabe-se que a proteína NSs de tospovírus é um forte supressor do processo de silenciamento gênico (Takeda et al., 2002) induzido pela célula infectada conduzido pela maquinaria de RNA interferente (RNAi) a partir de precursores de RNA exógenos (no caso, virais) de dupla fita (dsRNA) (Schnettler et al., 2010). Sabe-se que a proteína NSs não impede, no entanto, que a maquinaria de RNAi corte fitas de dsRNA provenientes dos intermediários de replicação do vírus pois foi possível por meio de técnicas de sequenciamento em massa (Illumina RNA-seq) usando exclusivamente coleções de pequenos RNAs (sRNAs) recriar 99% do genoma completo dos três segmentos virais de TSWV (Hagen et al. 2011).

A atuação da proteína NSs, portanto, ocorre em etapa posterior a do funcionamento das proteínas Dicer. Em 2010, Schnettler e colaboradores verificaram a diversidade de afinidade das proteínas NSs de quatro espécies de tospovírus (TSWV, GRSV, INSV e TYRV) a substratos de RNA fita dupla longos e curtos. Em relação a dsRNAs curtos, as proteínas das quatro espécies ligaram-se

eficazmente, indicando que podem atuar na célula como competidores do complexo RISC, o principal efetor da resposta de defesa celular pela maquinaria de RNAi. Em outro trabalho importante realizado com a proteína NSs de *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) em 2010, Lokesh e colaboradores demonstram atividade enzimática de dois tipos distintos para a proteína: NTPase/dATPase e 5'  $\alpha$ -fosfatase. Os pesquisadores relatam que a descoberta dessas duas diferentes ações enzimáticas pode aumentar o espectro de funções da proteína NSs de supressão de defesas do hospedeiro para replicação e transcrição virais. Os mesmos pesquisadores relatam ainda que a função fosfatase é direcionada para ácidos ribonucleicos e pode ser a base para camuflar os fragmentos de RNA picotados pela enzima Dicer do complexo RISC, pois este complexo é incapaz de reconhecer e carregar fragmentos de RNA que não tenham a extremidade 5' fosforilada. Em um desdobramento recente (Bhushan et al., 2015) da linha de pesquisa sobre a funcionalidade da proteína NSs de GBNV, Bhushan e colaboradores usaram a proteína purificada expressa de modo heterólogo em *E. coli* para avaliar função de DNA helicase para a proteína NSs. Embora o resultado experimental seja positivo para esta função, parece improvável que NSs se ligue a DNA *in vivo*, e mesmo que o faça, é difícil precisar a relevância desta função na infecção viral, visto que os tospovírus são vírus de (-) ssRNA.

Além disso, por meio de ensaios comparando a eficiência de transmissão e realização de hibridização *in situ* de dois isolados de TSWV, um tipo-selvagem (WT – *wild type*, da sigla em inglês) e um mutante deficiente para expressão da proteína NSs, Margaria e colaboradores (2014) demonstraram pela primeira vez a necessidade da proteína NSs para uma eficiente infecção e transmissão de tospovírus pelo inseto tripes vetor *Frankliniella occidentalis*. Ainda, sabe-se que a proteína NSs é o determinante de avirulência viral na interação de TSWV com *Tsw*, o gene de resistência usado comercialmente em pimentões (de Ronde et al., 2013) proveniente de um acesso de *Capsicum chinense* (Boiteux and de Avila, 1994).

A proteína N é a responsável pela encapsidação do RNA genômico nos vírions maduros, formando estruturas ribonucleoproteicas (RNP) e provavelmente é multifuncional. Sabe-se que a proteína N é capaz de interagir consigo mesma

formando multímeros (Uhrig et al. 1999) e também com a proteína NSm em complexos heterodiméricos (Dietzgen et al. 2012), além de interagir com as glicoproteínas virais Gc (Snippe et al. 2007) e Gn (Ribeiro et al. 2009). A proteína é também necessária para a formação do complexo de replicação viral, interagindo com a proteína L para o funcionamento desta última. Tendo em vista o grande número de interações proteína-proteína de origem viral, hipotetiza-se que os RNAs virais estejam sempre envoltos pela proteína N no curso da infecção (Reguera et al., 2014). O complexo de RNPs é o elemento infeccioso transmitido de célula a célula pelo plasmodesma. A proteína N também é considerada um determinante de avirulência antagonista ao gene de resistência *Tsw* (Lovato et al., 2007, Lovato et al., 2008). Recentemente determinou-se que a proteína N interage com o complexo actina/miosina através da proteína miosina XI-K no retículo endoplasmático formando complexos móveis que possivelmente estão associados ao tráfego das proteínas virais para montagem de partículas e infecção célula a célula (Feng et al., 2013). A estrutura da proteína N foi recentemente caracterizada por técnicas biofísicas de microscopia de força atômica e cristalização seguida de difração de raios-X (Komoda et al., 2013). Simulacros feitos por predição de estrutura baseados em modelagem por homologia (*Homology-Modeling*) também foram gerados (Li et al., 2015b).

As glicoproteínas virais Gn e Gc desempenham papel importante na maturação dos vírions por meio da coordenação espaço-temporal da correta montagem das partículas virais a partir de vesículas do aparato de Golgi (Ribeiro et al., 2009b). Como o elemento infeccioso no contexto dos hospedeiros vegetais é o complexo RNP, acredita-se que as funções desempenhadas por estas proteínas estejam mais fortemente associadas à infecção do inseto vetor. Sabe-se que a passagem seriada por inoculação mecânica de isolados de tospovírus pode gerar variantes virais defectivas para produção do envelope viral que, mesmo assim, retêm o caráter infeccioso nas plantas hospedeiras (Resende et al., 1991).

A proteína NSm dos tospovírus é diversa em volume molecular e em origem das proteínas NSm dos orthobunyavírus e dos nairovírus, apresentando forte

similaridade molecular e de função a proteínas pertencentes a família 30K (Melcher, 2000) de proteínas de movimento de vírus vegetais. As proteínas de movimento virais são genes de plantas ligados à formação e funcionamento do plasmodesma que foram cooptados pelos vírus vegetais, constituindo um conjunto de proteínas virais exclusivo dos vírus vegetais cuja função é interagir com o sistema de *Plasmodesmata* das células vegetais alterando a sua permissibilidade e induzindo a formação de novos plasmodesmas, assim promovendo a dispersão viral de célula a célula.

Os plasmodesmas são estruturas tubulares que se projetam da membrana plasmática forçando a modificação da parede celular para síntese de canais que interligam as células permitindo a passagem seletiva de conteúdo citoplasmático. Sabe-se que as diferentes proteínas de movimento virais em qualquer modo interagem com os plasmodesmas alterando a seletividade desse sistema tubular. Além disso, sabe-se que a proteína NSm é capaz de estimular a síntese *de novo* de estruturas tubulares projetadas para fora da membrana plasmática em protoplastos (células vegetais quimicamente desprovidas de parede celular), indicando que não apenas as proteínas de movimento alteram a permeabilidade dos plasmodesmas já existentes, como possivelmente aumentam o número de plasmodesmas na periferia celular (Storms et al., 1995).

A proteína NSm foi descrita como o determinante de avirulência do gene de proteção ampla contra tospovírus em tomate, *Sw5*, por pelo menos dois grupos de pesquisa distintos (Hallwass et al., 2014, Peiro et al., 2014). Acredita-se que o acoplamento das proteínas NSm a membrana plasmática ocorra por meio de um domínio hidrofóbico e que o seu acoplamento a membrana seja necessário para a interação com a proteína N, de modo a direcionar os complexos RNP para a *plasmodesmata* (Leastro et al., 2015). Recentemente, Feng e colaboradores (2016) demonstraram que a proteína NSm interage com a membrana do retículo endoplasmático em um contexto intercelular por meio dos plasmodesmas e que esta interação é necessária para a movimentação da proteína e do vírus TSWV entre as células (movimento célula a célula).

Por fim, a proteína L, a polimerase viral, é um polipeptídeo de mais de 300kDa, multifuncional, responsável pela edição, replicação e transcrição do genoma viral (de Haan et al., 1991, van Knippenberg et al., 2002, Chapman et al., 2003). Sabe-se que ao menos poucas unidades da proteína estão acopladas aos RNP dentro das partículas virais maduras (Adkins et al., 1995) e que na porção N terminal da proteína se encontra o domínio de endonuclease responsável pela clivagem das sequências de 5' CAP provenientes de mRNAs celulares (*cap-snatching*)(Reguera et al., 2010).

O processo de *cap-snatching* realizado pela polimerase viral significa a edição da extremidade 5'UTR do mRNA viral nascente adicionando um resíduo de guanina metilado (o chamado CAP do mRNA) cortado (“roubado”, do inglês *snatched*) de diferentes mRNAs celulares que apresentem complementariedade à sequência do mRNA viral nascente (van Knippenberg et al., 2005b). A adição desse resíduo de CAP 5' é fundamental para que o complexo ribossomal reconheça e se acople ao mRNA dando prosseguimento a síntese proteica viral (tradução)(Kormelink et al. 1992a). Recentemente, Komoda e colaboradores (2014) demonstraram a interação da proteína celular eEF1A, uma proteína do complexo RNA polimerase II associada a elongação da transcrição de mRNAs celulares, na atividade de polimerase da proteína L. Este foi o primeiro fator de um hospedeiro vegetal descrito como necessário ao funcionamento dos complexos de replicação e transcrição de tospovírus.

### Ciclo infeccioso

O processo infeccioso dos tospovírus é bem conhecido, embora detalhes, principalmente sobre a formação do complexo de replicação, a regulação entre transcrição e replicação do genoma e sobre as interações do vírus com as proteínas do hospedeiro, ainda não tenham sido elucidados. A maioria dos estudos feitos até o momento foram realizados *in planta* (*Nicotiana benthamiana*, *N. rustica* e *N. tabacum*, geralmente) no contexto da infecção viral, ou em sistemas de



complementação para vetores virais, ou ainda por super-expressão por meio de *Agrobacterium tumefaciens* e em sistemas de lisados celulares vegetais ou ainda *in vitro* (culturas de células do inseto-vetor e *Lepidoptera*, células de mamífero e culturas de *Saccharomyces* e ainda sistemas livres de células como reticulócitos de coelho). Ainda pouco se sabe sobre as relações do vírus com o inseto-vetor, embora trabalhos recentes de proteômica (Badillo-Vargas et al., 2011, Badillo-Vargas et al., 2012), transcriptômica (Zhang et al., 2013, Stafford-Banks et al., 2014) e genômica (Yan et al., 2012, Jacobson et al., 2013, Facey et al., 2015) estejam mudando este panorama.

Por meio de estudos de localização subcelular sabe-se que a infecção viral ocorre em associação a periferia do retículo endoplasmático (RE) e na interface do RE com o aparato de Golgi das células infectadas (Ribeiro et al., 2013). A perda do envelope na primeira fase da infecção é conhecida para todos os gêneros da família *Bunyaviridae*, menos *Tospovirus*, e nestes primeiros ocorre por endocitose seguida de fusão das glicoproteínas à membrana do endossomo inicial, culminando na liberação do material genético viral no meio citosólico. Como os tospovírus são inseridos diretamente no interior das células ultrapassando a barreira das paredes celulares por meio do aparelho bucal do inseto-vetor, não é claro se a perda do envelope se dá ainda no inseto durante a salivagem ou dentro da célula vegetal. A montagem de novas partículas é um processo dependente da presença da glicoproteína Gn e ocorre no lúmen do aparelho de Golgi no qual os vírions recém formados se acumulam envoltos em estruturas membranosas desestruturadas derivadas do Golgi (Ribeiro et al., 2008). Em relação a citopatologia, os tospovírus produzem agregados citoplasmáticos proteicos e a proteína NSs pode formar estruturas fibrosas (Kormelink et al., 1991, Kitajima, 1965).

#### Dinâmica da expressão gênica

A análise temporal da expressão gênica foi realizada durante os anos 1990 por Kormelink e colaboradores (1992a) (em plantas infectadas) e Kikkert e

colaboradores (1997, 1999) (células infectadas *in vitro*) em plantas de *Nicotiana rustica*. Destes trabalhos sabe-se que os primeiros sinais detectados em northern e western blot para a replicação e expressão gênica na planta inteira se dão por volta de 72h (northern blot) após a inoculação mecânica do vírus, e a partir de 40h (northern e western blot) a partir da análise de protoplastos sincronicamente infectados. Os níveis das proteínas L, NSs e glicoproteínas Gn e Gc, ainda em *N. rustica*, aumentam continuamente durante a infecção viral alcançando um pico entre 7-10 dias após inoculação para NSs e 10-14 dias para a polimerase e as glicoproteínas virais. Já a proteína de movimento, NSm, apresenta um padrão de expressão diferenciado com detecção inicial a partir de 72h após inoculação e pico entre 7-8 dias seguido de redução da expressão e novos picos a medida que novas folhas se tornam sistemicamente infectadas. Esse padrão aparentemente cíclico é associado ao grau de infecção do tecido foliar. As infecções por tospovírus geralmente iniciam-se com clorose, mosaico leve e deformação da base (parte mais próxima ao pecíolo) da folha sistemicamente infectada, incluindo bolhosidades. A evolução da infecção sistêmica gera necrose, bronzeamento, deformação intensa, clorose e mosaico fortes em toda a área foliar em poucos dias (48 a 72h) após os primeiros sintomas. De acordo com Storms e colaboradores (1995), a forte expressão de NSm parece ser ativada pelo vírus no início da infecção sistêmica, mas reprimida quando a infecção sistêmica é tardia.

Em um trabalho realizado por Steinecke e colaboradores em 1998, os eventos iniciais de infecção e expressão gênica virais (até 72h.p.i) da transfeção de protoplastos com partículas de TSWV foram estudados. De acordo com os autores, as partículas virais carregavam não apenas RNA genômico (vgRNA) como também cópias do RNA viral-complementar (vcRNA). De fato, nos resultados obtidos pelos autores, os níveis do vcRNA para o segmento M são superiores aos níveis de vgRNA detectados. Os dados, no entanto, não apresentam validação estatística, o que pode indicar que a diferença não seja significativa. Além disso, foi possível detectar a expressão do mRNA para a proteína N a partir de 5h.p.i., o que está de acordo com achados para *Uukuniemi virus* em que a expressão do N mRNA foi detectável já a

partir de 2h.p.i. O mRNA da proteína NSs foi detectado somente quinze horas após o N mRNA. Em adição, a síntese de novas fitas vcRNA do S RNA precedeu entre 8-10h a síntese de novas fitas vgRNA.

Globalmente, os dados apresentados pelos autores mostram que durante as primeiras 24h da infecção há um decaimento de sinal, indicando perda de número de cópias dos RNAs genômicos nas duas orientações. Curiosamente, no mesmo período há um leve incremento no número de cópias dos mRNAs das proteína N e NSs e do precursor glicoproteico. Pelo fato do mRNA transcrito do segmento L ter tamanho similar ao RNA genômico, não é possível diferenciar por meio da técnica de northern blotting o RNA viral molde do mRNA a ser traduzido. Analisados conjuntamente, os resultados demonstram que nas fases primordiais da infecção o vírus prioriza a transcrição de mRNAs em detrimento a replicação das fitas complementares, o que reforça a hipótese de transição entre transcrição e replicação baseada na concentração crescente de proteína N presente na infecção. Embora o trabalho de Steinecke e colaboradores (1998) apresente resultados importantes da análise da dinâmica de expressão gênica nas fases iniciais da infecção, é um artigo pouco citado. A técnica usada para avaliação de infecção de protoplastos pelo vírus foi uma espécie de *Tissue blot* com revelação por reação colorimétrica dependente de enzima denominada NBT-BCIP/AP. Na membrana era espalhado o conteúdo inteiro de cada cultura de protoplastos tratada. Para avaliação da transcrição/replicação do genoma viral foi realizada detecção ultrasensível de  $\alpha^{32}\text{P}$  presente nos radionuclídeos (CTP) incorporados nas ribossondas por meio de northern blot usando um fosfoimageador (aparelho sensível a radioatividade usado para quantificação). Os resultados são apresentados, no entanto, como valores numéricos de captação de sinal radioativo e não como figuras das bandas de RNA transferidas do gel para membrana. Os achados deste artigo são apresentados a seguir:

**Tabela 1: Resultados obtidos por Steinecke et al (1998) por meio de quantificação de radioatividade de partículas  $\beta$  em membranas de northern blot contendo amostras de protoplastos infectados com *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).** Foram feitas hibridizações com sondas radioativas para os três RNAs genômicos (S, M e L), para os mRNAs subgenômicos do gene N, NSs (seg. S) e do precursor glicoproteico (G, seg M) e para defectivos-interferentes (DI).

TABLE 1  
Summary of the quantitative analysis of TSWV viral RNA species by  $\beta$ -imaging

RNA-species	PhosphorImager density readings					
	Sampling time after inoculation [h]					
	0	5	20	28	48	72
v-S RNA	4100	1450	90	50	210	1000
NSs-mRNA	0	0	30	45	70	230
vc-S RNA	650	450	70	110	700	2800
N-mRNA	0	90	150	190	500	1550
v-M RNA	3200	700	40	3	6	50
vc-M RNA	5500	1000	45	15	25	80
G-mRNA	0	0	5	15	20	55
vL RNA	4500	240	20	3	20	90
v-DI4L RNA	22000	5200	450	90	40	65
vc-L RNA	90	10	1	5	45	200
vc-DI4L RNA	230	100	15	5	15	45

The amount of viral RNA species was determined after electrophoretic separation and hybridization to  $\alpha^{32}\text{P}$ -labeled RNA probes by  $\beta$ -imaging the radioactivity bound to the nylon-filters. PhosphorImager density readings were corrected with respect to the content of incorporated [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]CTP within the individual RNA probe and with respect to the background.

Primeiramente, verificou-se que não apenas os RNAs virais genômicos (i.e., ssRNA(-) para os genes estruturais N, precursor glicoproteico Gn/Gc e L – na tabela indicados por v) como também os RNAs virais complementares (i.e., ssRNA(+)) para os genes estruturais – na tabela indicados como vc) estão presentes em partículas virais envelopadas purificadas. Em segundo lugar, demonstrou-se a presença de DI-RNAs (RNAs defectivos interferentes) também nas partículas virais. Ainda, apresentou-se que não há mRNAs virais presentes nos vírions. É possível notar para todos os diferentes RNAs virais analisados que de 0h a 28h p.i. há uma diminuição significativa da intensidade dos sinais radioativos, indicando um rápido decaimento dos RNAs virais e conseqüentemente, uma redução da diversidade de quasi-espécies virais. A expressão de mRNAs virais para os segmentos S e M se deu a partir de 20h p.i.

## Regulação da expressão gênica viral e balanço entre transcrição/replicação do genoma viral

Na fase inicial da infecção o vírus se utiliza das poucas moléculas da RdRp provenientes do vírion maduro e associadas aos RNAs genômicos pelos nucleocapsídeos, para rapidamente gerar fitas vcRNA. As fitas de orientação vcRNA codificam as quatro proteínas estruturais de tospovírus, N, L e Gn e Gc sendo essas duas últimas originadas como um precursor poliproteico clivado por uma protease do hospedeiro. As fitas de RNA viral genômico (vgRNA) codificam as duas proteínas não estruturais, NSs e NSm. Para gerar todos os mRNAs virais e os RNAs genômicos que serão empacotados nos vírions nascentes, a polimerase viral necessita ter como molde as duas orientações dos três segmentos genômicos. Mas como é feito o controle de qual fita será utilizada para empacotamento e qual para molde dos mRNAs virais, i.e, o balanço entre replicação e transcrição?

Acredita-se que os níveis de expressão da proteína N regulem o balanço global entre replicação dos RNAs genômicos virais e transcrição dos mRNAs subgenômicos e do mRNA do segmento L (Steinecke et al. 1998; German et al. 1992) e isto se deve a achados realizados principalmente para *Vesicular stomatitis virus* (VSV), um dos principais modelos de estudo de virologia molecular para as famílias e gêneros de vírus de (-) ssRNA. Em um trabalho seminal, Arnheiter e colaboradores (1985) demonstram que a partir de interferência na infecção viral por micro-injeção de dois anticorpos contra a proteína do capsídeo de VSV com distintas afinidades verificou-se que o bloqueio de proteínas N livres sintetizadas *de novo* durante a infecção viral impedia a replicação do vírus mas não a expressão das proteínas virais. Este trabalho foi posteriormente complementado por outros; um, em especial (Qanungo et al. 2003), relata a purificação de dois complexos proteicos distintos contendo a polimerase viral de VSV, um deles ligado a proteína do capsídeo, associado a replicação do vírus, e outro associado a proteínas do hospedeiro ligadas a síntese de mRNAs celulares. No entanto, a afirmativa do efeito estequiométrico da proteína N como elemento regulador do balanço transcrição/replicação representa uma simplificação da problemática e sabe-se que as estratégias de regulação entre

replicação/transcrição de vírus de genoma não-segmentado em comparação às de vírus de (-) ssRNA segmentados são diversas (Reguera *et al.* 2014). É intuitivo, no entanto, à luz do fato de que na replicação de ácidos nucleicos de vírus de (-) ssRNA estes nunca se encontram dissociados da proteína do capsídeo, que em concentrações baixas desta última exista uma inibição da atividade de síntese genômica. Mesmo assim, sabe-se que a regulação entre as duas atividades guiadas pela polimerase é multifatorial. Na prática sabe-se para tospovírus que partículas virais purificadas de TSWV na presença de sais e ácidos nucleicos livres são competentes para replicação (Adkins *et al.* 1995), mas apenas na presença de reticulócitos de coelho o são para transcrição de mRNAs (van Knippenberg *et al.* 2002). Assim, o processo de transcrição está associado a presença de proteínas do complexo traducional da célula hospedeira. No entanto, quando os sistemas de partículas purificadas e reticulócitos de coelho são tratados com inibidores seletivos ou completos da montagem dos complexos ribossomais (edeína e ciclohexamida, respectivamente) não é verificada perda da habilidade transcricional viral, indicando tratar-se de outro componente presente no reticulócito o responsável pela iniciação e alongamento da transcrição de mRNAs virais (van Knippenberg *et al.* 2004). Os tospovírus se diferem dos orthobunyavírus neste quesito, pois para estes últimos sabe-se que a inibição da atividade traducional pela ciclohexamida e por puromicina, um inibidor de cadeias polipeptídicas nascentes, mas não por edeína, impactam a atividade de transcrição viral.

É possível, ainda, que outra característica da infecção viral exerça papel no controle temporal entre transcrição e replicação, o efeito de *protein shutdown* causado pelo vírus. Um fenômeno bastante caracterizado nos bunyavírus (van Knippenberg *et al.*, 2013, Brennan *et al.*, 2011) para os quais existem modelos de infecção *in vitro*, mas ainda não estudado para os tospovírus. Este fenômeno representa a diminuição gradual das proteínas do hospedeiro ao longo do processo infeccioso em comparação as proteínas virais, ou seja, com o passar da infecção a célula sintetiza cada vez mais proteínas do vírus em relação a síntese de suas próprias proteínas. Somando a esse fenômeno a alta taxa de ativação da maquinaria

proteolítica naturalmente estimulada pela presença de patógenos no interior da célula, chega-se ao ponto em que, por meio de ensaios de incorporação de metionina radioativa comparando tempos iniciais da infecção a fases tardias, de avançada citopatologia, os perfis proteicos em géis de poliacrilamida são completamente diferentes: o perfil inicial da infecção sendo rico em inúmeras bandas de diversos tamanhos, representando todo o repertório de proteínas expressas pela célula ainda pouco perturbada, enquanto o perfil final é composto tão somente pelas proteínas virais em níveis detectáveis por técnicas colorimétricas como azul brilhante de Coomassie e deposição de nitrato prata.

Assim, em momentos iniciais da infecção, as proteínas do hospedeiro associadas *lato sensu* a tradução de proteínas ainda estão presentes na célula em quantidades suficientes para complexar-se com a polimerase viral e dirigir sua atividade para a transcrição. Nas fases tardias da infecção, com a depleção das proteínas do hospedeiro, mas na presença de uma grande quantidade da proteína N gerada ao longo da infecção celular, a proteína L muda seus parceiros de interação proteína-proteína sendo fortemente induzida a replicação viral em detrimento da transcrição. Kormelink e colaboradores (1992a) relatam que os RNAs virais vcRNA não se acumulam indefinidamente durante a infecção viral, mas sim atingem um platô (*steady-state*). Este platô provavelmente está associado ao empacotamento das cópias de vgRNA que servem de molde para transcrição dos vcRNAs subgenômicos e genômicos dos três segmentos de RNA virais. As moléculas de vcRNA portanto, em fases tardias da infecção, serviriam apenas como moldes para síntese genômica, mas não para a transcrição.

#### Genética reversa para tospovírus

O termo genética reversa representa o conjunto de técnicas e metodologias associadas à manipulação de genomas por meio de mutações sítio-dirigidas ou introdução/deleção de elementos genômicos de modo controlado visando, em

ambos os casos, obter conhecimento sobre o funcionamento dos variados elementos genômicos de um organismo ou vírus (manipulação genótipos → estudo fenótipos).

A genética reversa se diferencia da genética convencional na não utilização de componentes mutagênicos de efeito aleatório como radiação e ativação de elementos transponíveis que por sua natureza podem ter efeitos globais alterando provavelmente mais de um elemento genômico ao mesmo tempo. Na genética baseada em mutagênese randômica normalmente são realizados processos longos de observação e seleção de indivíduos em populações de indivíduos tratados em números muito altos, na casa de centenas a milhares de organismos, a fim de capturar variantes fenotípicas de interesse ou indivíduos que tenham sofrido apenas mutações em um traço/caractere por vez. A análise então procede do fenótipo para identificação do genótipo por meio de marcadores e mapas genéticos.

No caso da genética reversa aplicada a virologia, considera-se que o passo essencial para o desenvolvimento de linhas de pesquisa de sucesso seja a obtenção do material genético viral de modo estável e manipulável (i.e., genomas virais clonados em plasmídeos bacterianos ou fúngicos de modo a permitir inúmeros ciclos de replicação, sem indução de mutações indesejadas, e que sejam de fácil extração, sem a necessidade de processos demorados de centrifugação e purificação ou manipulação constante do patógeno em cultura). As alterações são realizadas *a priori* no genoma para depois serem avaliados os efeitos fenotípicos.

A obtenção de sistemas de genética reversa para vírus constitui um importante passo na produção de conhecimento científico de grande aprofundamento sobre a biologia viral levando a publicações de alto impacto, assim como ao estudo detalhado dos processos de replicação e expressão gênica virais e ao desenvolvimento de estratégias anti-virais eficientes, além de permitir o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas como ferramentas de terapia gênica.

Para a família *Bunyaviridae* existem sistemas de genética reversa baseados em clones infecciosos e/ou em replicação de mini-genomas para os gêneros *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Nairovirus* e um único artigo, sem desdobramentos,



para *Andes virus*, uma espécie do gênero *Hantavirus* (Bridgen and Elliott, 1996, Flick and Pettersson, 2001, Flick et al., 2003, Kohl et al., 2004, Bouloy and Flick, 2009, Brown et al., 2012, Elliott et al., 2013, Brennan et al., 2015, Tilston-Lunel et al., 2015, Acrani et al., 2015). Até o momento, nenhum artigo de genética reversa foi publicado para o gênero *Tospovirus*. O alto-impacto de sucessivas publicações a partir da obtenção destes sistemas de genética reversa reflete a importância e a eficiência das metodologias associadas em produzir avanços no conhecimento da virologia molecular desta família de vírus. Curiosamente, não são todas as espécies de cada gênero que se provam “permissíveis” o suficiente para a produção de verdadeiros sistemas de genética reversa (Benjamin Brennan, comunicação pessoal). Um resumo dos primeiros sistemas de sucesso para diferentes bunyavírus é apresentado na tabela 2.

**Tabela 2.** Sistemas de genética reversa disponíveis para a família *Bunyaviridae* (até 2012). Fonte: Bridgen (2012)

Genus/Virus	Minigenome assay	VLP assay	Virus rescue	
			T7 RNA polymerase	RNA polymerase I
<i>Orthobunyavirus</i> Akabane				Ogawa et al., 2007
Bunyamwera	Dunn et al., 1995 Weber et al., 2000 Kohl et al., 2004b	Shi et al., 2007 Eifan and Elliott, 2009	Bridgen and Elliott, 1996 Lowen et al., 2004	
La Crosse	Blakqori et al., 2003	Soldan et al., 2010	Blakqori and Weber, 2005	
<i>Hantavirus</i> Hantaan	Flick et al., 2003a Zhang et al., 2008			
<i>Nairovirus</i> Crimean-Congo haemorrhagic fever	Flick et al., 2003b Bergeron et al., 2010			
<i>Phlebovirus</i> Rift Valley fever	Lopez et al., 1995 Ikegami et al., 2005	Habjan et al., 2009a Terasaki et al., 2011 Piper et al., 2011	Ikegami et al., 2006 Gerrard et al., 2007 Habjan et al., 2008 Billecocq et al., 2008	Habjan et al., 2008 Billecocq et al., 2008
Toscana	Accardi et al., 2001			
Uukuniemi	Flick and Pettersson, 2001	Overby et al., 2006		

Para tospovírus, tentativas de obtenção de um sistema de genética reversa vêm sendo feitas desde meados dos anos 90, seja para geração de clones infecciosos (i.e., produção de infecção viral a partir da introdução apenas do genoma e das proteínas necessárias ao funcionamento do complexo de replicação), que para a ativação de mini-genomas artificiais (i.e, geralmente um gene repórter é editado dentro de um segmento genômico viral ou é engenheirado para conter todos os elementos que se acredita serem necessários para reconhecimento pela polimerase e conseqüentemente sua replicação e transcrição). Embora ao menos dois ou três grupos de expressão na comunidade dos tospovirologistas tenham realizado inúmeros testes usando diferentes estratégias (Dr. Richard Kormelink e Dr. Tom German, comunicação pessoal), até o momento, não há artigos publicados descrevendo o sucesso destes.

Dentre as estratégias já testadas para a genética reversa de tospovírus estão a substituição da proteína NSs por um gene repórter de luciferase em sistemas de células animais co-expressando as proteínas N e L (Dr. Richard Kormelink, comunicação pessoal e Danniël Duijsings, tese de doutorado, 1998, Wageningen Universiteit - WUR); a co-inoculação de vírus e *Agrobacterium* expressando um transcrito contendo o gene da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* - GFP) em orientação invertida flanqueado pelas sequências terminais do RNA S *in planta*; a expressão da proteína L e da proteína N contemporaneamente a uma construção de gene repórter em forma de mini-genoma em lisados de protoplastos provenientes de culturas celulares de *Nicotiana tabacum* BY-2 e a expressão de todos os segmentos em orientação vgRNA somados a proteína L e a proteína N por meio de agroinfiltração.

### DI-RNAs

Os DI-RNAs são formas defectivas interferentes do segmento genômico viral L produzidas pelos tospovírus após inoculações mecânicas seriadas com alta pressão de inóculo. Esses RNAs defectivos possuem as sequências 5' e 3'UTR conservadas e são transcricionalmente ativos, mas têm deleções de 60-70% da sequência interna do L RNA (Resende et al., 1992). Os DIs são ditos interferentes porque têm a capacidade de atenuar a sintomatologia viral e até mesmo influir sobre a capacidade de infectar diferentes espécies de hospedeiros (Resende et al., 1991). O mecanismo para a ação interferente é provavelmente baseado na competição entre RNAs genômicos normais e defectivos pela polimerase viral e recursos da célula.

A deleção do L RNA para geração dos DIs pode ser de três tipos: “perfeita”, na qual a deleção do fragmento do L RNA é única e o produto final é a simples soma dos fragmentos remanescentes; “suja”, na qual nucleotídeos extras de origem desconhecida foram observados entre as duas porções remanescentes; “imperfeita”, na qual pequenos fragmentos de origem viral estão entre as duas partes remanescentes (Inoue-Nagata et al., 1998). Inoue-Nagata e colaboradores (1998) reportaram também a geração de dímeros de DIs dentre os diferentes DIs estudados neste trabalho. Os DIs originalmente existem como uma subpopulação de moléculas derivadas do L RNA com diferentes tamanhos que, por eficiência de replicação vão sofrendo seleção até que após rodadas de cinco a quinze inoculações mecânicas em sequência, uma espécie de RNA se torna preferencialmente presente (Resende et al. 1991). Além de RNAs defectivos interferentes do segmento L, foram estudados mutantes de TSWV que não produziam glicoproteínas virais, mas mantinham a capacidade de infecção mecânica em seus hospedeiros vegetais. Estes mutantes geravam agregados densos de RNPs no citosol, mas não eram encontrados em associação ao aparato de Golgi (Resende et al., 1991).

Estudos realizados por Resende e colaboradores (1992) demonstram que as sequências dos DIs mais eficientes de GRSV e TSWV mantêm uma fase de leitura aberta para uma variante truncada da proteína L. Estudos posteriores realizados por Inoue-Nagata e colaboradores (1997; 1998) demonstraram que temperaturas

mais baixas favorecem significativamente o acúmulo de DIs em *N. rustica* e que a temperaturas mais baixas (16°C) a estrutura dos DIs é termodinamicamente mais favorável do que a temperaturas mais altas (23 e 30°C). Demonstrou-se também que *Emilia sonchifolia* é um hospedeiro eficiente para manter isolados de tospovírus livres de DIs mesmo à alta multiplicidade de infecção. Além disso, demonstrou-se que a fase de leitura aberta mantida nos DIs mais frequentes de TSWV são ativamente transcritas e traduzidas na célula (Inoue-Nagata et al. 1998).

Nagata e colaboradores em 2000 demonstraram que isolados de TSWV contendo DIs capazes de atenuar a sintomatologia viral e suprimir fortemente os níveis de L RNA WT não foram transmitidos pelo tripses, enquanto isolados contendo DIs sem efeito marcante como atenuadores de sintomas e incapazes de alterar drasticamente os níveis do L RNA WT foram transmitidos com eficiência comparável a do vírus WT. Os autores discutem um possível efeito de dose de unidades virais funcionais (onde os níveis de L RNA WT são mantidos) contra unidades praticamente não funcionais (níveis muito menores de L RNA WT) no estabelecimento da infecção no intestino dos tripses e no deslocamento do vírus do intestino para as glândulas salivares de maneira tempo-dependente (i.e., antes da extensiva reorganização morfológica ocorrida durante a pupação) garantindo a transmissão eficiente do vírus pelo inseto adulto. Outros tipos de mutantes que alterem o número, tamanho, ou estrutura dos segmentos genômicos não foram mostrados até o momento na literatura para o gênero *Tospovirus*, seja para o segmento L ou para os segmentos M e S.

#### 4. Justificativa

Tendo em vista que ainda não existem sistemas de genética reversa disponíveis para nenhuma espécie do gênero *Tospovirus*, o campo permanece em aberto para estudo e nosso grupo de pesquisas visa estar na vanguarda do tópico. Os sistemas de genética reversa são excelentes ferramentas moleculares para estudo e manipulação dos genomas virais, podendo ser considerados verdadeiros divisores de águas em termos quantitativos e qualitativos dos artigos científicos publicados e na geração de conhecimentos construídos a partir do estabelecimento dessas estratégias, como ocorrido com os gêneros *Orthobunyavirus* e *Influenza*, por exemplo. A aplicação de DI-RNAs como mini-genomas introduzidos de modo exógeno e rastreável por meio da expressão de genes repórter para a genética reversa de tospovírus representa uma abordagem única nunca antes provada por outros grupos de pesquisa, que preferem trabalhar com o segmento genômico S RNA, geralmente. A escolha dos DI-RNAs e o maior conhecimento gerado a partir de sua aplicação na genética reversa abre, inclusive, a possibilidade de utilizá-los para defesa contra o próprio vírus. O estudo das características interferentes dos DI-RNAs é essencial para o desenho racional de estratégias de defesa vegetal por meio de transgenia baseada não apenas na ativação da maquinaria de RNAi, como na presença de uma molécula competidora que é ativamente replicada pelo vírus, e portanto, pode ser funcional mesmo após a superação das barreiras iniciais de defesa do hospedeiro pela proteína NSs. Portanto, o estudo da dinâmica de geração dessas moléculas interferentes, e de possíveis outras moléculas mutantes do genoma viral e seus respectivos papéis na relicação e estabelecimento do processo de infecção dos tospovirus em diferentes hospedeiros é extremamente relevante.

## 5. Objetivos Gerais

- Construir um sistema de genética reversa para tospovírus baseado na replicação de DI-RNAs exogenamente introduzidos
- Construir um sistema de genética reversa para tospovírus baseado na transcomplementação de um segmento S WT no contexto de uma infecção por vírus TSWV mutante deficiente na produção da proteína NSs
- Construir um sistema de genética reversa para tospovírus baseado em atividade de genes-repórter em um sistema de mini-replicon e de resgate de infecção viral
- Estudar a dinâmica populacional entre DI-RNAs e os RNAs genômicos virais
- Registrar e quantificar a expressão gênica no curso temporal da infecção
- Caracterizar a montagem e funcionamento do complexo de replicação/transcrição viral, determinando elementos molecular *in cis* e *in trans* mínimos necessários

## 6. Capítulo 1: Host-specific accumulation and temperature effects on the generation of dimeric viral RNA species derived from the S RNA of members of the *Tospovirus* genus

### Introdução

Neste capítulo é apresentado o manuscrito em inglês do trabalho submetido ao periódico internacional *Journal of Virology* (JVi) e posteriormente enviado ao periódico *Journal of General Virology*, (fator de impacto 2014 de 3,183 e índice A2 na avaliação Qualis da CAPES de 2014) da Sociedade Inglesa de Microbiologia Geral (SGM, sigla em inglês). Este trabalho apresenta novidades importantes para o campo de conhecimento da virologia vegetal e contribui para o conhecimento da família *Bunyaviridae* nos seguintes aspectos: i) apresenta pela primeira vez para qualquer vírus de planta, de acordo com a literatura, a ocorrência de espécies de RNA de natureza dimérica derivados de um segmento genômico. Como escrito na discussão desse manuscrito, dímeros de defectivos interferentes e de vírus-satélites (virusóides) são comuns e já foram estudados em profundidade para *Turnip crinkle virus* e *Cucumber necrosis virus*, no entanto, nada se conhecia de verdadeiros dímeros para vírus vegetais de (-)ssRNA com genomas monopartidos ou segmentados; ii) confirma trabalhos prévios realizados na década de 1990 que demonstraram a existência de dímeros do segmento S RNA para *Bunyamwera virus* e *Rift Valley fever virus* em infecções *in vitro* de linhagens celulares de mamíferos, mas, diferentemente desses trabalhos, demonstra o surgimento de dímeros do segmento S RNA de *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) *in planta*, isto é, em condições fisiológicas organismais; iii) demonstra que *in planta* a acumulação de dímeros do segmento S RNA é hospedeiro-dependente e restrita a três espécies do gênero *Nicotiana* (*N. benthamiana*, *N. clevelandii* e *N. occidentalis*), sendo um fenômeno muito mais eficiente em termos da acumulação dessas espécies virais diméricas em *N. benthamiana* do que nas outras duas espécies hospedeiras; iv) sugere que a ocorrência de formas diméricas durante a replicação viral seja dependente de defeitos da maquinaria celular de RNAi.

A numeração das figuras e tabelas segue a numeração da tese. No entanto, dentro das figuras é possível ver a numeração original do manuscrito.

### **Objetivos Específicos**

- Caracterizar em termos de sequência, estrutura biológica, especificidade de hospedeiro e dinâmica de acumulação as espécies virais diméricas associadas ao segmento S RNA de *Polygonum ringspot virus*
- Investigar se outras espécies do gênero *Tospovirus* também produzem dímeros do segmento S RNA

**Host-specific accumulation and temperature effects on the generation of dimeric viral RNA species derived from the S RNA of members of the *Tospovirus* genus**

**André Bertran,<sup>a,b</sup> Marina Ciuffo<sup>a</sup>, Paolo Margaria,<sup>c</sup> Cristina Rosa,<sup>c</sup> Renato Oliveira Resende,<sup>a,b</sup> Massimo Turina<sup>a#</sup>**

Institute for Sustainable Plant Protection, CNR, Turin, Piemonte, Italy<sup>a</sup>; Plant Virology Laboratory, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brazil<sup>b</sup>; Department of Plant Pathology and Environmental Microbiology, Pennsylvania State University, University Park, PA, USA<sup>c</sup>

Running title: Discovery of dimer-like S RNAs for *Tospovirus*

#Corresponding Author, Massimo Turina, massimo.turina@ipsp.cnr.it



M.C. and A.B. contributed equally to this work.

## **Abstract**

*Polygonum ringspot virus* (PolRSV) is a recently characterized tospovirus found in Italy. Northern blot analyses of PolRSV infections in *Nicotiana benthamiana* (NB) and tomato showed that a viral RNA species with nearly twice the size of the genomic S RNA accumulated abundantly in the former, but was not detected in the latter. Additional assays confirmed that biogenesis of this novel RNA species was common to all PolRSV isolates tested and also to an isolate of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Given its size, we hypothesized that the novel RNA species was a dimer molecule. Putative dimer systemic accumulation in host plants was restricted to NB and other two *Nicotiana* species. Furthermore, through RT-qPCR we showed that dimers were not present in infected thrips, but occurred in NB after the first mechanical passage. RNAseq analysis and RT-PCR of putative predicted dimer junction sites of NB challenged with PolRSV isolates Plg6 and Plg13/2 confirmed the characteristics of dimeric S-RNAs. They are head to tail imperfect (containing deletions) dimers (ID-RNAs). We also show that ID-RNAs were modulated by temperature and that ID-RNA generation occurred in late stages of systemic infection (10-12dpi) in NB. Differently from all other PolRSV isolates used in this study, Plg13/2 generated more ID-RNAs coupled with very low amounts of genomic S RNA and maintained them even at 18°C, besides having lost the ability to infect tomato. This is the first demonstration of S RNA dimers for *Tospovirus*, and of occurrence of dimers at the organismal level for *Bunyaviridae*.

*Keywords:* *Tospovirus*, defective replication intermediates, *Dictyothrips betae*, *Polygonum convolvulus*, *Bunyaviridae*, *Nicotiana benthamiana*

## INTRODUCTION

The genus *Tospovirus* together with *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Phlebovirus* and *Nairovirus* is part of the family *Bunyaviridae* (Plyusnin et al., 2011), but is the only member that infects plant hosts. *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) is among the last tospovirus species officially accepted by ICTV and is the first tospovirus species originally found not on vegetables or ornamental crops, but on common weeds (buckwheats, *Polygonum convolvulus* and *Polygonum dumetorum*), which could potentially provide different perspectives on the phylogeny and evolution of the genus given these host plant habitats (natural ecosystems vs agronomical) and worldwide presence (Ciuffo et al., 2008). Although only *P. convolvulus* and *P. dumetorum* were found as natural hosts for PolRSV, the experimental viral host range by mechanical inoculation is wide and includes solanaceous plants such as tomato and pepper (Ciuffo et al., 2008).

The virus was found in five different sites comprising both Piedmont and Lazio regions (North-western and Central Italy) (Ciuffo et al., 2008). However, the virus may not be a threat to commercial crops because of high vector specificity: PolRSV natural vector is the thrips species *Dictyothrips betae*, which is ecologically restricted in nature (feeding and life cycle) to species of the genus *Polygonum* (Ciuffo et al., 2010).

PolRSV full-length genome sequence was recently obtained by completion of the M and L RNA segment sequences (Margaria et al., 2014b). Phylogenetically, PolRSV clusters with *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Tomato yellow ring virus* (TYRV) and a newly characterized tospovirus from China isolated from *Hippeastrum sp.* (Dong et al., 2013, Xu et al., 2013, Xu et al., 2014) in a well-supported “old-world” (Eurasian) virus clade (Hassani-Mehraban et al., 2007), but in a diverging branch from the main branch in the clade where species polarize around *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV). Also recently, the small RNA (sRNA) profiles of *N. benthamiana* and *S. lycopersicum* infected with PolRSV have been investigated by a Next Generation Sequencing (NGS) approach revealing that sRNAs were more

abundant for the S RNA in infected *N. benthamiana* than infected *S. lycopersicum*, with preferential ORF targeting for the NSs gene (Margaria et al., 2016).

Unlike any other tospovirus presently known, PolRSV isolates so far sequenced have a small intergenic region (IGR) between the two ORFs in the S segment, containing only 123 bases (nt 1405 - 1587), with the notable absence of the A-U rich complementary regions, which are typically associated with the formation of conserved hairpin secondary structures with a role in viral gene expression regulation (Geerts-Dimitriadou et al., 2012). Some species in the genera *Phlebovirus* and *Tenuivirus* also have ambisense strategies for the S and M segments, respectively, and, as is the case for PolRSV, have small IGRs that cannot form a stable hairpin secondary structure (Giorgi et al., 1991, Nguyen and Haenni, 2003). Due to its diverse IGR composition, PolRSV is an interesting candidate for comparative studies of gene expression for the S RNA segment, possibly capable of providing insights into the roles of the IGR and, especially, the A-U rich region in gene regulation.

Defective-interfering RNAs (DI-RNAs) are replicative elements derived from the viral genome that are known to have influence in the course of the viral infection (Simon et al., 2004, Pathak and Nagy, 2009). In most cases, DI-RNAs are generated in conditions of high multiplicity of infection (M.O.I.) and sequential inoculations on the same host and are usually not detectable in field isolates of plant viruses, though at least for one plant virus, they were shown to spontaneously arise after a single mechanical passage (*Tomato bushy stunt virus*) (Law and Morris, 1994). Most of the DI-RNA studies so far have found that DI-RNA presence in the inoculum negatively influences virulence and virus replication levels leading to recovery in whole-organism assays e.g., (Scholthof et al., 1995) and protection from super-infection in several *in vitro* cell culture assays e.g., (Billecocq et al., 1996). In particular cases, the presence of DI-RNAs was shown to have a positive effect on virulence or to have no perceptible effect on the outcome of a viral infection (Simon et al., 2004). Defective (interfering or non-interfering) RNAs are likely generated by RNA-RNA recombination via a copy choice mechanism (Sztuba-Solinska et al., 2011). In fungi,

generation of DI from the virus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) requires specific dicer and argonaute components (Zhang and Nuss, 2008). Usually, DI-RNAs are smaller than the WT genomes from which they derive being the product of a single deletion or multiple deletions or even of chimeras of rearranged genomic fragments (Marriott and Dimmock, 2010). The size of DI-RNAs in comparison to other genomic RNAs is considered one of the main reasons for the interference effect associated to such molecules: in a scenario of viral RNA substrates competing for the viral polymerase, the smaller genomic-like DI-RNAs would increase in frequency in the total viral population at higher rates than the actual WT genomic RNAs. This “competition hypothesis” has been carefully tested and validated for *Influenza A* and *Vesicular stomatitis virus* (McLain et al., 1988, Thompson and Yin, 2010), for example.

Defective particles and RNAs have been studied since the late 1970’s for the family *Bunyaviridae*. Typically, DI-RNAs of bunyaviruses are derived from the L RNA and are the product of a single large deletion (from 30 to 70% of the L RNA length is lost, approximately) (Resende et al., 1992, Patel and Elliott, 1992); DI-RNAs are also associated with attenuation of the symptoms of tospovirus infection in plants (Resende et al., 1991). In addition, canonical DI-RNAs are co-encapsidated with the viral genomic RNAs and propagated through the enveloped virions. Inside virions, DI-RNAs can be found at higher ratios than the other viral genomic RNAs packaged (Steinecke et al., 1998). Some exceptions to canonical DI-RNAs for the *Bunyaviridae* family have been found: for *Toscana virus* (ToV, genus *Phlebovirus*) some of the DI-RNA species generated during serial infections of Vero cells had more than one deletion and some degree of chimeric rearrangement between fragments (Marchi et al., 1998). Also, uncharacterized RNAs bigger in size than the WT genomic RNAs from which they derived were observed for *Bunyamwera virus* (BUNV, genus *Orthobunyavirus*) for the S RNA (Scallan and Elliott, 1992), and for *Rift Valley fever virus* (RVFV, genus *Phlebovirus*) for the L and S RNAs (Billecocq et al., 1996) after serial passaging in C6/36 and Vero cells, respectively, but the specific molecular nature of these RNA species was never studied in detail.

In this paper it is shown that during molecular characterization studies of *Polygonum ringspot virus*, northern blot analysis revealed that a band with approximately twice the size of the genomic S RNA was abundantly and specifically detected in *Nicotiana benthamiana* infected with this virus, while being completely absent in infected tomato samples. Here, we present the first characterization of this unexpected RNA species and study its biogenesis. It is also shown that accumulation of this novel type of dimer-like S-RNA is not restricted to PolRSV: it is also found for an Italian isolate of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) infecting *N. benthamiana* (TSWV-p105), but not for the more closely-related *Iris yellow spot virus* IYSV. Based on its molecular characterization we propose the name imperfect dimer RNA (ID-RNA) for this novel RNA species, and speculate about its origin, in light of virus-host interactions, and about its possible biological function in viral infection.

## **MATERIAL AND METHODS**

### Source and maintenance of virus isolates and host range experiment.

PolRSV field isolates from *Polygonum dumetorum* (Plg9 and Plg14 from Piedmont) were collected and mechanically inoculated onto *N. benthamiana* by leaf homogenization in inoculation buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7, containing 1mM Na-EDTA, 5mM Na-DIECA and 5mM Na - thioglycolate). Liquid nitrogen-stored, infected *N. benthamiana* plant material was used as starting inoculum for isolates Plg3 and Plg6, previously described (Ciuffo et al., 2008). Isolate Plg13/2 was derived from mechanically passaged isolate Plg13 described previously (Margaria et al., 2014b, Margaria et al., 2016) at 30° C, where it lost the ability to infect *Solanum lycopersicum*. TSWV isolates p105, p105RBMar and p105-803RB were described previously (Margaria et al., 2007, Margaria et al., 2014a). The IYSV isolate (Cip3) used in this work was part of the PLAVIT collection, stored in liquid nitrogen. Temperature experiments were carried out in growth chambers at constant 18°, 25° or 30°C (+/- 2°C), with a 14h/10h light/dark cycle. Isolates Plg6 and Plg13/2 from

greenhouse-maintained *N. benthamiana* were used for a host range experiment at 24° C that included a small number of solanaceous species, and *Gomphrena globosa*.

#### Nucleocapsid purification and RNA extraction

Systemically infected *N. benthamiana* plants of isolate Plg13/2 and Plg6 were harvested two weeks post inoculation and processed for nucleocapsid purification as described previously (Ciuffo et al., 2008). One hundred µl aliquots from ground and cheesecloth-filtered plant homogenate and from the purified nucleocapsid preparation were used for RNA extraction using Spectrum™ Total RNA Plant Kit (Sigma). Northern blot analysis to verify dimer to genomic S RNA ratios, before and after nucleocapsid purification was carried out according to methodology detailed in paragraphs below.

#### RNase R assay

In order to check the possible existence of circular forms of viral RNA, we performed RNase R digestion (Epicentre) of total RNA of both Plg6- and Plg13/2-infected *N. benthamiana* immediately after denaturing the RNA for 5 min at 70°C. We followed the manufacturer protocol using a total of 2.5 mg of RNA with or without enzyme, for each sample. Aliquots of each reaction were collected 10 min and 30 min after adding the enzymes. In order to exclude the possibility of non-specific RNase activity, we repeated the assay with reducing the amount of enzyme to 1/5<sup>th</sup> of what was suggested by the manufacturer based on declared activity.

#### RNA extraction, cloning and sequencing of cDNA fragments

Total RNA was extracted from infected leaves using Spectrum Total RNA Plant Kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Amplicons made

with specific primers designed based on consensus S segment sequences were used to obtain clones spanning the IGR region, and across the putative dimer junction using the combination of oligonucleotides displayed in Table 3. Reverse transcription was carried out with Thermoscript RT-PCR System (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions using random hexamers. The list of primers used to generate cDNA to be used for Riboprobe synthesis is shown in Table 3. Selected PCR fragments were purified (Qiagen), cloned in pGEM-T easy vector (Promega) and sequenced.

**Table 3.** Primers used for fragment cloning and probe synthesis of *Polygonum ringspot virus* (PoIRSV) small, medium and large genome segments and for RT-qPCR detection of Imperfect Dimer RNAs.

Primer name	Primer sequence	Use
Plg-L-8056F	5'-ATTAGCTTCGCTCTAGATGCAGCATTT-3'	L RNA probe synthesis
Plg-L-8673-Rev	5'-AGACATGAAGGCCACTTATTACCAAAGCA -3'	
PlgS-2176-Rev	5'- CCCTAGCTCCACTTCAAGTCCTGG-3'	S RNA/N mRNA probe synthesis
PlgS-1337F	5'-ATTCAGCTGCTCCACCTTGCTGG-3'	
PlgS-1400R	5'- CTGGA CTTCCTCCACAGTGAAGTGG-3'	S RNA/NSs mRNA probe synthesis
PlgS-706F	5'-AACAGGCTTTTGTCTGCTGGCACT-3'	
PlgM-3840R	5'- GGACAAATCCAGTTTGATAAGCAAAGT-3'	M RNA/GP probe synthesis
PlgM-3137F	5'- AACTGGTCAAACATGCGGAAGAT-3'	
Plg-1375-F	5'-TGGAAGGAGCACAGAGGACT-3'	Amplification IGR
Plg-1801-R	5'-GGAGTTCACCTTCACTGGGG-3'	
PlgS-695-R	5'-AAGCCTGTTTGTAGGCAC -3'	Amplification dimer junction
PlgS-661F	5'-GCTTCAAGGGCCTTGATCTGCTC-3'	Amplification dimer junction
PlgS-324R	5'-AATCTGTTGAAGACATCATAATT-3'	Amplification dimer junction
PlgS-1930 F	5'-CAGGCTTGCCATCAGAG-3'	Amplification dimer junction
PlgS-2123-F	5'-TCCAGCCTTCTGAAAGTCCAG-3'	Amplification dimer junction
genRealF	5'-TCTCAGCCATGTCTACCGTCAAG-3'	
genRealR	5'-AGCAGTCATTACTCGAGCGAGAA -3'	RT-qPCR PoIRSV S segment
probeGen	5'-6FAM-TGACTTTTTCTCAACTACGGCATCTCCA-TAMRA -3'	
S-2448-F	5'- AAGCAGCTTACTGAGTGAAGTTGTT -3'	
S-363-Rev	5'-TCTTGACAGTAATCTCCAGAAAATGGT-3'	RT-qPCR S Dimer Junction
ProbeDimerPlg3	5'-VIC-CCTCGATTGCTCTCTTGGTCTGGACATAAA-TAMRA -3'	
TSWV-2797-For	5'-ATGCTTTGACCGTATGTAAGTCT-3'	Amplification dimer junction TSWV
TSWV-409-Rev	5'-AGCATTGACTGTATTTGAGCAAACAGA-3'	
TSWV-490-For	5'-GATATTACGGATCGATTCCA-3'	
TSWV-760-Rev	5'-TGACATGAGCAGAGATTTCA-3'	S RNA/NSs mRNA probe synthesis

Plasmid DNA was digested with *Eco53kI* to generate radioactive riboprobes by *in-vitro* transcription using the MAXI-Script kit (Ambion). Clones spanning the IGR region for Plg3, Plg6 and Plg13/2 were obtained using oligonucleotides Plg-1375F and Plg-1801Rev and used to confirm the *in silico* assembly data from the RNAseq experiment.

### Northern blot analysis

Total RNA from virus-infected plants or purified PolRSV nucleocapsids were separated under denaturing conditions in 1% agarose gels containing glyoxal/dimethyl sulfoxide (DMSO) as detailed in (Sambrook, 2001), using HEPES buffer (20mM HEPES, 1 mM EDTA pH 7) instead of sodium phosphate buffer. RNAs from the gel were transferred to nylon membranes (Immobilon-Ny<sup>+</sup>, Merck Biochemicals). Northern blot hybridization and detection were performed following protocols previously described (Rossi et al., 2015). Radioactively labelled RNA probes using <sup>32</sup>P dUTP in both orientations were obtained using the Maxiscript SP6/T7 kit (Ambion) from two plasmids (pGEM-T easy vector, Promega) containing respectively a fragment of the NSs (clone#21 using oligonucleotides PlgS-706F and PlgS-1400R) and one of the N (clone #4 using PlgS-2176-Rev and PlgS-1337F) coding regions. A fragment of the glycoprotein precursor coding region (clone #19 PlgM-3840R PlgM-3137F) and another from the 3' end of the genomic sense of the L segment (clone #A1 obtained using oligo Plg-L-8056F and Plg-L-8673-Rev) were used for specific M and L RNA detection. Northern blot for IYSV was carried out using a clone corresponding to the full-length N gene described (Cip3) obtained with oligonucleotides described previously (Tomassoli et al., 2009). For the NSs gene of TSWV we used a clone spanning the region between nucleotide positions 490 and 760 of the NSs gene of isolate p105 (clone p105NSs#6).

### RNAseq of plant samples, genome assembly and bioinformatics analysis



Total RNA extracted from virus-infected plants (Plg6 and Plg13/2 infected *N. benthamiana*) was assayed by northern blots, and 10 and 20µg of RNA for each sample respectively, were sent to BMR Genomics s.r.l. (Padova, Italy) for construction of the libraries. The Ribo-Zero™ Plant Leaf Kit (Epicentre) was used to remove ribosomal RNA (rRNA). The rRNA-depleted total RNA was then used to generate paired-end libraries with the Illumina TruSeq Stranded Total RNA Library Prep kit (Illumina Inc.). Sequencing was performed on an Illumina NextSeq 500 platform.

Prior to assembly and mapping, adapters were filtered out by Trimmomatic version 0.32 (Bolger et al., 2014) and read quality was checked using the FastQC suite (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). The complete genomic sequences of isolates Plg13/2 and Plg6 were assembled using Trinity version 2.06 (Grabherr et al., 2011), and used as reference viral genomes for further analysis. Reads were mapped against the host genome (*N. benthamiana* genome version 0.5) (Fernandez-Pozo et al., 2015) and transcriptome (*N. benthamiana* transcriptome version 5) (Fernandez-Pozo et al., 2015), or against the viral genomes using butter version 0.3.3 (Axtell, 2013), allowing 1 mismatch. Reads mapping only a single fragment of the corresponding viral genomic segment or recombinant reads (i.e., reads composed of at least two fragments mapping distant regions of the same genomic segment) were identified using Blastn (Johnson et al., 2008) set at an e-value of 1E-07, which in preliminary analyses provided optimal stringency. The subset of recombinant reads was extracted using in-house perl scripts and further analyzed by alignment against the corresponding viral genomic segment sequence using bowtie2 version 2.2.4 (Langmead and Salzberg, 2012). Output BAM format files were visualized in IGV version 2.3.63 (Robinson et al., 2011, Thorvaldsdottir et al., 2013), to inspect the distribution of the recombinant reads along the genomic segments. Depth of coverage values along the genomic segments were exported using IGVTools version 2.3.66 and imaged using Microsoft Excel ® v. 10. Robustness of the results for the most abundant recombination events was further assessed by alignment of the reads against simulated recombinant reference sequences,

spanning the region before and after the predicted recombination event junction (200nt on each side), to ensure that recombinant reads were covering each predicted recombinant site. Exact position of the recombination events along the genomic segments was further confirmed using ViReMa version 0.6 (Routh and Johnson, 2014), set at a seed length of 25 and considering as input only de-duplicated multi-mapping reads. Using this approach, all detected recombination events were described by unique reads, meaning that highly populated recombination events were identified by multiple unique reads. Recombination events were further considered only if supported by at least 10 non-identical reads.

Results from RNAseq analysis were confirmed through RT-PCR using primer pairs designed across the predicted putative dimer junction (Table 3). For isolate Plg3 and TSWV-p105, we used primer pairs across the putative junction sufficiently distant to include possible deletions (Table 3).

## RESULTS

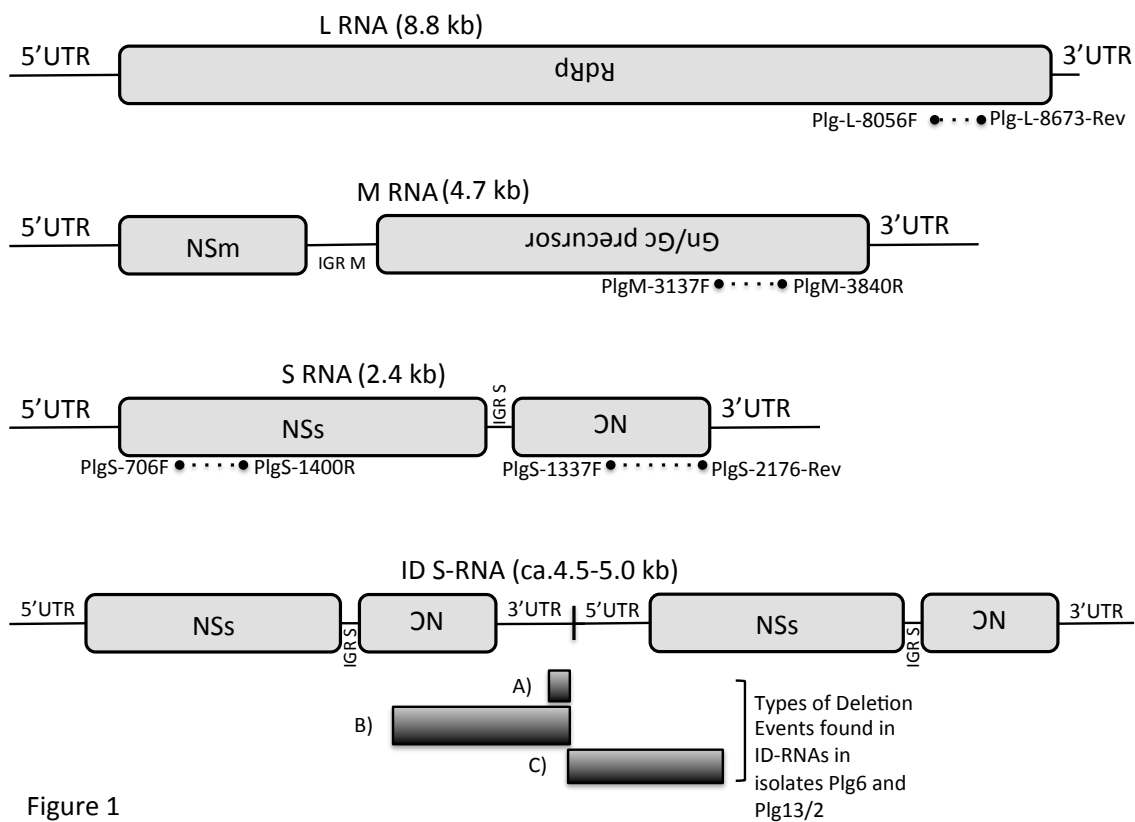
### A previously unreported S RNA-related viral RNA species accumulates during PolRSV infection in *N. benthamiana*

In order to investigate PolRSV gene expression we developed specific RT-PCR primers to amplify, clone and generate riboprobes from fragments of the N, NSs and glycoprotein precursor mRNAs, and for a terminal portion of the L RNA, based on PolRSV complete nucleotide sequence (Margaria et al., 2014b)(Table 3 and Fig. 7).

Northern blot analysis of the S RNA profile of isolates Plg6 and Plg13/2 from systemically infected *N. benthamiana* leaves showed specific and intense detection of sub-genomic viral mRNAs and of the genomic S RNA, though for isolate Plg13/2 genomic S RNA intensity was visually much lower than the one of isolate Plg6 (Fig. 8). Surprisingly, in addition to these two RNA species, a third one, bigger than the genomic S RNA, was strongly and specifically detected for both isolates in *N. benthamiana* samples, being completely absent from *S. lycopersicum* systemically

infected with isolate Plg6 (Fig. 8). Isolate Plg13/2 was not able to systemically infect *S. lycopersicum*.

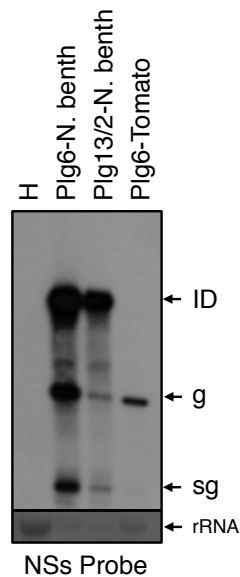
Estimates of the novel S RNA-associated RNA species size based on electrophoretic patterns indicated that this unexpected RNA molecule was approximately twice the size of the genomic S RNA, in comparison to an RNA ladder marker (Fig. 9A) and to the electrophoretic migration profile of the genomic M RNA (Fig. 9B). Both estimates led to the conclusion that the novel RNA species was approximately 4.5-5 kbp in size. When northern blots were made with total RNA extracted from purified nucleocapsids instead of systemically infected *N. benthamiana* tissue, the novel S RNA-associated molecule was also present (Fig. 10).



**Figure 7. Schematic representation of the viral RNA species of *Polygonum ringspot virus* (PoIRSV).** Primers and the regions used for RNA probe design are marked by dashed lines. Scheme is illustrative of feature positions, but not represented to scale. Text written upside-down represents viral open reading frames codified by the complementary strand to the viral

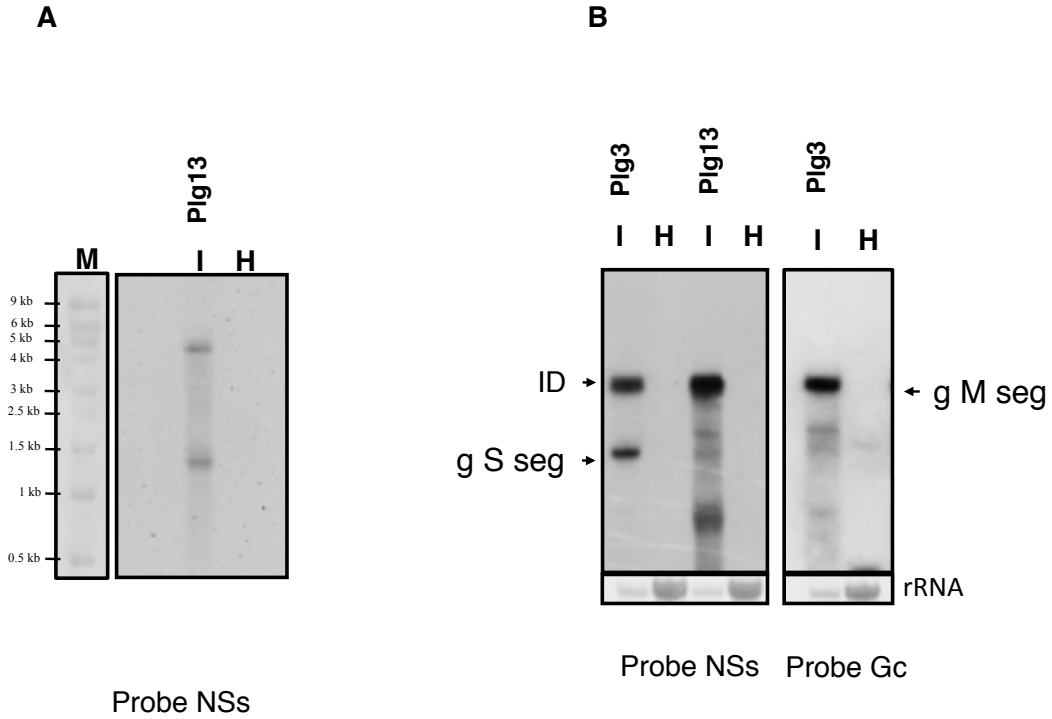
strand presented in the scheme. UTR – Untranslatable region; IGR M– Intergenic region of the M RNA; IGR S – Intergenic region of the S RNA; ID-RNA – Imperfect Dimer S RNA molecules. The rectangles labelled A, B and C represent the deletions found in Plg13/2 and Plg6 across the junction dimer region.

Taken together, these results point at the possible occurrence of an S RNA-associated, dimer-like molecule of viral origin instead of an artefact of cross-hybridization. From here on, the dimer-like version of the S RNA is referred to as imperfect dimer RNA (ID-RNA).

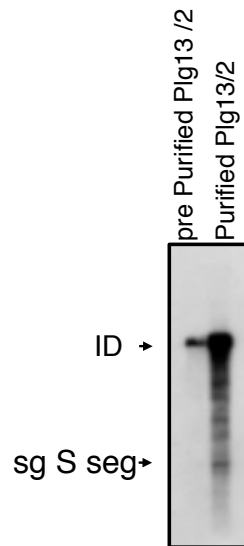


**Figure 8. Detection of a novel S RNA-associated viral RNA species for isolates Plg6 and Plg13/2 of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) in *Nicotiana benthamiana*.** Northern blots were performed with total RNA from systemically infected *N. benthamiana* and tomato leaves (10dpi) using radioactive riboprobes for the NSs mRNA. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. ID – novel RNA species associated to the S RNA; g – genomic size S RNA species; sg – sub-genomic size NSs mRNAs. H – healthy *N. benthamiana*. Bottom panel, ribosomal RNA loading visualized by Methylene Blue staining.

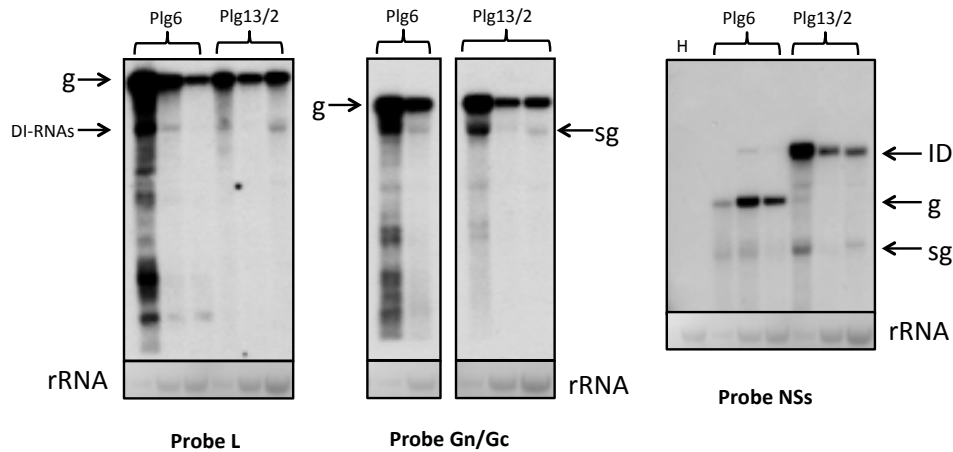
Analysis of northern blots for the M and L segments using specific riboprobes did not reveal the presence of any other novel RNA species. A relatively small amount of DI-RNAs derived from the L segment were present in leaves infected by isolates Plg6 and Plg13/2, but accumulated much less than the genomic L RNAs (Fig. 11).



**Figure 9. Size estimates of the novel S RNA-associated viral RNA species.** Detection of a novel RNA species related to the S RNA of isolates Plg3 and Plg13/2 of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV). A) Size estimate by comparison to an RNA ladder. B) Size estimate by comparison to the M RNA genomic segment. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. M - RNA Ladder Marker; I - Systemically infected *Nicotiana benthamiana* leaves (8dpi); H - healthy young *N. benthamiana* leaves; g - genomic size RNA species; sg - sub-genomic size RNA species; ID - novel RNA species associated to the S RNA. Bottom panel, ribosomal RNA loading visualized by Methylene Blue staining.



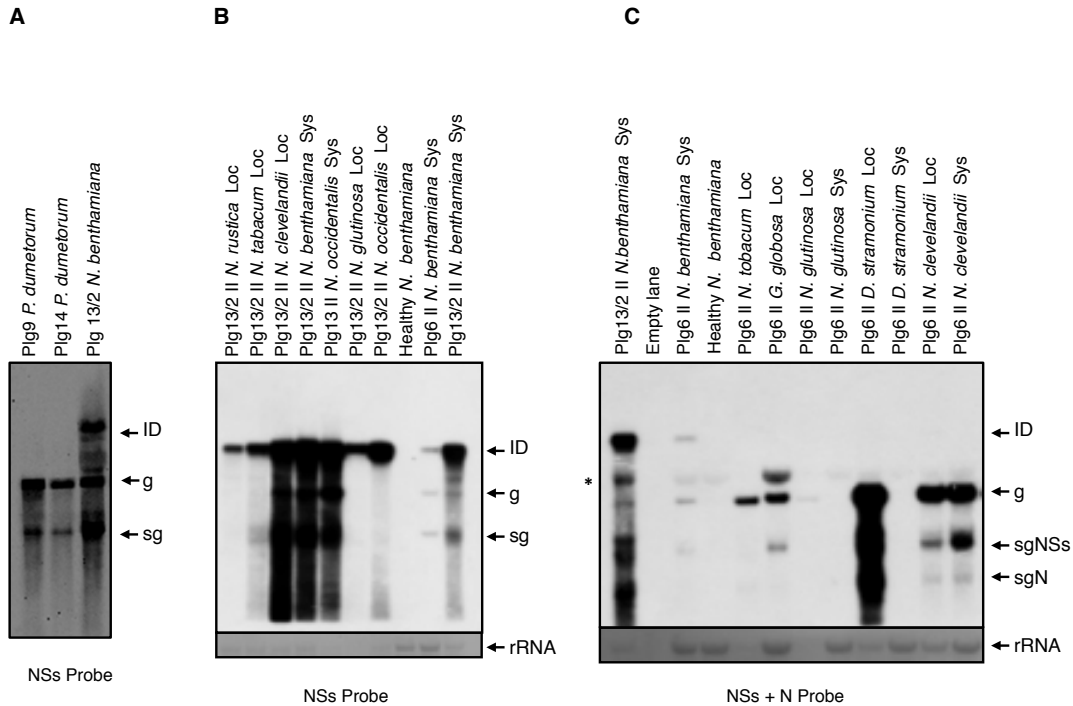
**Figure 10. Imperfect Dimer RNA (ID-RNA) is present in purified nucleocapsids.** *Nicotiana benthamiana* leaves infected with isolate Plg13/2 of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) were harvested 2 weeks after mechanical inoculation. RNA was extracted from the original homogenate (pre-purification) or from purified nucleocapsids. Arrows point to the ID RNA, and to the subgenomic NSs mRNA. In this specific sample, gRNA was not detectable.



**Figure 11.** Northern blots for the S, M and L RNAs of three biological replicates of *Polygonum ringspot virus* (PoIRSV) isolates Plg6/1 and Plg13/2 systemically infecting *Nicotiana benthamiana*. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. In the hybridization profiles of Plg6 and Plg13/2 for the M RNA (Probe Gn/Gc) instead of three biological replicates for isolate Plg6 only two are presented due to insufficient amount of total RNA left for the third replicate. g – genomic size RNA species; sg – sub-genomic size RNA species; ID – novel RNA species associated to the S RNA. Bottom panels, ribosomal RNA loading visualized by Methylene Blue staining.

### ID-RNAs are made by all PoIRSV isolates tested and their generation is host-specific

We next extended the northern blot analyses of the S-RNA made for isolates Plg6 and Plg13/2 to other plant hosts, and also included other available isolates of PoIRSV (the two field isolates Plg9 and Plg14). Plg6 and Plg13/2 were mechanically inoculated from their original hosts onto a small host range (shown in Fig. 12 and listed in the Material and Methods section). As shown in Fig. 12A, two field isolates of PoIRSV (isolates Plg9 and Plg14) in their original host (*P. dumetorum*) did not contain ID-RNAs. For isolate Plg13/2, the only hosts in which systemic infection developed were *N. benthamiana* and *N. occidentalis*, and for both the ID-RNAs accumulated abundantly in the systemically infected leaves, as well as in the locally inoculated leaves (Fig. 12A and 12B). Plg13/2 ID-RNAs were also intensely detected in local lesion leaves in a number of other hosts for which the viral infection did not become systemic (Fig. 12A).



**Figure 12. Host specificity for novel S-derived RNA species accumulation.** The probe used for each blot is specified at the bottom of the blot. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. An asterisk defines a cross reactivity with a ribosomal RNA band in panel C. In panel A field samples from *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) infected *Polygonum dumetorum* compared to infected *Nicotiana benthamiana*. In panel B and C PolRSV was mechanically inoculated from infected *N. benthamiana* to *Solanum lycopersicum*, *N. rustica*, *N. tabacum*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *Datura stramonium* and *Gomphrena globosa*. ID – novel S RNA-associated viral RNA species; g – genomic size S RNA molecules; sg – sub-genomic size NSs mRNA molecules. Bottom panels display ribosomal RNA loading visualized by Methylene Blue staining.

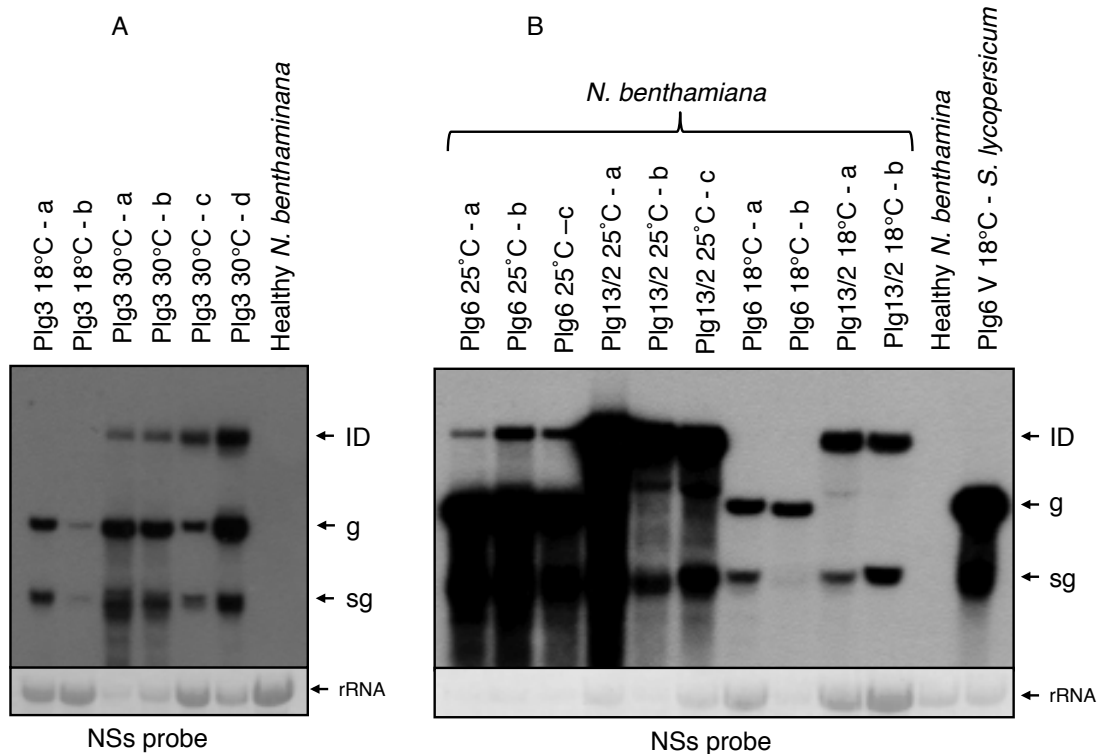
In contrast to Plg13/2, isolate Plg6 was able to systemically infect *S. lycopersicum* (Fig. 8), *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, and *N. occidentalis* (Fig. 12C), but the ID-RNA species was detected in systemic leaves only for *N. benthamiana* and *N. occidentalis*. It is noteworthy that low-intensity amounts of ID-RNAs were detected in locally infected leaves only for *N. occidentalis* and *N. clevelandii*, even though the virus was able to generate local lesions in several other hosts (Fig. 12C). A third isolate present in our collection (Plg3) behaved similarly to isolate Plg6, in terms of host range and accumulation in local and systemically infected leaves, (data not shown).

### Temperature modulates ID-RNA accumulation and persistence

It has been shown that low temperatures (i.e., 16°C) favour the accumulation of defective interfering molecules derived from the L RNA (Inoue-Nagata et al., 1997). For this reason, we decided to test what would be the effect of temperature on ID-RNA biogenesis and accumulation. First, we worked with isolate Plg3 from mechanically infected *N. benthamiana* plants kept at either 30°C or 18°C and assayed it for the presence and accumulation of the ID-RNAs. Northern blot hybridization assays showed that the plants kept at 30°C accumulated the ID-RNA species, whereas plants kept at 18°C showed no signs of ID-RNA presence or accumulation (Fig. 13A). We also tested if higher temperatures could stimulate ID-RNA formation in any species other than *N. benthamiana* by infecting *S. lycopersicum* with PolRSV isolate Plg3 at 30°C for at least two successive passages by mechanical inoculation. Our results indicated that even at higher temperatures, ID-RNA biogenesis was host-specific, there being no accumulation of ID-RNAs for *S. lycopersicum*, in contrast to *N. benthamiana* (Fig. 14).

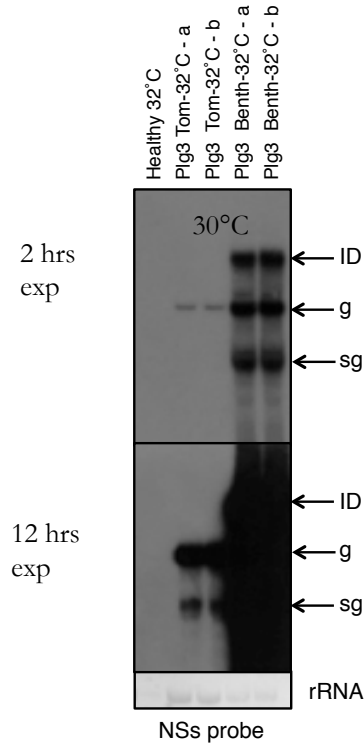
For isolate Plg6 and Plg13/2 we tested two different temperatures, 25°C and 18°C. Plg6 behaved similarly to Plg3, showing no accumulation of ID-RNAs at the lower temperature, whereas Plg13/2 maintained a high accumulation of ID-RNAs also at 18°C (although the overall level of infection was lower than that occurring at 25°C). Furthermore, it is worthy of mention that isolate Plg13/2 had undetectable levels of S segment genomic RNA, but maintained a relatively high amount of NSs sgRNA (Fig. 13B). The same did not happen to isolate Plg6, which only presented ID-RNAs at higher temperatures (25 and 30°C).



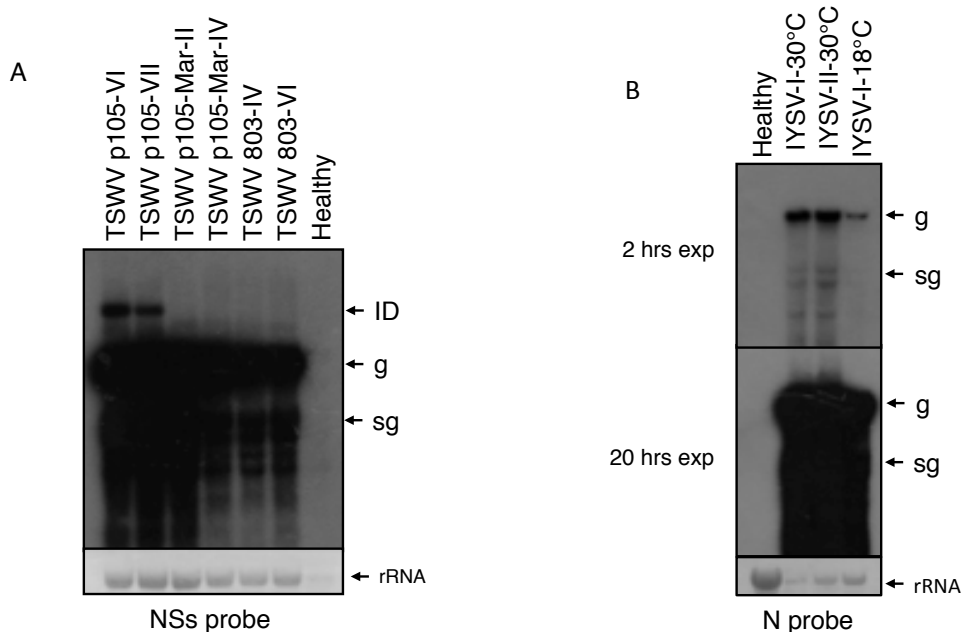


**Figure 13. Imperfect Dimer (ID) RNA biogenesis and dynamics are influenced by temperature.** A) *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolate Plg3 was passed from its original host to *Nicotiana benthamiana* plants kept at either 18°C or 30°C and systemically infected leaves were assayed for northern blot at 8dpi. B) PolRSV isolates Plg6 and Plg13/2 were serially passed in *N. benthamiana* at 25°C and 18°C in parallel. Systemically infected leaves of passages were assayed using riboprobes for the NSs mRNA. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. Sample labels in the figure show temperature in which plants were kept and replicates of each treatment (when applicable) as low case letters or roman numerals (e.g. a, b, V). ID – Imperfect Dimer S RNA-associated viral RNA species; g – genomic size S RNA molecules; sg – sub-genomic size NSs mRNA molecules. Bottom panels display ribosomal RNA loading visualized by Methylene Blue staining.

In addition, we tested if high temperatures could induce the formation of ID-RNAs for *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and IYSV in *N. benthamiana*. To our surprise, northern blot results showed accumulation of putative ID-RNAs for an Italian TSWV isolate (p105) at 30°C (data not shown) and even at 25°C after sequential passage by mechanical inoculation (Fig. 15A) but not for IYSV even when kept at 30°C and after long exposure of the radioactively probed membranes to X-ray films (Fig. 15B).



**Figure 14. Imperfect Dimer (ID) formation is host-specific even at higher temperatures.** Plants of tomato (Tom) and *Nicotiana benthamiana* (benth) were mechanically inoculated with *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolate Plg3 and kept for three successive passages at 30°C. Systemically infected leaves were assayed at 8dpi and probed with riboprobes derived from a fragment of the NSs mRNA. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. Sample labels in the figure show the host plant in which the virus was passaged (tom and benth), the temperature as numerals, and the replicates of each treatment (when applicable) as low case letters (e.g. a, b). ID – novel S RNA-associated viral RNA species; g – genomic size S RNA molecules; sg – sub-genomic size NSs mRNA molecules. Bottom panel is a Methylene blue stain of the membrane, representing ribosomal RNA loadings.

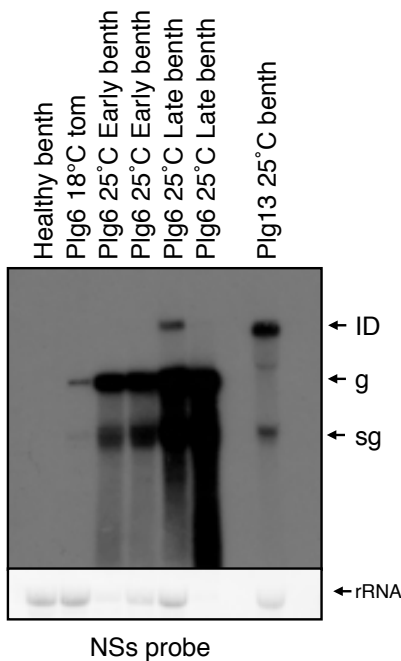


**Figure 15. Imperfect Dimer (ID) RNAs are generated by an Italian isolate (p105) of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) after serial passage but not by other two TSWV isolates (803 and p105RBMar) (A) and neither by *Iris yellow spot virus* (IYSV) kept at 30°C (B). Systemically infected leaves were assayed with riboprobes as specified beside the blots. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. Sample labels in the figure show the temperature as numerals and the number of serial passages as Roman numbers. ID – novel S RNA-associated viral RNA species; g – genomic size S RNA molecules; sg – sub-genomic size NSs and N mRNA molecules.**

### Generation of ID-RNAs from one single mechanical inoculation occurs after the initial establishment of virus infection

To further understand when the generation of the ID-RNAs takes place during the first mechanical passage of PolRSV to *N. benthamiana*, we inoculated isolate Plg6 coming from mechanically infected *S. lycopersicum* (therefore, with undetectable presence of ID-RNA in the inoculum) onto *N. benthamiana* leaves and assayed systemically infected leaves at the earliest moment of systemic infection (5 days post-inoculation) and at a very late phase of systemic infection (12 days post-inoculation). Total RNA from both time points was analysed by northern blot using specific probes derived from the NSs mRNA (Fig. 16). Only the samples of the late phase of the systemic infection presented ID-RNAs, whereas at the beginning of the systemic infection there was no sign of ID-RNA accumulation. The experiment was

performed twice and in both repetitions we could detect ID-RNAs in late systemic infection, though with distinct intensities among replicates.



**Figure 16. Imperfect dimer (ID) RNAs are generated at the late stages of systemic infection during the first passage of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolate Plg6 from tomato to *Nicotiana benthamiana*.** Samples were taken at two time points after infection for the northern blot: at the beginning of systemic infection (Early – 5dpi) and at a late phase of systemic infection (Late – 12dpi). Plg13/2 was used as positive control for ID-RNAs. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. Sample labels in the figure indicate the host plant (tom – tomato, benth – *N. benthamiana*), temperature as numerals and the number of serial passages as Roman numerals. ID – novel S RNA-associated viral RNA species; g – genomic size S RNA molecules; sg – sub-genomic size NSs mRNA molecules.

### ID-RNAs are not covalently closed (circular) viral RNA molecules

Dimers of viral genomes may arise by the same strategy that allows intense multiplication of viroids or of viruses that replicate by generating concatamers, i.e., templates that are, or become, covalently closed, circular molecules. In order to evaluate if this was the case for the ID-RNAs found in the infection of *N. benthamiana* by PolRSV, we performed an RNase R exoribonuclease assay for isolate Plg13/2 of PolRSV infecting *N. benthamiana* and used isolate Plg6 infecting tomato as a negative control for ID-RNA formation. As shown in Fig. 17, RNase R digested both Plg13/2 (displaying mostly ID-RNA and subgenomic viral RNAs) and Plg6 (displaying genomic and subgenomic viral RNAs), though with diverse efficiency.

The digestion reactions were sampled at 10 and 60 minutes after incubation for northern blot analysis. Results showed that at 10 minutes time point the ID molecules had already been completely degraded. For the WT S RNA of isolate Plg6 even after one hour of digestion there was still some detection of the genomic S RNA. Taken together, these results show that the imperfect dimer is more prone to RNase R digestion than the genomic S RNA, which is not circular in nature: this implies that the ID-RNAs are also not circular in nature.

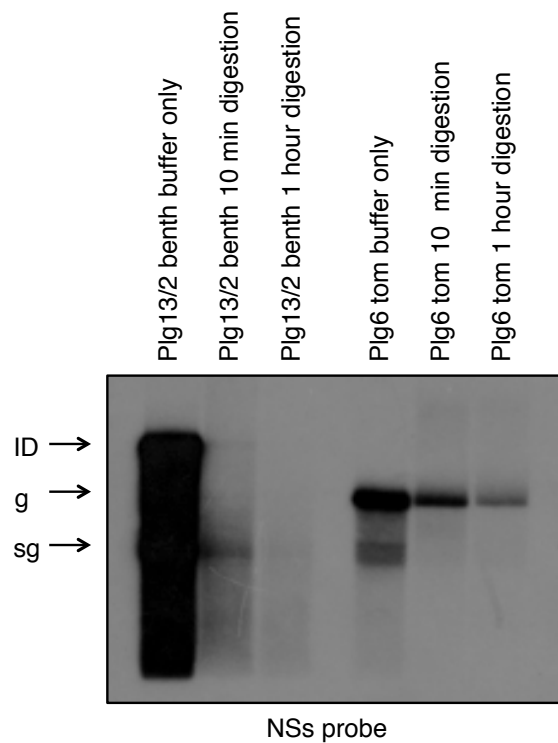


Figure 17. Imperfect dimer (ID) RNAs are not circular RNA species. RNase R assays were performed for isolates Plg13/2 (in *Nicotiana benthamiana*) and Plg6/1 (in tomato) of *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) for one hour. As a control, total RNAs from systemically infected leaves were incubated only with the reaction buffer. Digested total RNA samples were collected at 10 and 60 minutes from the beginning of the enzymatic reactions. Arrowheads indicate the positions of the viral RNA species of interest. Sample labels in the figure indicate the host plant (tom - tomato, benth - *N. benthamiana*, and the number of serial passages as Roman numbers. ID - novel S RNA-associated viral RNA species; g - genomic size S RNA molecules; sg - sub-genomic size NSs mRNA molecules.

A second experiment was performed with different concentrations of the RNase R in order to exclude the possibility that high concentrations of the enzyme could be active even on circular substrates. Also, a digestion assay was made with RNA extracted from Plg6 infected *N. benthamiana* kept at high temperatures, where

ID-RNA formation was greatly stimulated. Results for the digestion pattern and efficiency were similar to those seen for Plg13/2 (data not shown).

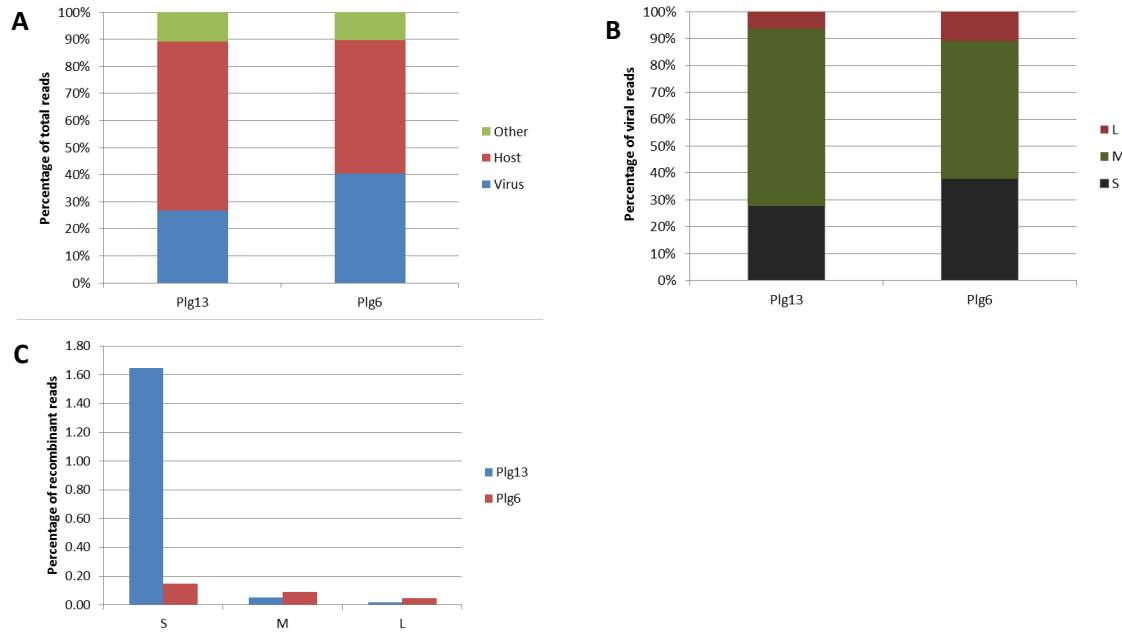
Molecular characterization of ID-RNA molecules through deep-sequencing analysis of ribosomal-RNA-depleted total RNA from PolRSV-infected *N. benthamiana*

RNAseq has been shown to be a very good approach to describe the complex of viral populations inside a sample, including the possibility to reveal recombination hotspots (Routh et al., 2012, Kutnjak et al., 2015). For this reason, we decided to perform an RNAseq analysis of PolRSV isolates Plg13/2 and Plg6 from systemically infected leaves of *N. benthamiana* kept at 25°C. Northern blot analysis of the RNA extracted from infected plants and used for RNAseq, showed the presence of a full length S segment and, on a much lower relative concentration, of ID-RNAs for isolate Plg6, while for Plg13/2 the ID-RNA species accumulated to higher abundance, both in relation to the full length S segment, and in comparison to isolate Plg6 (Fig. 11).

A total of 149,299,098 and 303,280,104 raw reads were generated for the Plg13/2 and Plg6 libraries, respectively (deposited in the NCBI SRA archive with the accession numbers SRS1181349 and SRS1181395, respectively). After adaptor removal and quality filtering 147,846,028 and 298,037,228 reads, respectively, were further considered. The tripartite genome sequences of both isolates were reconstructed and some minor differences were shown compared to a formerly full-genome sequenced isolate, Plg13 (from which Plg13/2 was derived) (Margarita et al., 2014b). The genomic segments of isolate Plg13/2 showed 99% identity with isolate Plg13. Specifically, the S and M segments showed a few nt mutations in the intergenic regions, while a 9 nt deletion was observed in the L segment coding region in position 7632-7640, compared to the reference. It's worth noticing that this deletion did not cause a frameshift, and with the exclusion of the 3 amino acid deletions the Plg13/2 RdRp showed 100% identity with the Plg13 RdRp. Isolate Plg6 showed 97%, 98% and 98% identity with the L, M and S genomic segments of

Plg13, respectively, and also carried the same 9 nt deletion in the L coding region, as isolate Plg13/2.

The relative percentage of reads mapping to the host genome/transcriptome or the viral genome showed the same trend in Plg13/2 and Plg6-infected *N. benthamiana*, with the highest percentage of reads aligning against the host genome/transcriptome, followed by the viral genome, and ~11% of unmapped reads (Fig. 18A). Allocation of reads against each of the viral genomic segments was consistent in the two samples, with the lowest percentage of reads aligning against the L segment, followed by the S and M segments, respectively (Fig. 18B). Prediction of recombinant reads showed that 1.6% of the reads mapping the S segment of isolate Plg13/2 were composed of recombinant fragments aligning to distant regions on the S segment, while the percentage of recombinant reads mapping the S segment of Plg6 was one order of magnitude lower (Figure 18C, Table 5). Recombinant reads from the M and L segments were below 0.1% in both isolates (Fig. 18C, Table 6). Given the much higher percentage of recombinant reads from the S segment, and their numerical correlation with ID-RNA abundance, we next analyzed in closer detail the nature of this specific subset of reads. Most of the recombinant reads from the S segment were composed of fragments mapping to distinct regions on the S segment, while the percentage of recombinant reads containing also fragments from the L/M segments or host sequences was minimal (data not shown).



**Figure 18.** Allocation of reads obtained by RNAseq analysis of ribosomal RNA-depleted total RNA from *Nicotiana benthamiana* leaves infected with *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolates Plg13/2 and Plg6. A) Percentage of total reads mapping to the host genome/transcriptome and to the viral reference genomes for sample Plg13/2 and Plg6. B) Percentage of the total reads mapping to the genomic segments of PolRSV isolates Plg13/2 and Plg6. C) Percentage of recombinant reads for each viral genomic segment.

**Table 5.** Summary of the alignment of S segment-derived recombinant reads, i.e. reads composed of at least two fragments mapping distant regions of the S segment, against M/L viral genomic segments or against host sequences

Category	Sample			
	Plg13		Plg6	
	Number of reads	Percentage	Percentage	
Recombinant S reads mapping only S segment	148.138	99,93	73.043	99,77
Recombinant S reads mapping in part M segment	28	0,02	48	0,07
Recombinant S reads mappig in part L segment	6	0,00	10	0,01
Recombinant S reads mappig in part host sequences	77	0,05	107	0,15

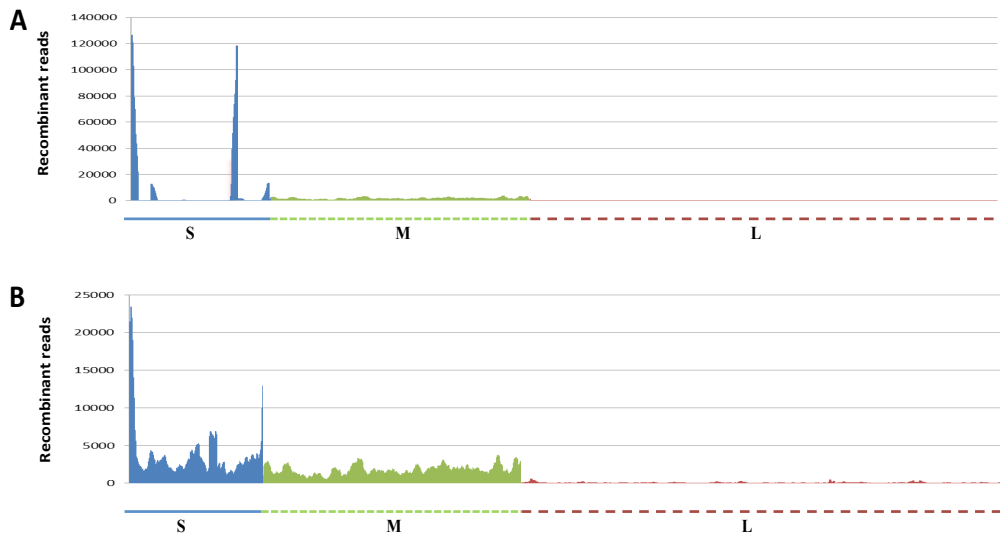
Alignment of the recombinant reads against the corresponding S RNA reference sequence showed the presence of four major peaks in sample Plg13/2 in position 1-150, 355-500, 1850-1911, and 2300-2476 (Fig. 19A), and two major peaks in sample Plg6 in position 1-150 and 2300-2475 (Fig. 19B). In the case of the M and L segments, recombinant reads were uniformly distributed along the genomic segments (Fig. 19A). To assess which peaks on the S segments were originated from a single sub-population of recombinant reads, three subsets of reads (extracted from the total reads based on mapping position, i.e. position 1-150nt and 355-500nt in



sample Plg13/2, and position 1-150nt in sample Plg6), were aligned against the corresponding reference genome.

**Table 6.** Summary of the alignment of reads against the viral genomic segments

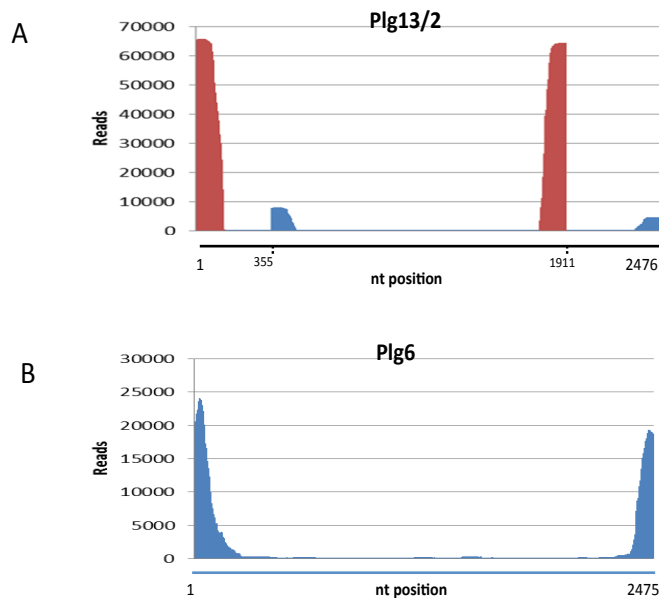
Category	Sample			
	Plg13		Plg6	
	Number of reads	% of reads	Number of reads	% of reads
Quality-filtered reads	147.846.028		298.037.228	
Viral reads mapping against S segment	9.008.822		49.347.866	
Reads composed of only 1 fragment from the S segment	8.860.573	98,35	49.274.658	99,85
Recombinant reads composed of at least 2 fragments from the S segment	148.249	1,67	73.208	0,15
Viral reads mapping against M segment	21.312.637		66.430.372	
Reads composed of only 1 fragment from the M segment	21.301.916	99,95	66.370.951	99,91
Recombinant reads composed of at least 2 fragments from the M segment	10.721	0,05	59.421	0,09
Viral reads mapped against L segment	2.085.241		14.193.790	
Reads composed of only 1 fragment from the L segment	2.084.865	99,98	14.187.190	99,95
Recombinant reads composed of at least 2 fragments from the L segment	376	0,02	6.600	0,05



**Figure 19.** Alignment of recombinant reads against the *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) genomic segments. A) Plg13/2-infected *Nicotiana benthamiana*. B) Plg6-infected *N. benthamiana*.

Alignment against the S segment of Plg13/2 showed that reads mapping (partially) in position 1-150 were sufficient to restore the peak in position 1850-1911, while the subset of reads in position 355-500 was sufficient to restore the peak in position 2300-2476. In sample Plg6, the reads in position 1-150 were

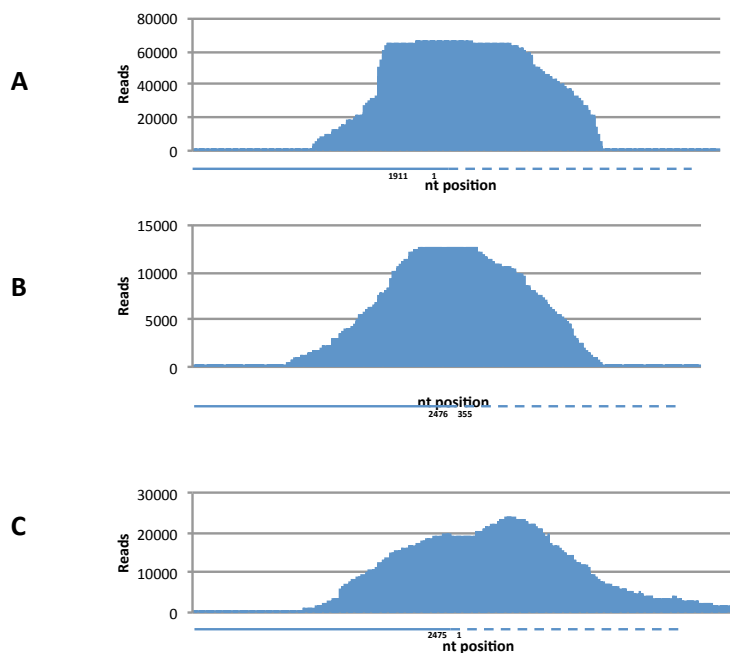
sufficient to regenerate the peak in position 2300-2475 (Fig. 20). These results, and visual inspection of the sequence of a subsample of reads, suggested the presence of two abundant recombination events in the S segment of isolate Plg13/2, specifically in position 1911-1 and 2476-355, and one event in isolate Plg6, in position 2475-1. As a further confirmation, alignment of the subsets of reads against the corresponding simulated recombinant sequences showed that reads were mapping continuously at the predicted junction site (Fig. 21).



**Figure 20. Prediction of the junction site of highly abundant recombinant reads from the S segment of isolates Plg13/2 and Plg6 of *Polygonum ringspot virus* (PoIRSV).** A) Mapping of a subset of predicted recombinant reads from position 1-150 (red color) and 355-500 (blue color) in sample Plg13/2 restores peaks in position 1850-1911 and 2300-2476, respectively, showing that peaks are originated from recombinant reads with a 1911-1 and a 2476-355 junction, respectively. B) Mapping of a subset of reads from position 1-150 in sample Plg6 restores peak 2300-2475, showing that peaks are originated from recombinant reads with head to tail S segment junction.

Prediction of the recombination sites using the ViReMa software (Routh et al., 2012) designed to specifically detects recombination events in virus genomes using deep sequencing datasets were consistent with the previous analysis, with two major events identified in the S segment of isolate Plg13/2, and one in isolate Plg6. Specifically, among the ~19,000 unique recombinant reads from Plg13/2, 81% and 16% were associated, respectively, to the 1911-1 and 2476-355 events, and among the ~8,000 unique recombinant reads from Plg6, 33% were associated to a head to tail recombination event (positions 2474-1, 21%, and 2475-1, 12%, respectively)

(data not shown). The numbers of unique recombinant reads for the L and M segments were 17 and 1415, and 743 and 3187 in isolate Plg13/2 and Plg6, respectively (data not shown), with no events with a junction including the 3' or 5' end of the segments; furthermore, recombination events were fairly evenly dispersed in the genome, without any noticeable hotspot (data not shown). Sanger sequencing analysis of RT-PCR fragments obtained using primers across the various junctions confirmed the RNAseq results (Fig. 22A) showing a deletion of 565 nt for Plg13/2 A, and 354 nt for Plg13/2 B, being A and B the two forms of dimer present in the sample. The four Plg6 clones we sequenced showed a mix of samples containing no deletion, 1 nt deletion or a small rearrangement (Fig. 22A).

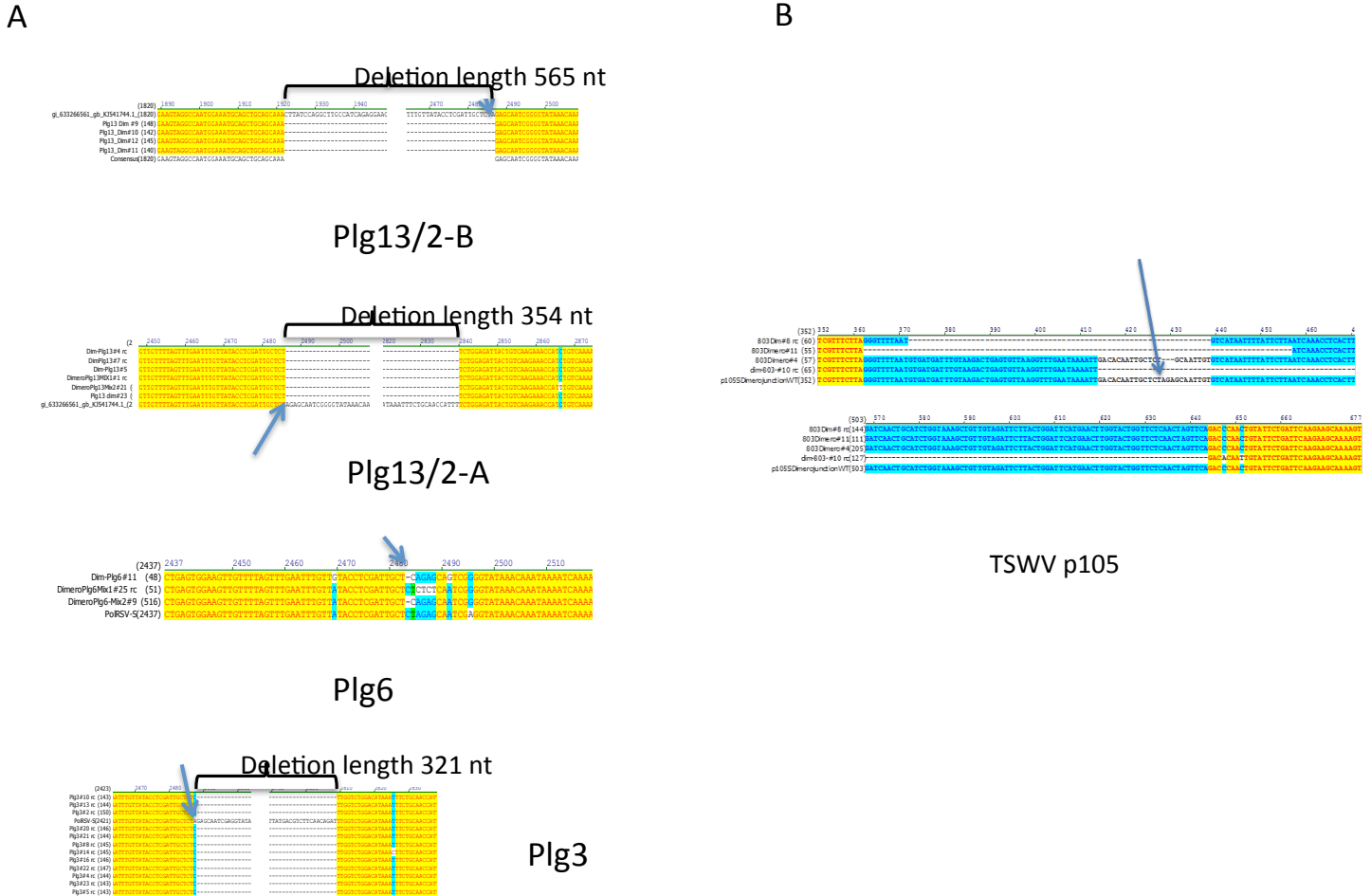


**Figure 21. Alignment against simulated recombinant sequences of *Polygonum ringspot virus* (PoIRSV) isolate Plg13/2.** A) Alignment of Plg13/2 S segment recombinant reads from position 1-150 against a simulated reference sequence at junction 1911-1 of a putative head to tail dimer segment. B) Alignment of Plg13/2 S segment recombinant reads from position 355-500 against a simulated reference sequence at junction 2476-355 of a putative head to tail dimer. C) Alignment of 26700 recombinant S segment reads from position 1-150 against a simulated reference sequence at junction 2475-1 of a putative head to tail dimer.

Isolate Plg3 was not subjected to RNAseq analysis, but RT-PCR across a putative dimer junction confirmed also in this case a single 321bp deletion in all the clones sequenced (Fig. 22A). The same RT-PCR approach across the junction of the putative TSWV ID resulted in a collection of clones with small deletions, from 3 nt to

230 nt, across the junction (Fig. 22B).

Taken together, our new results confirmed the dimeric S RNAs as imperfect dimer RNAs (ID-RNAs) associated to the S RNA, since most dimers molecules displayed 5' or 3'-centered deletions.



**Figure 22. Alignment of cDNA clones obtained from RT-PCR amplifying fragments across the putative (and predicted) dimer junction.** A putative full-length dimer junction is represented in each alignment. The width of the gaps of each clone compared to an *in silico* perfect head to tail dimer, are reported. Arrows point to the dimer junction (sequence tct-aca). A) Alignments of cDNA clones from *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) isolates Plg13/2, Plg6 and Plg3. B) Alignments of cDNA clones from *Tomato spotted wilt virus isolate* (TSWV) p105.

## DISCUSSION

### ID-RNA characterization and relation to existing models of viral dimer RNA formation

In this paper a novel viral RNA species derived from the S RNA of the tospovirus PolRSV was discovered and characterized from systemically infected *N. benthamiana* plants. The novel RNA species, termed imperfect dimer RNA (ID-RNA), constitutes the product of two S-RNA copies that are replicated by the viral replication complex as a single viral molecule; maintenance of PolRSV through mechanical inoculation of *N. benthamiana* brought to the serendipitous selection of specific isolates containing distinct dimer forms, in some cases containing the full length head to tail dimer of the S genomic segment, in other cases having discrete deletions, either at the 5' or at the 3' ends of one of the two genomic molecules, but always leaving unaltered at least one full length molecule of the genomic RNA inside the dimer. While dimers or multimers of genomic sequences are an obligatory replication intermediate for viroids and some RNA satellites (virusoids) including *Hepatitis delta virus* (HDV) (Flores et al., 2011), to our knowledge, their presence during replication of (+) or (-) stranded RNA virus has been fully characterized only in the case of *Flock house virus* (FHV) replication in yeast, mammal and insect cells (Albariño et al., 2001). Dimers of DIs or of satellite RNAs seem to be a fairly common feature, as they are found to accumulate abundantly in systems such as *Cryphonectria hypovirus 3* (CHV3) and its dimer Satellite dsRNA 3 (Hillman et al., 2000), *Turnip crinkle virus* (TCV) and its satellite sat-RNA C (Altenbach and Howell, 1981, Carpenter et al., 1991), *Tobacco ringspot virus* (TobRSV) and its satellite (Kiefer et al., 1982), *Peanut stunt virus* (PSV) and its satellite (Linthorst and Kaper, 1984), TCV with its associated dimer DI RNA (Cascone et al., 1990), and the dimer DI series studied for *Cucumber necrosis virus* (CNV) (Finnen and Rochon, 1993). Also, there has been one report of a dimer of a DI-RNA for *Tomato spotted wilt virus* (Inoue-Nagata et al., 1998).

For members of the *Bunyaviridae*, accumulation of RNA molecules larger than the corresponding RNA genomic segments has been observed in at least two systems, BUNV and RVFV (27, 17, respectively) but they were not characterized with the same depth as the ID-RNAs described herein. Here, in the case of PolRSV, we show unprecedented high accumulation of this dimer derived sequences, which

in one specific isolate (Plg13/2) visually outcompeted the accumulation of wild type S segment genomic RNA: such behaviour is very different from that verified for FHV genomic segment dimers for which accumulation is minimal when compared to wild type genomic segment. In the case of CNV, the DI dimer forms studied co-existed in different ratios with the monomer, but in one specific case, the dimer also outcompeted the monomer (Finnen and Rochon, 1993); nevertheless, all the so far studied DI dimer forms are much smaller than the genomic RNA.

The best-studied system of dimer-like molecules of satellite RNA or DI-RNA is arguably TCV and its dimer satellite and DI molecules (Altenbach and Howell, 1981, Simon et al., 1988, Cascone et al., 1990, Carpenter et al., 1991). The molecular mechanism hypothesized to give origin to dimer molecules is described by Carpenter and collaborators (Carpenter et al., 1991), and relies on the assumption that after synthesis of one (+) strand molecule of RNA from (-) strand RNA template, the replicase complex will initiate a second molecule synthesis switching template without releasing the first molecule, therefore originating a head to tail dimer.

A careful analysis of dimer junction sequence for TCV dimer satellites revealed deletions, specifically at the 3' end of the first molecule in the dimer: this was explained in the model by the presence of secondary structure at the 3' end of the molecule that would facilitate absence of release and re-initiation. Such model could also apply to tospovirus S segment dimer formation. It is also worth noticing that for TCV it was early proposed that the 22 nt deletion that increased the dimer/monomer ratio (affecting dissociation kinetics of the RNA-replicase complexes) would be stabilized by 5'UTR-3'UTR interactions that could indeed facilitate template switching before release (Carpenter et al., 1991).

It must here be noted that panhandle structures that bring in close proximity 5' and 3' UTR of genomic RNA are an universal feature of genomic RNAs for the *Bunyaviridae* and could be a pre-requisite for replication, facilitating the template switching hypothesized to originate dimer sequences. Relevant to this specific aspect of template switching is also the recent critical re-evaluation of cyclisation as

requirement for replication discussed by Lott and Doran for *Dengue virus* (Lott and Doran, 2013). In their paper the authors argue that the experimental data for 5'-3' UTR interaction cannot be interpreted only as a monomolecular panhandle interaction, but also as a dimeric or multimeric interaction. The same could apply in part to tospoviruses, where the evidence is of similar nature.

Our system is the first that shows a very abundant dimer/monomer ratio in the case of full-length genomic segments. In the case of both FHV and CNV DIs, available reverse genetic tools demonstrated that dimer sequences are indeed template for monomer accumulation during replication, raising the interesting hypothesis of them being a necessary common replication intermediate and not simply a dead-end product of aberrant replication. To date, a clear functional role for these dimeric viral RNA species has not been established; despite the limitations associated to the absence of a reverse genetics system for tospoviruses, the dynamic process of regulation of ID-RNA accumulation presented in this paper can provide further evidence of a yet unknown biological role for accumulation of dimer derived sequences during replication.

#### Factors that regulate abundant ID-RNA accumulation and comparison with regulation of DI-RNA in tospoviruses

One of the novelties of our work is that, the very abundant accumulation of dimer-like molecules in some specific conditions allowed us to monitor specific factors involved in their generation and accumulation, such as time after infection, temperature, host specificity, virus species or specific virus isolate.

We have shown that temperature is an important factor regulating ID-RNA biogenesis and that ID-RNA accumulation positively correlates with temperature. Taken together, our results are different from what was found for DI-RNAs, for which low temperatures (18°C) were shown to favour accumulation (Inoue-Nagata et al., 1997). The positive effect of high temperatures on ID-RNA levels seen for *N.*

*benthamiana* seems to be effective for this host only, because when tomato plants infected with PolRSV were kept at 30°C, no ID-RNAs were generated, despite the high temperature setting.

ID-RNAs accumulated only at late phases of systemic infection, as shown in Fig. 16, indicating that the molecular mechanisms associated to the erroneous replication of the S-RNA that generate ID-RNAs may be triggered by intense stress due to viral overload in cellular environments. Also, it means that ID-RNAs are potentially being generated *de novo* at every new parasitized leaf organ, instead of being systemically moved along the plant together with the other encapsidated viral RNAs. This seems to be the general case for ID-RNA generation as exemplified by isolate Plg6, but for isolate Plg13/2, for which ID-RNA accumulation seemed to visually outcompete genomic S RNA accumulation in northern blots, the level of ID-RNAs present in locally infected leaves was as intense as the level seen for systemically infected leaves, making it plausible that the ID-RNAs detected in this isolate are able to move cell to cell.

Important observations from our study that relate to the hypothesis of involvement of the host RNAi pathway in ID-RNA generating/non-generating conditions are the effect of temperature on the ID-RNAs (i) and the fact that ID-RNAs are generated only in the latest phases of systemic infection only in some specific *Nicotiana* hosts (ii). i) It is known that temperature can modulate the amount of small-interfering RNAs (siRNA) generated by plants (Szittyá et al., 2003) and that there is a positive correlation between increased temperatures and greater yields of siRNAs during virus infection for both DNA and RNA viruses (Chellappan et al., 2005). In our experiments we have found that higher temperatures favour ID-RNA accumulation (Fig. 13). Since the RNAi response in *N. benthamiana* is not complete due to the absence of the amplification phase, the pathway may have reduced efficacy at high temperatures, thus allowing for recombinant or defective viral molecules to exist in the viral population, even though they lack in fitness. Recently, Prasch and Sonnewald (Prasch and Sonnewald, 2013) applied a triple-stress factor to *A. thaliana* plants and verified that there was a reduction in the



expression of R-related genes against *Turnip mosaic virus*. ii) The context of heavily infected cells during systemic infection surely represents a strong stress factor for plants. It has been shown in great detail for *Tomato bushy stunt virus* that abiotic stress can induce intricate cellular conditions that lead to viral RNA recombination by loss of inhibition over a host enzyme called Xrn1p 5'-3' ribonuclease (Jaag and Nagy, 2010).

It should be noted here that ID-RNA formation is not always linked to viral overload in plants. It is specific to *N. benthamiana* and *N. occidentalis* infections: in fact, Fig. 12C shows that another solanaceous host (*D. stramonium*) supports high virus accumulation without producing ID-RNAs.

It is possible that an intact, fully functional host RNAi pathway is necessary to keep particular types of viral RNA mutations from happening. In the absence of a perfect RNAi response, cell environment would be more permissible to viral replication of RNA copies that are imperfect as shown for DI generation in *Cryphonectria hypovirus 1* in *Cryphonectria parasitica* (Zhang and Nuss, 2008). This hypothesis relies on the comparison of the S RNA hybridization profiles of infected *N. benthamiana* and *S. lycopersicum* presented in this article (Fig. 8), and on data produced by Goodin et al. (Goodin et al., 2008) and Yang et al. (Yang et al., 2004) on the very susceptible nature of the worldwide used *N. benthamiana* 'small flower' ecotype for experimental plant virus infections and the presence of mutations in the gene *NbRdRP1m*, an analog of *A. thaliana*'s RDR1, a key player in the amplification phase of plant RNAi antiviral defense, respectively (Borges and Martienssen, 2015). Current efforts are being made to try to obtain a different *N. benthamiana* ecotype or transgenic lines that recover the RDR1-analog function, thus proving or negating this hypothesis.

Northern blot analysis of isolate Plg13/2 raises the possibility that transcription of sub-genomic RNAs (sgRNAs) can occur from an ID-RNA template (cf. Fig. 13B); in fact, despite the virtual absence of genomic RNA, abundant sgRNAs

accumulate nearly to wild type levels, implying that the ID-RNAs can be templates for the transcription of sgRNAs.

Looking at the host ranges of the PolRSV isolates we characterized in this work, it is noteworthy that isolate Plg13/2 was never able to infect *S. lycopersicum* and was the only isolate that kept accumulating ID-RNAs even at 18°C, indicating that in the same way as DI-RNAs, ID-RNAs may also interfere with viral infection, changing viral host range and inhibiting systemic infection. Nevertheless, we cannot rule out that a specific mutation in other genomic regions has restricted the host range of Plg13/2. Moreover, in contrast to isolate Plg6, Plg13/2 had low levels of WT genomic S-RNA, even when kept at 18°C, as shown in Fig. 13: this specific isolate, seems to have lost the ability to fine tune the dimer/monomer ratio in different experimental conditions and fixed a high ID accumulation through maintenance of two distinct populations of dimer molecules indistinguishable by size in northern blots, with single-deletions of 565 and 354nt in size with different positions in respect to the S sequence: one 3'-centered and the other 5'-centered, respectively. The two populations of Plg13/2 ID-RNAs accumulated to different relative frequencies in the recombinant S RNA population of molecules, with one being significantly more frequent than the other (the one with the biggest deletion), by more than six-fold in total number of copies. This scenario indicates that some sort of selection process, be it size-related selection or sequence content-related selection, governs the dynamics between these two populations of ID-RNAs in the same isolate.

We showed that besides PolRSV, an Italian isolate of TSWV (p105 – main TSWV isolate in northern Italy) infecting *N. benthamiana* also generated ID-RNAs at room temperature (Fig. 15A) and at 30°C (data not shown). Our IYSV isolate, however, even when kept at 30°C, did not generate ID-RNAs (Fig. 15B). Even though we were not able to induce ID-RNA biogenesis for IYSV, the fact that TSWV produced ID-RNAs indicates that ID-RNA formation may be a common feature for tospoviruses in specific virus-host combinations or environmental conditions. This hypothesis is corroborated by the occurrence of dimer-like S and L RNAs for BUNV

and RVFV (Scallan and Elliott, 1992, Billecocq et al., 1996) mentioned in the introduction. In fact, it is probable that dimer-like formation of genome-associated viral molecules is a common feature of all *Bunyaviridae*, depending on abnormal cellular conditions (i.e. stressed cellular environments such as immortalized cell culture lines and heavily infected cells).

Regarding the RNase R assay, the fact that digestion of the WT S genomic RNA from Plg6 kept in tomato plants was not complete even after 60 minutes reaction, may indicate the presence of strong lariat secondary structures at the UTRs present in the genomic RNA that are not formed by the ID-RNA molecules. This assay excludes that the dimer size molecule we observe in northern blots might be due to possible anomalous RNA migration patterns in electrophoresis due to RNA circularity.

#### ID-RNA characterization stimulates re-interpretation of previous results

The discovery of the ID-RNAs in PolRSV-infected *N. benthamiana* gives us a new factor to interpret recent results published on the viral small-RNA (vsRNA) profiles of PolRSV-infected *S. lycopersicum* and *N. benthamiana* (Margaria et al., 2016). In fact, the particularly high number of vsRNA derived from the S segment found in *N. benthamiana* in comparison to *S. lycopersicum* can now be attributed to the abundant accumulation of ID-RNA sequences in the former host. These results strongly suggest that any sRNA analysis should always be associated to a comprehensive northern analysis that allows the detection of previously unreported RNA species that might be origin and/or target of the silencing machinery.

The RNA-seq/bioinformatics approach, northern blot analyses and RNase R assay demonstrated that in the case of PolRSV the abundant quantity of reads mapping across a putative dimer junction is not due to circularization of the genomic segment but to presence of a true dimer-like molecule particularly abundant for the S segment. In a recent paper, Li et al. based on small sequence read

distributions across 3'-5' junction sites obtained from RNAseq suggested that *Chuviridae*, a newly characterized clade of multi-segmented negative strand viruses, are the first example of RNA viruses possessing a circular genome (Li et al., 2015a). As exemplified by our case study, the same reads distribution across putative junction sites is indeed due to presence of dimers, and not circular genomic sequences. In this sense, we think that the circular nature of *Chuviridae* should be confirmed by RNase R and northern blot analysis before the common acceptance by the scientific community of this particular feature of their genome.

## Conclusions

The results presented here support, to the best of our knowledge, the first description and characterization of a defective RNA viral species being bigger than its originating molecule in organism-based assays, in contrast to *in vitro* cell line based assays in the case of FHV. It is also the first description and characterization of dimer-like molecules for the genus *Tospovirus*, a finding supported, and that corroborates for the first time, the results obtained by Billecocq and collaborators (Billecocq et al., 1996) for RVFV, although in their case, no molecular characterization of the large molecule was carried out. Differently from DI-RNAs that accumulate on several plant hosts, ID-RNA generation was restricted to a few host species, and was particularly abundant in *N. benthamiana*. Our results also show for the first time the influence of temperature on dimer-like viral RNA species formation for the *Bunyaviridae* family and point at the possible involvement of the host machinery on the quality control of the viral RNA species.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Particular thanks to Riccardo Lenzi and Caterina Perrone for technical assistance. Bioinformatic analysis was performed with Advanced CyberInfrastructure computational resources provided by The Institute for

CyberScience at The Pennsylvania State University, University Park, PA, USA (<http://ics.psu.edu>). The authors also acknowledge Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 490529/2011 - Chamada Cooperação Internacional Itália - CNPq/CNR) for AB and ROR and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) for funding (ROR) and a scholarship in the Science without borders program of the Brazilian government (AB) (Processo 99999.001310/2014-03)

## **7. Capítulo 2: Comparação entre dois diferentes isolados de TSWV para geração de RNAs defectivos interferentes (DI-RNAs) e RNAs imperfeitos Diméricos (ID-RNAs) e estudo do efeito dos ID-RNAs sobre a expressão de proteínas virais**

### **Introdução**

Neste trabalho comparou-se a ocorrência de dímeros do segmento S entre dois isolados de TSWV (p105, principal isolado de TSWV do norte da Itália e BR-20, isolado brasileiro de TSWV) mantidos por inoculação mecânica sucessiva por mais de 15 passagens. O acúmulo de dímeros do S RNA foi isolado-específico para p105 e a presença do dímero apresentou efeito sobre a expressão das proteínas virais desse isolado. As descobertas aqui apresentadas complementam os achados do capítulo 1 i) demonstrando que espécies virais diméricas para o segmento S podem surgir durante passagens seriadas à temperatura ambiente tal qual DI-RNAs; ii) por terem sido feitas coletas dos dois isolados a cada ponto de passagem no intuito de realizar-se RNAseq, foi possível acompanhar em grande detalhamento a partir de que momento na série de inoculações mecânicas sucessivas o dímero surgiu e quais alterações a presença do dímero provocou sobre as populações de RNAs subgenômicos e sobre sua capacidade replicativa; iii) possibilitando comparar o comportamento de p105 com o de BR-20 na mesma espécie hospedeira tanto quanto o comportamento de cada isolado entre diferentes espécies hospedeiras (*Nicotiana benthamiana* e *Datura stramonium*); iv) apontando a necessidade de se estudar o isolado p105 de TSWV em maior detalhe para compreensão do porquê esse isolado produz dímeros durante o processo infeccioso, mas outros isolados de TSWV não o fazem.

### **Objetivos Específicos**

- Produzir inóculos para a avaliação da geração de moléculas defectivas (DI-RNAs e ID-RNAs) de TSWV a partir de inoculação por tripes e os efeitos do acúmulo de tais moléculas defectivas sobre a produção das proteínas virais
- Realizar RNA-seq da primeira e última passagens, avaliando os efeitos do aparecimento de RNAs defectivos (DI-RNAs e ID-RNAs) sobre a expressão gênica viral

## **Material e Métodos**

### Isolados virais, transmissão e inoculação mecânica

Os isolados p105 e BR-20 de TSWV foram mantidos em estufa dentro de um complexo de casas de vegetação com temperatura controlada (máx. 24°C e min 18°C) e irrigação diária em plantas de *D. stramonium* e *N. benthamiana*, respectivamente, antes da aquisição pelo inseto vetor por pelo menos 12 passagens mecânicas sequenciais. Após a transmissão via vetor (*Frankliniella occidentalis*) para plantas de *Datura stramonium*, os vírus foram passados mecanicamente em linhas paralelas de duas espécies-hospedeiras (*D. stramonium* e *N. benthamiana*) para cada isolado viral por pelo menos 4 meses.

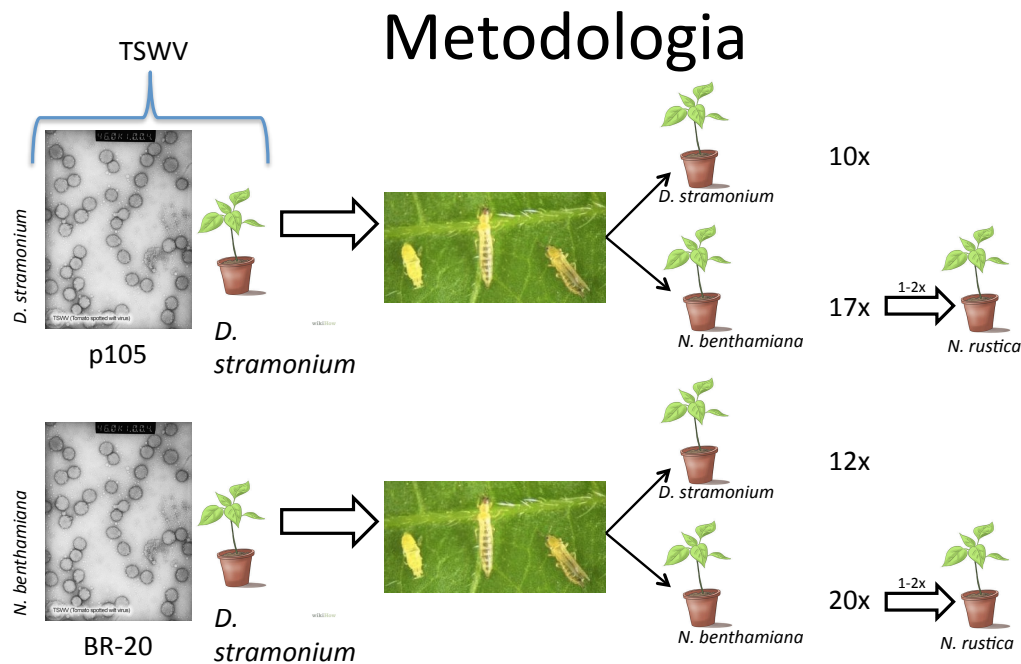
Os ensaios de aquisição e transmissão de vírus foram realizados em parceria com o laboratório da Dra. Luciana Tavella da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade de Turim, Itália. Em resumo, 5-10 larvas de primeiro estágio de tripes avirulíferos da espécie *Frankliniella occidentalis* foram mantidos em pequenas armadilhas de acrílico contendo pedaços de folhas de *D. stramonium* sistemicamente infectadas por um período de 48h para aquisição do inóculo viral. Em seguida, as larvas foram transferidas para gaiolas maiores contendo vasos de plântulas jovens (2-4 folhas verdadeiras) de *D. stramonium*, onde foram mantidas por um período de 5-7 dias para pupação, saída do adulto e transmissão. Após aplicação de inseticidas para eliminar a população de insetos, as plantas foram transferidas das gaiolas para uma incubadora climática à temperatura e luminosidade controladas, onde foram

mantidas até aparecimento dos sintomas, coleta e inoculação mecânica sequencial do material infectado, como descrito acima.

A partir do aparecimento de sintomas sistêmicos nas plantas de *D. stramonium* inoculadas pelo inseto-vetor coletou-se material foliar sistemicamente infectado e diluiu-se 1/10 (p/v) em tampão de inoculação (50mM tampão fosfato pH 7,0 + 1mM EDTA sódico + 5mM Na-DIECA + 5mM Na-tioglicolato). Foram inoculadas em batelada, em média, dez plantas de *N. benthamiana* e cinco de *D. stramonium* a partir do primeiro inóculo e em todos os inóculos subsequentes. Apenas na primeira passagem por inoculação mecânica o material infectado proveniente de *D. stramonium* foi utilizado para inocular tanto *N. benthamiana* quanto *D. stramonium*. Após esta primeira passagem, o material sistemicamente infectado coletado de *N. benthamiana* foi usado apenas para inocular *N. benthamiana* e o material sistemicamente infectado coletado de *D. stramonium* apenas para *D. stramonium*.

A obtenção de material foliar para os inóculos subsequentes ao primeiro foi feita a partir da constatação de infecção sistêmica plenamente estabelecida (aproximadamente 7 dias após a inoculação mecânica em *N. benthamiana* e aproximadamente 12 dias após a inoculação mecânica em *D. stramonium*), a partir da qual folhas jovens sistemicamente infectadas foram coletadas, objetivando-se coletar ao menos uma folha sistemicamente infectada de cada plantas da batelada para preparação do inóculo e para armazenamento a -80°C para posterior extração de RNA e proteínas totais. Ao fim do período de quatro meses foram realizadas passagens em *N. rustica* a fim de comparação de sintomatologia, pois esta foi a espécie vegetal utilizada nos trabalhos realizados por Resende e colaboradores (1992, 1991) para avaliação do efeito interferente (i.e., atenuação dos sintomas) dos DI-RNAs. Um resumo completo dos esquemas de inoculação em série dos isolados p105 e BR-20 de TSWV é apresentado na figura 23.





Coleta de amostras de cada passagem. Processamento para NB e WB das amostras de 2ª e 3ª passagens (menor número) e 16ª e 17ª (maior número – p105) e 19ª e 20ª (maior número – BR-20) passagens.

**Figura 23. Esquema do desenho experimental de inoculações dos dois isolados de TSWV utilizados para os experimentos deste capítulo.** Primeiro, os isolados p105 e BR-20 mantidos em *Datura stramonium* foram passados por tripes para plantas saudáveis a fim de eliminar os elementos não aptos (baixa *fitness*) da população viral. Das plantas infectadas via tripes foram realizadas passagens sequenciais à alta pressão de inóculo [i.e., baixas diluições do material infectado por volume de tampão de inoculação: 1/10 (p/v)] por inoculação mecânica em dois hospedeiros distintos: *Datura stramonium* e *Nicotiana benthamiana*. A figura apresenta quantas vezes os inóculos foram passados sequencialmente. Os isolados mantidos em *N. benthamiana* foram, finalmente passados uma ou duas vezes em plantas de *Nicotiana rustica* para avaliação de sintomatologia.

### Extração de RNA total e proteínas totais

Para extração de RNA total utilizou-se Spectrum™ Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich) de acordo com as instruções do manual do fabricante utilizando sistema de bomba a vácuo para a ligação e lavagens do RNA total na coluna de purificação. Para a maceração do material vegetal, aprox. 100mg de tecido foliar fresco ou 10mg de tecido foliar liofilizado foram transferidos para tubos de 2ml reforçados com tampa de rosca onde pequenas esferas de silício revestidas de zircônio haviam sido adicionadas até a marca de 500µl, aproximadamente. Aos tubos de 2ml contendo o material vegetal e as esferas (do inglês *beads*) foi adicionado 1ml de Lysis Buffer do kit suplementado na hora com 1% (v/v) de 2-

Mercaptoetanol, de acordo com as instruções do fabricante. O rompimento do material biológico foi feito em um homogeneizador MP Biomedicals FastPrep®-24 Instrument na velocidade de 4.5 – 6M/s por 30 a 60s, de acordo com os parâmetros do equipamento. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados a velocidade máxima por 3min em uma centrífuga de bancada MiniSpin® Plus (Eppendorf), coletou-se 500-600ul do sobrenadante e prosseguiu-se com a extração de acordo com o manual do kit, eluindo o RNA total em volume final de 30-40µl. O RNA eluído foi mensurado com um Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e conservado a -80°C.

A extração de proteínas totais seguiu protocolo de homogeneização similar ao da extração de RNA total, no mesmo tipo de tubo. No entanto, o tampão de extração usado não era comercial, mas sim uma preparação de tampão TE contendo inibidores de protease e agente redutor (50mM Tris, pH 8; 10mM EDTA, pH 8; 10mM DTT, 5mM benzamidina, 10µg/ml aprotinina, 10µg/ml leupeptina, 10µg/ml pepstatina A, 2mM PMSF). Assim como na extração de RNA, o material foi homogeneizado usando as mesmas configurações e máquina descritas acima. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados a 3.000 RPM por 2min em uma centrífuga de bancada MiniSpin® (Eppendorf). Coletou-se o sobrenadante (500µl) e transferiu-se para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5ml. O material foi centrifugado a velocidade máxima (13.400 RPM) por 10min e o sobrenadante descartado. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 100µL de tampão de extração + 100µL de *cracking buffer* (SDS 5% p/v, glicerol 50% v/v, azul de bromofenol 0,005% p/v em solução de Tris 50mM, pH 6,8) com 5% de 2-Mercaptoetanol (v/v) adicionado na hora. Após ressuspensão as amostras foram mantidas a  $T \geq 95^{\circ}\text{C}$  por 5min e posteriormente centrifugadas por 1min a velocidade máxima em centrífuga de bancada. Quando não utilizadas na hora para PAGE, as amostras foram guardadas a -20°C e utilizadas dentro do intervalo máximo de uma semana após a extração. Para tanto, as amostras foram aquecidas a 55°C por 5min antes do carregamento em gel.

Produção de sondas de RNA radioativas por transcrição *in vitro*

Sondas de RNA foram geradas por meio de transcrição *in vitro* com incorporação de radionuclídeos marcados  $\alpha^{32}\text{P}$  [CTP] utilizando o kit MaxiScript® (Ambion) de acordo com as recomendações do manual do fabricante. Plasmídeos pGEM-T easy (Promega) contendo fragmentos de sequências do segmento S para NSs e N, do segmento M para a proteína NSm e do segmento L para a porção 5' do vcRNA, englobando uma parte da região codante da proteína L (de modo a ser funcional na detecção tanto de DIs quanto L RNAs WT), todos de TSWV, foram geradas por digestão dos plasmídeos com *Eco*ICRI (Fermentas) e transcrição *in vitro* com a T7 RNA polimerase do kit. Após transcrição *in vitro* as ribossondas foram purificadas usando o kit Spectrum™ Plant Total RNA (Sigma-Aldrich).

#### Northern blot e western blot

Para northern blot utilizou-se o método de separação de RNA total em gel de agarose (1% p/v) desnaturante usando glyoxal e transferência para membrana de nylon positivamente carregada (Immobilon-Ny<sup>+</sup>, Merck Biochemicals) por meio de capilaridade, como descrito por Sambrook e colaboradores (2001).

Brevemente, aliquotou-se de 3-5µg de RNA total para cada uma das amostras e incubou-se a 55°C por 30min em tampão HEPES-EDTA adicionado de glyoxal e DMSO, totalizando um volume final de 30µl. A cada amostra adicionou-se 6µl de tampão de amostra comercial para DNA/RNA (6X Loading Dye, Fermentas). Para a pré-hibridização e a hibridização utilizou-se tampão comercial ULTRAhyb® (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante para sondas de RNA radioativas. Para máxima reatividade e “estringência” os RNAs hibridizaram overnight e as lavagens foram feitas com tampão comercial descrito no manual do tampão ULTRAhyb®. Todas as membranas foram testadas com contador Geiger para força do sinal radioativo. Filmes ultrassensíveis a raios-X (Fuji) foram utilizados para a captação dos sinais das membranas em cassetes de exposição por tempos mínimos de 1h e máximos de 48h, sempre mantidos a -80°C. Os filmes

radiográficos foram revelados em câmara escura com tempos de desenvolvimento de 10s a 1min e fixação de 10 a 30s.

Para western blot utilizou-se o protocolo de eletroforese em gel de poliacrilamida (10% v/v) com tampão Tris-tricina ao invés do protocolo convencional de Laemli (Sambrook, 2001). Todos os componentes utilizados para PAGE são da série Mini-PROTEAN® (Bio-Rad), incluindo cubas, vidros, e raques para montagem e corrida. Para o gel separador, ao invés de água milli-Q usou-se uma solução de água e glicerol a 30% de concentração final.

Brevemente, para o gel separador misturavam-se 5ml da solução de glicerol a 30%, 5ml de solução comercial (Sigma-Aldrich) de Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1) a 30% e 5ml de solução 1M de Tris-HCl pH 8,9 + 3% de SDS (p/v). A esta mistura adicionava-se 150µL de uma solução de persulfato de amônio a 10% (p/v) diluída em água milli-Q e 10µl de TEMED (Sigma-Aldrich). Para o gel concentrador eram 6,5ml de água milli-Q, 1,35ml da solução de acrilamida e 2,5ml da mesma solução de Tris. O tampão interno (“entre os dois géis”) utilizado foi *anode buffer* (17,9g de tricina; 12,1g de Tris-base e 1g de SDS para 1L de volume final). Do tampão externo, chamado *catode buffer* (Tris-HCl 0,1M pH 8,3) utilizou-se 200ml para preencher a cuba. De cada amostra de proteína aplicava-se 10µl em cada poço do gel, à exceção do marcador, Blue Prestained Molecular Weight Marker Mix (Pierce), para o qual se aplicava 5µl. Para transferência utilizou-se o protocolo de *Wet Transfer* do conjunto Mini-TransBlot® Cell (Bio-Rad) usando membrana de nitrocelulose Porablot NCP (Macherey-Nagel).

Após transferência por 1h a 200mA, as membranas foram coradas com solução de Ponceau, lavadas e posteriormente bloqueadas com solução de bloqueio (leite desnatado em pó a 7%, p/v, em tampão TBS1x-Tween-20 0,1% v/v) por meia hora, após a qual adicionava-se o anticorpo primário contra as proteínas N, NSs ou NSm, todos produzidos em coelhos, proveniente da coleção de anticorpos do laboratório de sorologia e caracterização de vírus do *Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante* (IPSP, ex-IVV) do *Consiglio Nazionale delle Ricerche* (CNR,

Itália) e mantinha-se as membranas a 4°C ao longo da noite. No dia seguinte, as membranas eram lavadas com TBS-Tween em cinco ciclos de agitação por cinco minutos cada, bloqueadas em leite por mais 30min e por fim sensibilizadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP Goat anti-Rabbit IgG – Promega) por 1-2h. Novamente as membranas eram lavadas e aplicava-se o revelador SuperSignal West Pico Substrate (Pierce) de acordo com as instruções do manual. A exposição de filmes de raios-X a quimioluminescência era feita de 30s a 30min dependendo do anticorpo e a revelação em câmara escura com 10 a 60s de desenvolvimento e 10 a 30s de fixação.

## Resultados

### Comparação da expressão gênica entre passagens sequenciais de um mesmo isolado e entre dois isolados de tospovírus; acumulação diferencial de DI-RNAs e detecção de uma nova forma de RNA defeutivo derivado do segmento S

A análise dos perfis de RNA via northern blot para os segmentos S, M e L dos isolados p105 (Norte da Itália) e BR-20 (Instituto Biológico, Piracicaba, Brasil) de TSWV foi realizada a partir de extração de RNA total de folhas jovens sistemicamente infectadas a partir de infecções mecânicas de isolados da 2<sup>a</sup> e 19<sup>a</sup> (BR-20) e 2<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> e (p105) passagens em *N. benthamiana*, e 3<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> (BR-20) e 3<sup>a</sup> e 17<sup>a</sup> (p105) passagens em *N. rustica*. A figura 23 apresenta o desenho experimental das passagens sequenciais realizadas para os dois isolados de TSWV. Todas as hibridizações foram realizadas incluindo amostras de controles negativos que foram suprimidos das figuras por questão de espaço e ausência de marcação.

Nas figuras são apresentadas duas séries de três amostras (números 1, 2 e 3) referentes a três réplicas biológicas escolhidas (i.e., três plantas escolhidas aleatoriamente em cada batelada de inoculação) de cada ponto de passagem. As réplicas 1, 2 e 3 de cada passagem derivam de um mesmo inóculo parental e não de três linhas distintas de passagens seriadas. Cada figura apresenta a comparação

entre dois conjuntos de réplicas, um de baixo número de passagem (2<sup>a</sup>P ou 3<sup>a</sup>P) e outro de alto número de passagem (16<sup>a</sup>P e 17<sup>a</sup>P para o isolado p105 e 19<sup>a</sup>P e 20<sup>a</sup>P para o isolado BR-20) para cada segmento gênico dos isolados virais, de acordo com a legenda de cada figura.

A análise do padrão de bandejamento para o segmento L para infecções em *N. benthamiana* (Figura 24) e *N. rustica* (Figura 25) demonstra que o isolado BR-20 de TSWV apresentou, desde o início uma concentração significativamente maior de DI-RNAs em comparação ao isolado p105. Os DI-RNAs do isolado BR-20 sofreram alterações de tamanho (provável seleção por eficiência de replicação) e se tornaram menores na comparação entre a 2<sup>a</sup> e a 19<sup>a</sup> passagens em *N. benthamiana* (Figura 24A); característica também mantida para a análise em *N. rustica* (Figura 25A). Os DI-RNAs do isolado p105 também acumularam mais moléculas da 2<sup>a</sup> para a 16<sup>a</sup> passagem, mas parece não ter havido seleção durante o período de inoculações mecânicas seriadas para tamanhos diferentes do tamanho inicial dos DI-RNAs vistos na 2<sup>a</sup> passagem (Figura 24B). Quando o isolado p105 foi passado em *N. rustica*, no entanto, observou-se o acúmulo de uma segunda forma de DI-RNA (Figura 25B).

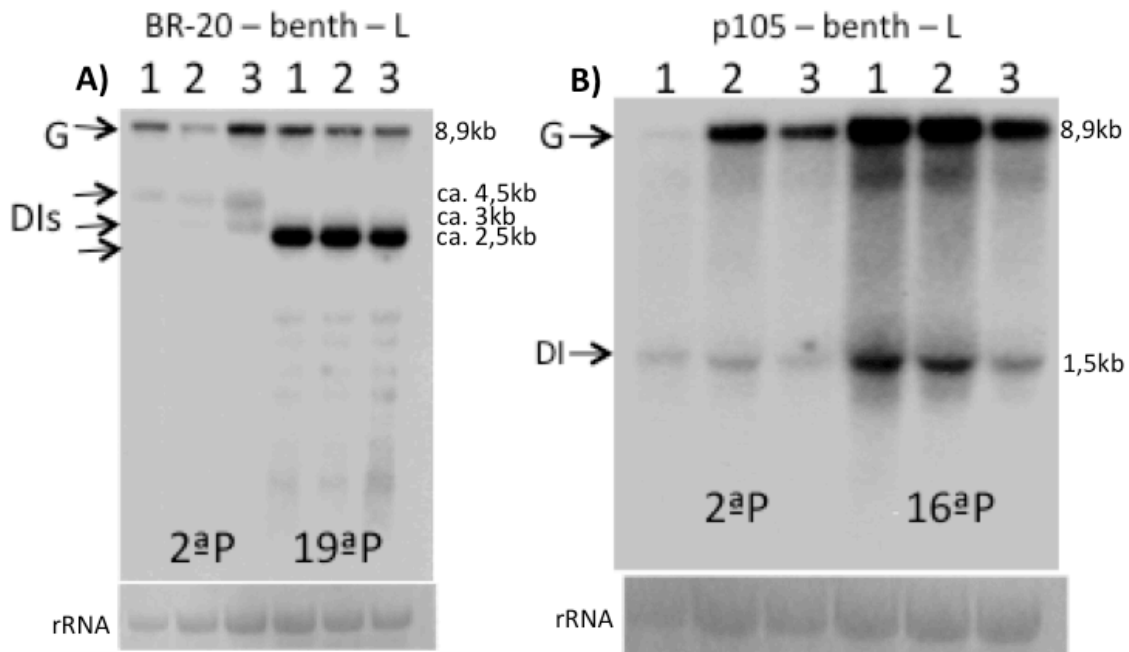
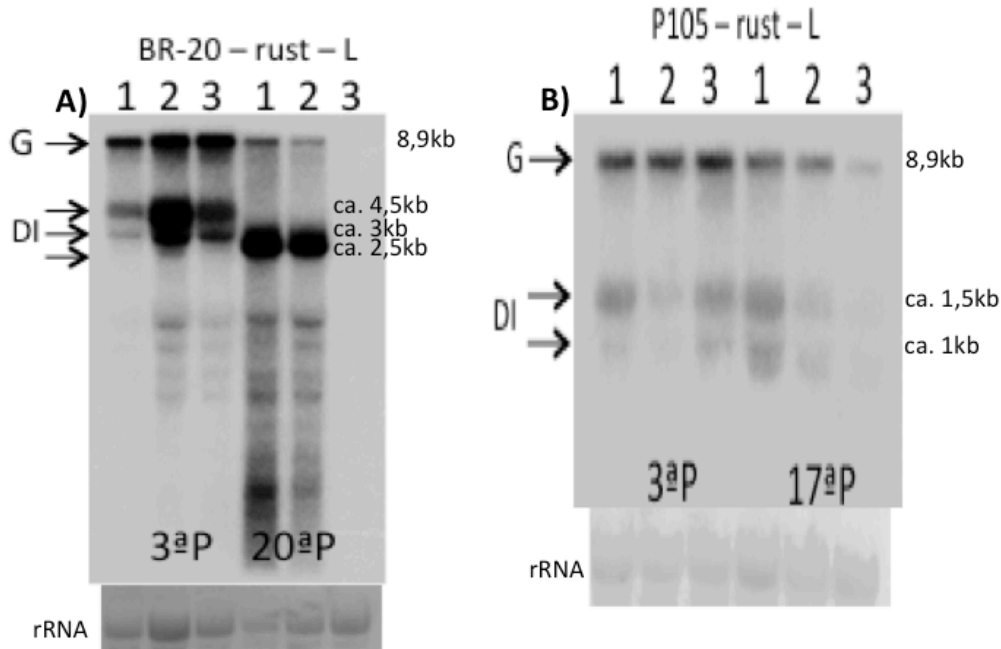


Figura 24. Perfil de bandejamento de RNAs virais marcados com sonda para o L RNA de dois isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantidos em *Nicotiana benthamiana*. Os isolados BR-20 (A) e p105 (B) foram mantidos por inoculação mecânica em plantas de *N.*

*benthamiana*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P – número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G – RNA viral de tamanho genômico. DI – RNAs defectivos-interferentes. rRNA – controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno.



**Figura 25.** Perfil de bandeamento de RNAs virais marcados com sonda para o L RNA de dois isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantidos em *Nicotiana rustica*. Os isolados BR-20 (A) e p105 (B) foram mantidos por inoculação mecânica em plantas de *N. rustica*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P – número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G – RNA viral de tamanho genômico. DI – RNAs defectivos-interferentes. rRNA – controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno.

A análise do segmento S para infecções em *N. benthamiana* (Figuras 26 e 27) e *N. rustica* (Figuras 28 e 29) foi feita com duas sondas, uma para o gene N e outra para o gene NSs, e demonstrou um comportamento bastante diferenciado entre BR-20 e p105 na hospedeira *N. benthamiana*. Enquanto o isolado BR-20 apresentou forte acúmulo das bandas do S RNA genômico e dos mRNAs subgenômicos da proteínas N (Fig. 26) e NSs (Fig. 27) como esperado, o isolado p105 apresentou uma banda de RNA de tamanho superior ao RNA genômico S quando provado com ambas as sondas (Figs. 28 e 29). Esta banda de tamanho superior estava presente apenas nas amostras de 16<sup>a</sup> e 17<sup>a</sup> passagens, sem nenhum sinal na mesma posição da autorradiografia para 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> passagens.

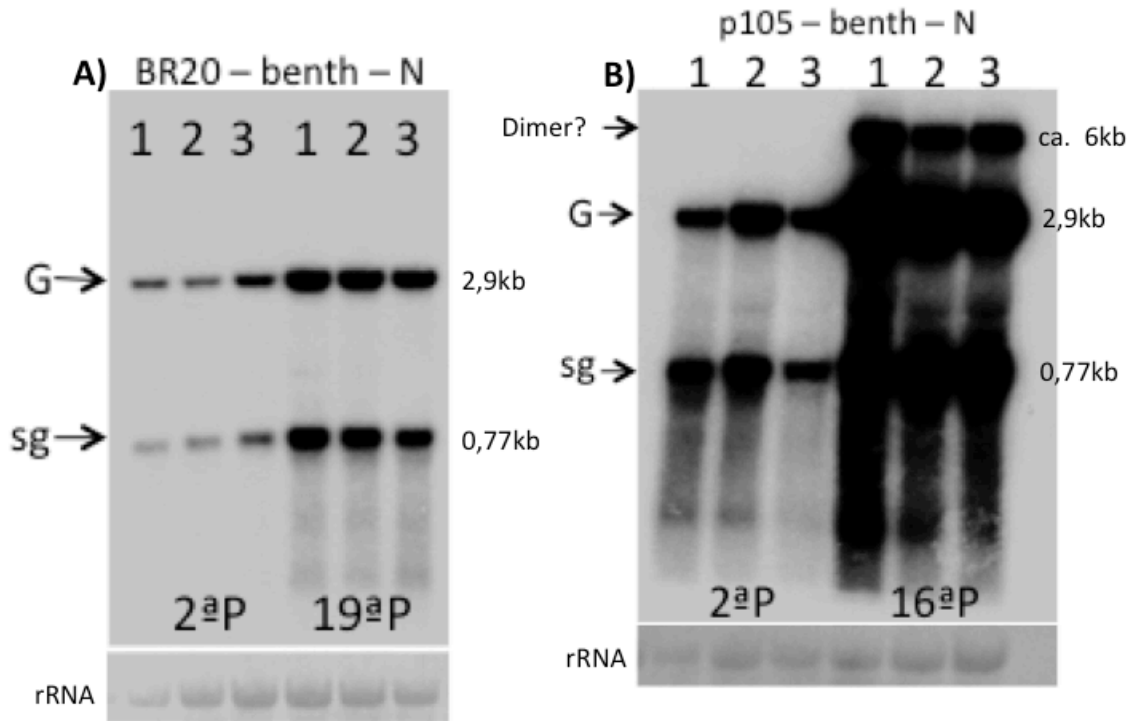


Figura 26. Perfil de bandeamento de RNAs virais marcados com sonda para o gene N do S RNA de dois isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantidos em *Nicotiana benthamiana*. Os isolados BR-20 (A) e p105 (B) foram mantidos por inoculação mecânica em plantas de *N. benthamiana*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P - número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G - RNA viral de tamanho genômico. Dimer? - nova espécie de RNA viral associada ao S RNA com tamanho compatível com o de um dímero. rRNA - controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno.

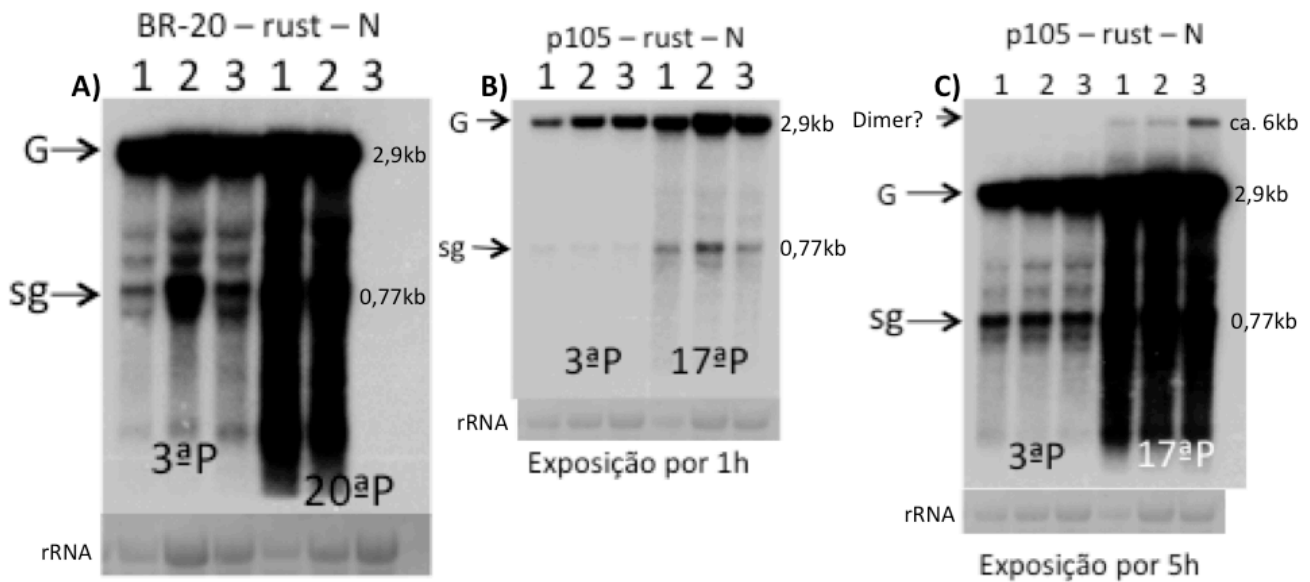
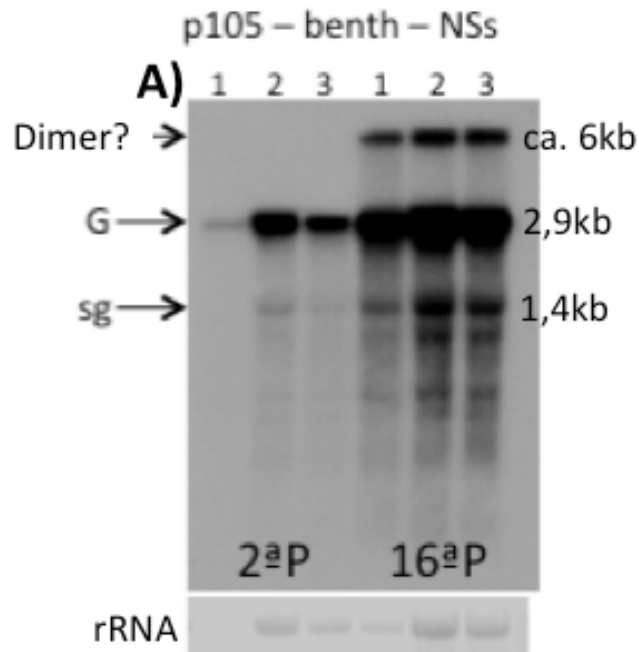


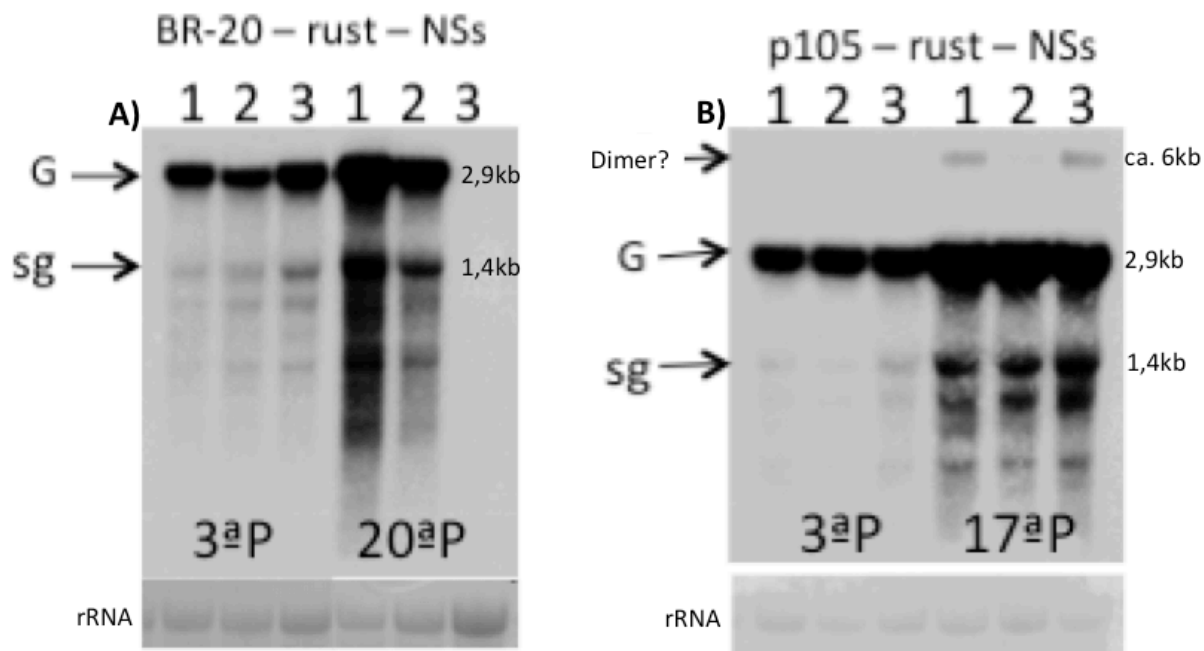
Figura 27. Perfil de bandeamento de RNAs virais marcados com sonda para o gene N do S RNA de dois isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantidos em *Nicotiana rustica*. Os isolados BR-20 (A) e p105 (B e C) foram mantidos por inoculação mecânica em plantas de *N.*



*rustica*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P – número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G – RNA viral de tamanho genômico. Dimer? – nova espécie de RNA viral associada ao S RNA com tamanho compatível com o de um dímero. rRNA – controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno.



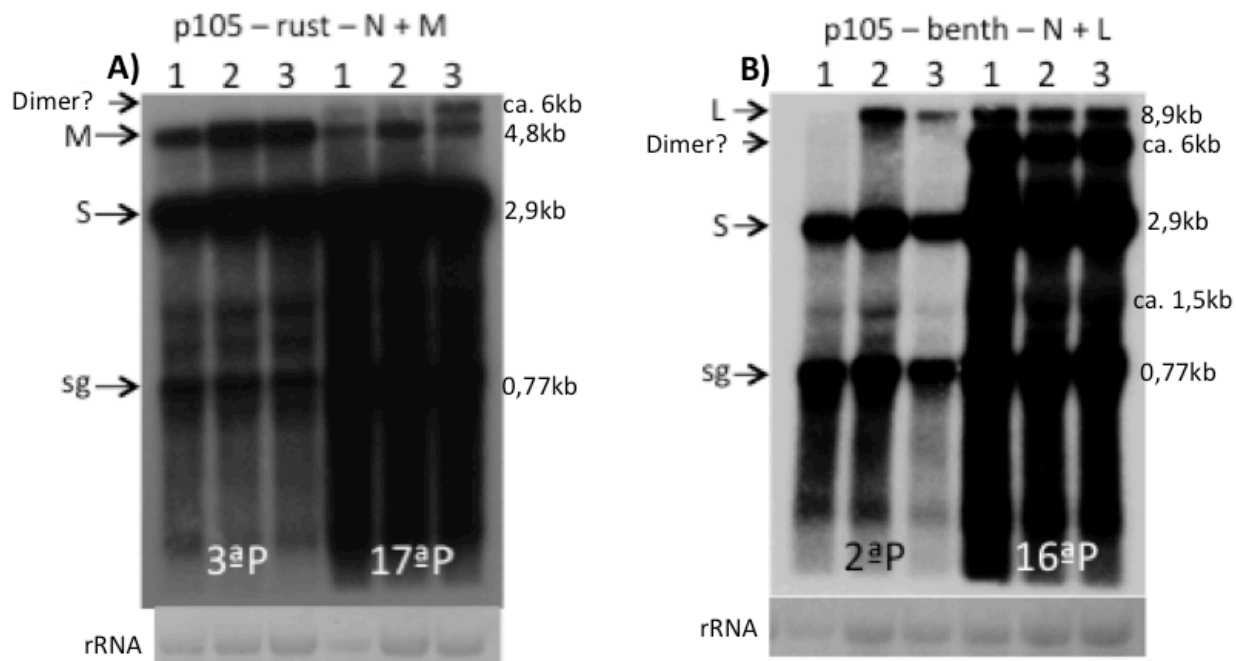
**Figura 28. Perfil de bandejamento de RNAs virais marcados com sonda para o gene NSs do S RNA do isolado p105 de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantido em *Nicotiana benthamiana*.** O isolado p105 foi mantido por inoculação mecânica em plantas de *N. benthamiana*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P – número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G – RNA viral de tamanho genômico. Dimer? – nova espécie de RNA viral associada ao S RNA com tamanho compatível com o de um dímero. rRNA – controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno.



**Figura 29.** Perfil de bandeamento de RNAs virais marcados com sonda para o gene NSs do S RNA dos isolados BR-20 (A) e p105 (B) de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) mantido em *Nicotiana rustica*. Os isolados BR-20 e p105 foram mantidos por inoculação mecânica em plantas de *N. benthamiana* e passados para *N. rustica*. RNA total foi extraído de três plantas diferentes à 8-10d.p.i. para cada ponto da passagem sequencial. P – número de passagens mecânicas para o conjunto de três amostras indicado. G – RNA viral de tamanho genômico. Dimer? – nova espécie de RNA viral associada ao S RNA com tamanho compatível com o de um dímero. rRNA – controle de carregamento de amostras de RNA total, bandas de RNA ribossomal coradas com azul de metileno.

Quando o isolado p105 foi passado de *N. benthamiana* para *N. rustica*, a banda de altura superior ao RNA viral genômico S só foi visualizada após um tempo de exposição do filme para raios-X a membrana cinco vezes superior ao tempo normalmente utilizado durante os experimentos (5 horas e 1 hora, respectivamente).

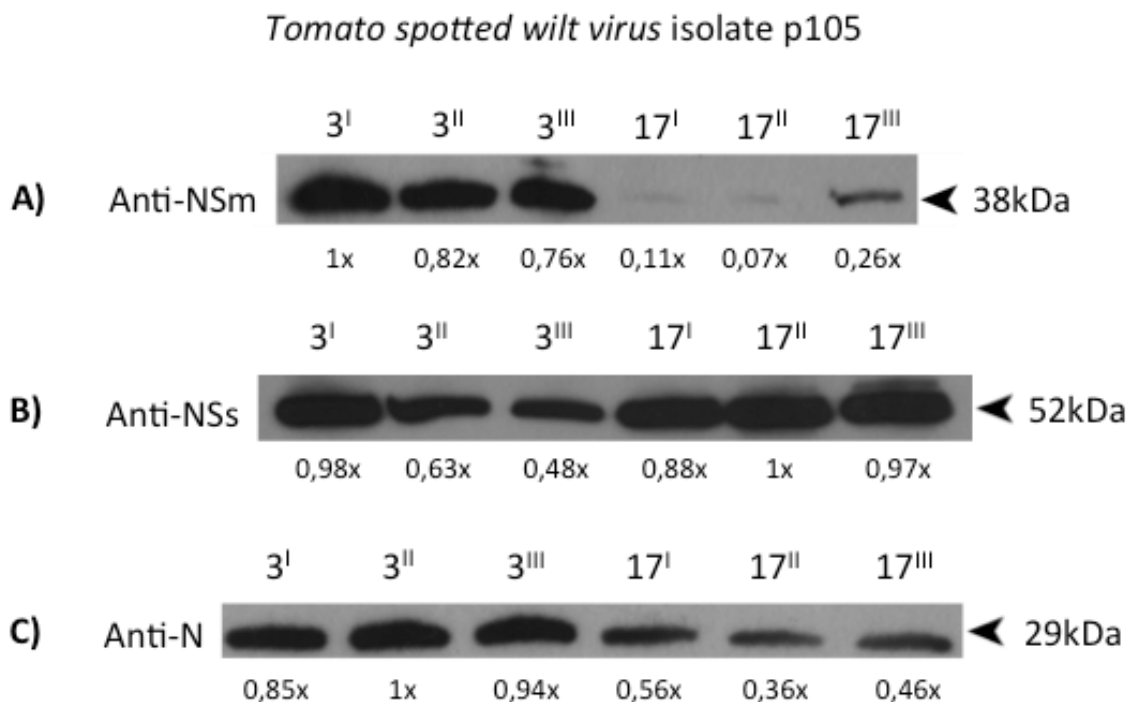
A análise do bandeamento para o segmento M não demonstrou alterações entre isolados ou entre hospedeiros (dados não mostrados). Uma análise de dupla hibridização com sondas para o segmento S e para o segmento M revelou que a banda viral de tamanho superior ao segmento genômico S é ligeiramente superior também ao segmento genômico viral M (Figura 30A). Uma segunda análise comparativa entre o padrão de hibridização para o segmento S e o segmento L demonstrou que a nova banda viral é menor que o segmento L (Figura 30B).



**Figura 30. Estimativa do tamanho do novo RNA viral associado ao S RNA do isolado p105 de *Tomato spotted wilt virus*.** Amostras de RNA total de plantas da 3ª e 17ª passagens (A) e 2ª e 16ª passagens (B) seriadas do isolado p105 de TSWV foram hibridizadas com duas sondas diferentes em cada experimento. Em A), a dupla marcação foi feita com sondas para o gene N e o gene NSm e em B) com sondas para o gene N e para o gene L. L - RNA genômico L. M - RNA genômico M. S - RNA genômico S. sg - RNA subgenômico do gene N (segmento S). Dimer? - nova espécie de RNA viral associada ao segmento S. rRNA - banda de RNA ribossomal utilizada como controle de carregamento das amostras de RNA total (membrana corada com azul de metileno).

A análise da expressão de proteínas foi realizada para o isolado p105 em *N. benthamiana*, visto o aparecimento de uma espécie inesperada de RNA viral. Para tanto, o isolado p105 de 2ª e 16ª passagens foi passado mais uma vez no mesmo hospedeiro. Os western blots foram realizados com antissoros policlonais para as proteínas N, NSs e NSm (estes dois últimos, cortesia do Dr. Richard Kormelink, WUR, Holanda) e os resultados mostram variações interessantes no perfil de expressão entre p105 à maior ou menor número de passagens. Para a proteína NSm do isolado p105 na 3ª passagem foi detectada uma expressão significativamente maior do alvo quando comparado com a 16ª e 17ª passagens (Figura 31 A). Em contraste, a expressão da proteína NSs foi ligeiramente superior para p105 na 17ª passagem do que na 3ª passagem (Figura 31 B). Curiosamente, a expressão da proteína do nucleocapsídeo (N) foi maior para p105 na 3ª passagem do que na 17ª passagem (Figura 31 C). Tendo em vista a presença da nova espécie de RNA viral derivada do

segmento S, é possível que esta tenha implicações sobre a expressão gênica do isolado entre as passagens iniciais e finais.



**Figura 31. Comparação do padrão de expressão gênica das proteínas NSm, NSs e N entre a 3ª e a 17ª passagens do isolado p105 de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em *Nicotiana benthamiana*.** A) Detecção da proteína NSm. B) Detecção da proteína NSs. C) Detecção da proteína N. Anticorpos contra as proteínas NSs e NSm são cortesia do Dr. Richard Kormelink (WUR, Holanda). As setas na lateral direita das imagens indicam cada banda específica detectada e seu peso molecular estimado. Números 3 e 17 indicam o número seriado da passagem coletada. I, II e III são réplicas biológicas experimentais (i.e., diferentes plantas inoculadas com uma mistura de material infectado proveniente da 2ª e 16ª passagens, respectivamente). Os valores numéricos abaixo de cada *blot* indicam a intensidade de pixels de cada banda comparada a banda de maior intensidade em cada *blot*.

Em relação às características fenotípicas dos dois isolados de TSWV é interessante notar que mesmo BR-20 sendo um isolado com alta concentração de DIs, com uma acumulação significativa deste tipo de espécie viral de RNA, sua sintomatologia foi mais intensa que a provocada por p105 em *N. benthamiana*. De fato, BR-20 provocou necrose sistêmica e morte das plantas de *N. benthamiana* com intensidade e frequências superiores às da infecção por p105 seja em maior ou menor número de passagens mecânicas sequenciais. A comparação entre os dois números de passagem para BR-20 em *N. benthamiana* demonstrou um pequeno

atraso no tempo do desenvolvimento dos sintomas sistêmicos, variando entre um e dois dias a mais para o isolado de 19ª passagem em relação ao de segunda passagem. Para p105 não foi visualizada diferença de sintomatologia entre 2ª e 16ª e 3ª e 17ª passagens neste hospedeiro.

O isolado BR-20 em *N. rustica* provou-se igualmente virulento (i.e., capaz de produzir sintomas e causar mortalidade em proporção similar das plantas inoculadas e no mesmo espaço de tempo) seja na 3ª ou na 20ª passagens, assim como p105 (dados não mostrados). Embora o isolado BR-20 tenha sido mais virulento, em termos da sintomatologia, do que p105 em *N. benthamiana*, para *D. stramonium* foi p105 o isolado mais virulento (dados não mostrados). De fato, para p105 o tempo transcorrido para a infecção sistêmica foi menor do que para BR-20 e as plantas de *D. stramonium* infectadas com p105 apresentavam completa parada da produção de novas folhas e expressão dos típicos sintomas necróticos, de mosaico leve, de distorção foliar e mortalidade comumente associados a TSWV neste hospedeiro.

A passagem de BR-20 em *D. stramonium* foi marcadamente mais lenta do que em *N. benthamiana*. Para a primeira, os sintomas sistêmicos eram visualizados a partir de 14 a 21 dias após a inoculação mecânica e para a segunda, tipicamente entre sete e dez dias após a inoculação apareciam os sintomas sistêmicos seguidos de morte das plantas entre 48 e 72h após o aparecimento destes sintomas.

Em nenhum dos casos, seja para hospedeiro, ou para isolado e para diferença de número de passagens, foi visualizado fenótipo de recuperação da infecção pelas plantas hospedeiras.

## **Discussão**

Este trabalho apresenta um aprofundamento da descoberta de uma espécie de RNA viral associada ao S RNA de caráter dimérico denominado *imperfect dimer RNA* (ID-RNA) apresentado no capítulo 1. Em contraste ao que foi visualizado para a

espécie *Polygonum ringspot virus* (PolRSV) na qual os ID-RNAs se acumularam intensamente a partir da primeira ou segunda passagem por inoculação mecânica do vírus em *N. benthamiana*, apresenta-se aqui a acumulação de ID-RNAs para o isolado p105 de TSWV associada a sucessivas passagens mecânicas com alta pressão de inóculo apenas após diversas passagens do isolado. Curiosamente, em concordância com os resultados apresentados no Capítulo 1, neste trabalho, verificou-se que a geração de RNAs diméricos do segmento S foi restrita apenas ao isolado p105 de TSWV, não tendo sido detectada a sua presença para outro isolado, BR-20. Inoue-Nagata e colaboradores (1998) já haviam caracterizado um dímero perfeito (*head-to-tail*) de uma molécula de DI-RNA derivado do segmento L, mas de tamanho inferior a 3kb. A nova variante de RNA viral aqui descrita, apresenta algumas características que indicam tratar-se de um dímero do S RNA, como seu tamanho ser inferior ao segmento L, mas superior ao segmento M, possuindo em estimativa entre 5 e 7kb. Esta avaliação de tamanho associada a uma avaliação de sequência, apresentada no Capítulo 1, Figura 22, sugere que o novo RNA viral encontrado é de caráter dimérico e originada do segmento genômico S RNA.

Curiosamente, embora sejam dois isolados da mesma espécie viral, BR-20 e p105 apresentaram perfis de acumulação de RNAs virais defeituosos distintos. Para o isolado p105, as sucessivas passagens mecânicas estimularam mais a síntese de um dímero do S RNA como molécula defectiva, em detrimento aos DI-RNAs derivados do segmento L. Para o isolado BR-20 não houve nenhum sinal de produção de espécies de RNA derivadas do S ou M RNAs, mas houve uma forte acumulação de duas espécies de DI-RNA a partir da 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> passagens, que foram substituídas, ao longo das passagens seriadas, por uma única espécie predominante de RNA de tamanho menor ao das espécies previamente detectadas. Este processo está de acordo com o cânone da geração de RNAs defectivos-interferentes derivados do segmento L como descrito por Resende e colaboradores (1991; 1992).

A análise da expressão das proteínas NSm, NSs e N do isolado p105 em *N. benthamiana* indica que o efeito da acumulação do possível dímero do segmento S foi inconclusivo para a expressão de NSs (Fig. 31B) e negativo para expressão da

proteína N (Fig. 31C). No entanto, a diferença mais expressiva entre menor e maior número de passagens se deu para a proteína NSm (Fig 31A). Neste caso, o vírus da 3ª passagem expressou significativamente mais proteína NSm do que na 17ª passagem. Os mesmos resultados de expressão diferencial entre passagens para a proteína NSm também foram vistos entre amostras da 2ª e 16ª passagens (dados não mostrados).

Sabe-se que a produção de formas defectivas durante infecções virais, embora seja um processo estocástico, pode servir como um meio de redução da virulência em relação a um hospedeiro e está, portanto, associada à adaptação do vírus ao organismo celular parasitado (Resende et al., 1991, Resende et al., 1992). Diferentes vírus geram diferentes tipos de defectivos e, em alguns casos, os defectivos podem até ser incrementadores da virulência, como descrito por Simon e colaboradores (Simon et al., 2004). No entanto, na maioria dos casos, as moléculas de genoma viral defectivas e as proteínas defectivas servem para frear a infecção viral (i.e., aumentar a sobrevivência das células e organismos infectados), pois são materiais genéticos “inócuos” agindo como competidor de genomas WT, ou são proteínas com perda de função, seja ela estrutural (i.e., de proteção do material genético do vírus) ou enzimática, interagindo e “ocupando” o material genético viral WT.

Ao manter o hospedeiro vivo por mais tempo, o vírus aproveita-se para maior reprodução do seu material genético e mais montagem de novas partículas virais nas células infectadas, além de gozar de mais tempo para que possa ser transmitido entre organismos hospedeiros. Hospedeiros muito suscetíveis a vírus, portanto, são aqueles onde provavelmente este fenômeno seria mais benéfico ao patógeno e, coincidentemente, são eles os principais hospedeiros para a produção de DIs de TSWV como descrito por Inoue-Nagata e colaboradores (1997).

Logo, tanto os DI-RNAs do segmento L quanto o recém-descoberto dímero do segmento S (Capítulo 1) estão, provavelmente, cumprindo a mesma função de atenuação da infecção viral. No entanto, estariam estas duas variantes de defectivos

atuando da mesma maneira? E qual seria a relação entre a acumulação do possível dímero do S RNA e a notável diminuição da expressão da proteína NSm? Se considerado o mecanismo de competição com WT e acumulação preferencial comumente empregado para elucidar o efeito interferente de DI-RNAs, explica-se apenas a atuação interferente dos DIs do RNA L, que são menores do que seu parental WT e portanto poderiam replicar-se mais em relação ao parental, mas não explica-se o efeito de atenuação de uma molécula de RNA maior do que o parental.

A diferença de padrões de expressão gênica e síntese de moléculas defectivas entre dois isolados da mesma espécie viral levanta a questão dos critérios considerados na classificação para o gênero *Tospovirus* e o papel da adaptação a diferentes hospedeiros. Os isolados p105 e BR-20 são 98,4% idênticos em sequência de aminoácidos para a proteína N, 97,2% idênticos para NSs, 94,8% para a proteína L, 97,6% para a proteína NSm e 96% para o precursor glicoproteico, de acordo com as sequências depositadas no GenBank (L, M e S RNAs do isolado p105 - KJ575620.1, KJ575621.1 e DQ376178.1, respectivamente; L e M do isolado BR-01 e S do isolado BR-20 - NC\_002052.1, NC\_002050.1 e DQ915948.1, respectivamente, assumindo-se que o isolado BR-01 e BR-20 são idênticos). Ambos isolados foram passados sequencialmente por inoculação mecânica em plantas de *N. benthamiana* por mais de 15 vezes. O isolado p105 era proveniente de passagens em *D. stramonium* antes da transmissão pelo vetor e o isolado BR-20 era proveniente de passagens na própria *N. benthamiana* pois não infectava bem *D. stramonium*. Além disso, verificou-se que enquanto a replicação do possível dímero do segmento S é alta em *N. benthamiana*, há uma redução de eficiência e possível desaparecimento do mesmo em *N. rustica*. Este resultado indica que o fenômeno de geração de dímeros está relacionado ao hospedeiro *N. benthamiana*, tal qual visto nos resultados obtidos para PolRSV no Capítulo 1. Para os DIs do segmento L visualizados para o isolado BR-20 a passagem em *N. rustica* parece manter e até aumentar a intensidade das espécies virais defectivas.

Embora os isolados p105 e BR-20 de TSWV tenham sido mantidos tanto em *N. benthamiana* quanto *D. stramonium* de maneira sequencial, apenas os resultados



para *N. benthamiana* e *N. rustica* são mostrados aqui. O material vegetal infectado de *D. stramonium* foi coletado para cada ponto de passagem mecânica, assim como para *N. benthamiana*, mas não foi analisado por ensaios de hibridização devido a questões de tempo para regresso ao Brasil após o período de doutorado sanduíche.

Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados evidenciam também o papel do organismo hospedeiro em suas interações com o complexo de replicação viral. Somente nos últimos 5 a 10 anos as interações proteína-proteína e RNA-proteína entre vírus e hospedeiro, começaram a ser investigadas com maior profundidade para tospovírus. Seu conhecimento é de suma importância para o completo entendimento do ciclo infeccioso deste importante patógeno vegetal.

### **Perspectivas do trabalho**

Tendo em vista a diferença de síntese de moléculas de RNA virais defectivas, a análise por meio de técnicas de sequenciamento de nova geração dos isolados p105 e BR-20 de TSWV mantidos tanto em *N. benthamiana* quanto em *D. stramonium* pode não apenas revelar a sequência nucleotídica destes defectivos, confirmando a hipótese de dímero para o defectivo do segmento S, como também mostrar as diferenças de expressão gênica e de seleção de quasi-espécies virais nessas diferentes populações de amostras mantidas nas duas espécies hospedeiras.

## 8. Capítulo 3: Estratégias para o desenvolvimento de um sistema de genética reversa para o gênero *Tospovirus*

### Introdução

Nesta tese são descritas as estratégias de construção de um sistema de genética reversa para tospovírus baseada na co-inoculação de vírus completo por inoculação mecânica e agroinfiltração ou inoculação mecânica *in planta* de DI-RNAs, e co-inoculação de vírus envelopados purificados e DI-RNAs/molécula “tipo-DI” por meio de transfecção mediada por polietilenoglicol (PEG) em preparações de protoplastos. É apresentada também a construção de um cassete repórter contendo GFP flanqueado pelas regiões UTR de um DI-RNA e a tentativa de fazê-lo funcionar como um mini-genoma replicante por meio de co-inoculação. Além disso, é também apresentada pela primeira vez, a tentativa de realizar genética reversa por meio de rearranjo em condições de alta pressão seletiva para resgate de um gene NSs não-funcional por um, funcional, exogenamente introduzido via inoculação mecânica de transcritos do S RNA. Embora diferentes estratégias tenham sido desenvolvidas e técnicas ultrasensíveis tenham sido usadas para detecção, não foi possível detectar incremento temporal na acumulação do DI-RNA introduzido e/ou a ativação do gene repórter e/ou o resgate da cópia funcional de NSs.

São também apresentados os resultados de atividade de mini-replicon [i.e., mini-genomas sintéticos tipo-DI RNA cuja ORF foi substituída por genes-repórter GFP ou *Renilla* luciferase WT e humanizada (hRLuc)] em células de hamster (*Mesocricetus auratus*, BSR-T7) e mosquito (*Aedes albopictus*, C6/36-T7). Este sistema experimental foi desenhado de tal forma que a atividade dos genes-repórter fosse condicional a expressão e atividade biológica das proteínas estruturais de TSWV associadas a formação de ribonucleoproteínas (RNPs) biologicamente ativas (i.e., complexos de replicação viral, do inglês *virus replication complex*, VRC). Aqui são apresentados pela primeira vez na história científica dados qualitativos de um sistema de genética reversa baseado na atividade de mini-replicon funcional para o gênero *Tospovirus*.

## Objetivos específicos

- Estabelecer prova conceitual de funcionamento de um sistema de genética reversa baseado em DI-RNAs
  - Provar que DI-RNAs introduzidos exogenamente no contexto de uma infecção viral podem ser reconhecidos e replicados pelo vírus-auxiliar
  - Estabelecer prova conceitual de funcionamento de um sistema de genética reversa baseado em rearranjo de segmentos S em contexto de pressão seletiva favorável
  - Estabelecer prova conceitual de funcionamento de um sistema de genética reversa baseado em expressão de gene-repórter a partir de atividade de mini-replicon
  - Gerar clone infeccioso de TSWV por meio de co-transfecção dos segmentos genômicos e proteínas virais em células de inseto e mamífero

## Material e métodos

### Expressão transiente em plantas infiltradas por *Agrobacterium tumefaciens* (ATTE)

A linhagem C58 de *A. tumefaciens* foi utilizada para transformação por eletroporação e choque térmico para incorporação de vetores binários contendo diferentes genes de interesse. Para os ensaios de expressão transiente, colônias isoladas de placas de transformação ou de estoques em glicerol (16,66% de glicerol de concentração final) foram semeadas em 2ml de meio 2xYT líquido suplementado com antibióticos (canamicina e tetraciclina) e mantidas sob agitação constante (28°C a 250RPM) ao longo de uma noite. No dia seguinte os 2ml de cultura eram vertidos em Erlenmeyers e eram adicionados 8 ou 18ml (dependendo da quantidade de plantas que se desejava infiltrar) de meio 2xYT suplementado com antibióticos, acetosyringone e MES 0,5M, pH 5,0 de modo que a concentração final de MES fosse equivalente a 10mM e a de acetosyringone a 100µM. Novamente as culturas eram

mantidas em crescimento nas mesmas condições por mais um dia e, finalmente, no terceiro dia, as culturas eram vertidas em tubos falcon de 50ml estéreis e centrifugadas a 6.000RPM em um rotor de ângulo fixo GSA em uma centrífuga RC-5B Superspeed (Sorvall – Thermo Scientific) por 10min a temperatura ambiente ou a 4°C. Após centrifugação adicionava-se igual volume de tampão de inoculação (MgCl<sub>2</sub> 10mM, MES 10mM, pH 5,8 e Acetosyringone 100µM) ou uma mistura de tampão de inoculação (10% v/v) e água milli-Q diluindo a cultura até OD<sub>600</sub> final de 0,5. Em seguida, deixava-se solubilizar o pellet por agitação suave em equipamento de solubilização por inclinação de mesa e, após solubilização, deixava-se as culturas sobre a bancada por ao menos duas horas a temperatura ambiente para então proceder-se a inoculação das culturas de *Agrobacterium* em folhas jovens de plantas de *N. benthamiana* entre os estádios de 2 a 4 folhas completamente expandidas. Para a inoculação procedia-se com seringa de 5ml sem agulha (Terumo®), encostando a abertura da seringa já carregada com a solução de *A. tumefaciens* na superfície abaxial das folhas escolhidas, realizando leve pressão sobre o êmbolo e envolvendo a folha com os dedos na região do contato com a abertura da seringa pelo lado adaxial da folha sem realizar pressão (a fim de não rasgar o tecido foliar), formando uma espécie de “sanduíche”. Nos ensaios de ATTE para potencializar a expressão dos transgenes utilizava-se sempre uma mistura destes com dois supressores de silenciamento gênico virais: p19 de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV – *Tombusvirus*) e NSs de TSWV

#### Produção de protoplastos de *N. benthamiana*

Protoplastos viáveis de *N. benthamiana* foram gerados a partir de material foliar de plântulas jovens (8 a 16 semanas) crescidas em condição de esterilidade em recipientes plásticos (Magenta Box - Sigma-Aldrich) ou a partir de folhas de plantas crescidas em vasos com terra. A geração dos protoplastos era feita por meio de digestão enzimática a partir de um coquetel de celulisina (0,6g) e macerase (0,06g) (Calbiochem) na presença de BSA (0,6g) (Sigma-Aldrich) diluído em manitol

10% (p/v) para um volume final de solução de 40ml, suficiente para preencher duas placas de petri estéreis convencionais de plástico (Sarstedt). Após diluição das soluções enzimáticas com o auxílio de barra e agitador magnético, procedia-se a colheita das folhas. Folhas provenientes de Magenta Box eram simplesmente destacadas dos ramos a partir da ponta do pecíolo com a ajuda de uma pinça estéril e colocadas com a superfície abaxial virada para cima sobre uma placa de petri estéril. As folhas coletadas eram, uma a uma, levemente feridas (a cabeça de algodão era rolada no máximo três vezes) com uma haste de algodão flexível com a ponta embebida em solução estéril de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05M, pH 7,0 contendo 1% (p/v) de celite branca (esta solução era sempre mantida gelada e brevemente ressuspensa no momento do uso), e imediatamente colocadas com a parte abaxial virada para baixo sobre a solução enzimática. O processo era feito até obter cobertura completa da superfície da solução enzimática, empregando entre 15-25 folhas. Para as amostras foliares vindas de plantas crescidas em vasos na casa de vegetação primeiro era feito um banho da folha em solução de manitol 10% estéril e em seguida procedia-se ao corte das nervuras mais grossas das folhas com o auxílio de um bisturi estéril. Após a remoção dos tecidos vasculares o mesofilo restante era cortado em tiras finas, era feita a abrasão com a haste flexível de algodão e somente então o material era posto na placa para digestão. Uma vez completadas as placas, passava-se Parafilm M® (Bemis) para vedá-las e se mantinha em agitação orbital por 3-4h a 50-60RPM a temperatura ambiente e protegidas da luz. Após este tempo, as soluções de coloração amarelo-palha mudavam de cor tornando-se completamente esverdeadas devido a liberação dos protoplastos. A seguir, procedia-se a filtração da solução enzimática por dupla camada de Miracloth® (Calbiochem) estéril com o auxílio de um funil, de modo a verter as células (já completamente ressuspensas com o auxílio de pipetas de plástico estéreis de 25ml) pela parede de tubos de centrífuga de vidro sem tampa de 30ml (Sorvall – Thermo Scientific). Em continuidade, procedia-se a primeira centrifugação a fim de remover as células da solução enzimática. A centrifugação era feita em rotor HB-4 (*swinging bucket*) a velocidade de 950RPM em uma centrífuga RC-6 (Sorvall – Thermo Scientific) a temperatura de 20°C por 5min. Após centrifugação procedia-se a remoção do sobrenadante com

pipeta de plástico estéril de 10ml, deixando aproximadamente 500µl a 1ml de solução no fundo do tubo. O pellet contendo os protoplastos era completamente ressuspenso nesse volume residual e eram adicionados 20ml de manitol 10% (p/v) estéril gelado. Novamente procedia-se a centrifugação nas mesmas condições e removia-se o sobrenadante. Mais uma vez o pellet era completamente ressuspenso no volume residual e outros 15ml da solução de manitol eram adicionados e os tubos centrifugados mais uma vez nas mesmas condições. Após esta terceira centrifugação o sobrenadante era mais uma vez removido e o pellet ressuspenso no volume residual. Desta vez, 10ml da solução de manitol eram adicionados e, com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro autoclavada, 5-10ml de solução de sacarose a 20% (p/v) em água Milli-Q estéril eram cuidadosamente adicionados sob a solução de manitol rica em protoplastos. Os tubos eram mais uma vez centrifugados com as mesmas configurações anteriores e após o término eram cuidadosamente retirados do rotor e colocados em um apoio sobre uma superfície plana. Tipicamente, uma banda grossa verde ou uma zona mais esverdeada eram visualizadas próximas a interfase entre a solução de manitol e a solução de sacarose. Todo o conteúdo verde acima da interfase era coletado e vertido pela parede de outro tubo de vidro ou tubo falcon de plástico estéril e após o término da coleta, uma pequena fração de 6-12µl era retirada para contagem de células viáveis usando uma lâmina de acrílico FastRead® 102 (Immune Systems) para contagem “manual”. Tipicamente se utilizava de  $10^5$  a  $10^6$  células por cada réplica de cada tratamento realizado. Uma vez determinado o volume referente a quantidade de células e o número de réplicas e tratamentos, procedia-se a separação das alíquotas usando pipeta semi-automática de 1000 a 100µl (Eppendorf) e ponteiros de 1ml autoclavados em tubos de ensaio de vidro (volume total  $\leq$  10ml) autoclavados. Os tubos de 10ml eram adicionados de dois a dois diretamente nos receptáculos do rotor HB-4 e centrifugados nas mesmas condições já descritas. Novamente os sobrenadantes eram descartados, com o auxílio de pipetas Pasteur de vidro, e os pellets remanescentes mantidos em volume residual (50-100µl) para transfecção mediada por PEG.

### Transfecção de protoplastos de *N. benthamiana* mediada por PEG

Para a transfecção mediada por PEG foram utilizadas dois pesos moleculares de PEG, de peso molecular 6000 (Calbiochem) e de peso molecular 1450 (Sigma-Aldrich). Em ambos os casos, primeiro se colocava as partículas virais ou RNP ou RNA de transcrição *in vitro* e incubava-se com o pellet promovendo leve agitação para garantir o espalhamento do material que se desejava transfectar.

A partir deste ponto, para PEG6000 adicionava-se aos protoplastos 500µl de uma solução a 40% (p/v) estéril, adicionada de CaCl<sub>2</sub> a concentração final de 10mM, seguida de ressuspensão total do pellet de células por agitação durante 30 segundos, seguida de adição de mais 5ml de solução de manitol a 10% (p/v) adicionada de CaCl<sub>2</sub> a concentração final de 10mM. Os tubos de ensaio eram deixados por 30min a temperatura ambiente e depois procedia-se as centrifugações e lavagem dos pellets com 1ml da solução de manitol com CaCl<sub>2</sub> usando as mesmas condições de centrifugação descritas anteriormente na preparação dos protoplastos por três vezes.

Para PEG1450, antes de incubar as amostras a serem transfectadas com RNA ou material viral preparavam-se novos tubos de ensaio com 100µl de solução de PEG1450 a 40% adicionada de CaCl<sub>2</sub> a concentração final de 3mM preparada na hora a partir de estoques de PEG1450 a 50% (p/v) e CaCl<sub>2</sub> a 1M com água Milli-Q estéril. A solução de PEG1450 a 40% era mantida no gelo. Após incubação e leve mistura dos pellets de protoplastos com o material a ser transfectado, coletava-se todo o conteúdo do tubo de ensaio e pipetava-se dentro da solução de PEG1450 no outro tubo procedendo imediatamente a ressuspensão da solução por agitação manual moderada por 10 segundos. Em seguida adicionava-se 1ml de solução de manitol a 10% (p/v) estéril e agitava-se novamente para completa dissolução da solução de PEG1450 na solução de manitol. Os tubos eram então mantidos no gelo por 15 a 20 minutos e posteriormente centrifugados nas mesmas condições já descritas para lavagem dos pellets com 1ml solução de manitol por três vezes.

Por fim, em ambos os casos os pellets eram ressuspensos em 1ml de solução de sais de Aoki (Aoki & Takebe, 1969) suplementada com gentamicina, e os tubos de ensaio mantidos a temperatura ambiente, com as aberturas cobertas por Parafilm® M, em cima de uma bancada iluminada. Para a coleta de proteínas e RNA do tempo zero e dos outros tempos de coleta procedia-se a extração por meio de centrifugação e remoção da solução de Aoki. Em seguida, os pellets eram lisados com 100µl de tampão de extração de proteínas como descrito na metodologia do capítulo 1, por meio de pipetagem e transferidos para tubos limpos novos e armazenados imediatamente a -80°C. Posteriormente, retirava-se as amostras do freezer e mantinha-se em gelo para adição de igual volume de Cracking buffer suplementado com 2-Mercaptoetanol. Após homogeneização e ebulição procedia-se a eletroforese utilizando 10µl de amostra por poço em sistema PAGE Mini-Protean (Bio-Rad). Para a extração de RNA, após a remoção da solução de Aoki mantinha-se os pellets nos tubos de ensaio diretamente a -80°C. Para a extração, adicionava-se 500µl de Lysis buffer do kit Spectrum™ Plant Total RNA (Sigma-Aldrich) dentro dos tubos de ensaio com os pellets ainda congelados e homogeneizava-se as amostras por pipetagem, posteriormente seguindo o protocolo do manual do kit.

#### *Inoculação mecânica de transcritos de RNA*

Para a inoculação mecânica dos transcritos de RNA produzidos *in vitro* com o kit MaxiScript® (Ambion) ou com a T7 RNA polimerase recombinante expressa e purificada a partir de *E. coli* (Fermentas) procedia-se a inoculação mecânica diluindo as reações de transcrição *in vitro* (20 ou 50µl, respectivamente) em volume final de 200µl em tampão de inoculação de transcritos [0,05M fosfato de sódio monobásico; 50mM glicina pH 9,0; 1% (p/v) bentonita; 1% (p/v) celite] estéril. No mínimo 25µl (aprox.. 2µg de RNA) eram utilizados para inocular cada folha de cada planta tratada. As folhas tratadas eram enxaguadas abundantemente após 15min dos tratamentos.



## Síntese de cDNA e RT-qPCR

RNAs totais extraídos com o kit Spectrum™ Plant Total RNA (Sigma-Aldrich) das amostras de cada tratamento realizado envolvendo a expressão transiente de moléculas exógenas por meio de *Agrobacterium* foram tratadas com 1-2µl (10-20U) de DNaseI (Fermentas) por uma hora a 37°C antes da síntese de cDNA em reações de 20µl usando tipicamente 10µl de RNA total. A inativação da DNaseI era feita com 5µl de resina DNase Inactivation Reagent (Ambion) por meio de homogeneização por pipetagem seguida de precipitação da resina. Do sobrenadante acima da resina usava-se tipicamente 5µl de RNA total tratado para reações de 20µl de síntese de fitas simples de cDNA usando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Após o término da síntese de cDNAs as reações eram diluídas em 80µl de água Milli-Q e usava-se 1µl para cada reação de qPCR. Para a qPCR usava-se o iTaq™ universal SYBR® Green supermix ou iTaq™ universal TaqMan® supermix (Bio-Rad) de acordo com as instruções do fabricante para reações de 10µl de volume final. As PCRs em tempo-real foram feitas em dois aparelhos: StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ou CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). O método de quantificação usado foi a quantificação relativa, tendo como genes de referência citocromo oxidase (COX) ou RNA ribossomal 18S de *N. benthamiana*. Cada amostra foi repetida em triplicata nas placas para avaliação estatística dos valores individuais de Ct. A temperatura de anelamento foi 60°C em ambos os tipos de detecção (SYBR® Green ou TaqMan®). Todos os outros parâmetros da reação de PCR foram mantidos como o programa padrão de amplificação das máquinas, incluindo a *melting curve*. Resumidamente, a desnaturação inicial era feita a 95°C por 3min, seguida de 40 ciclos de 95°C por 10seg e 60°C por 30seg. Por fim, aquecia-se a 95°C por 10seg e procedia-se a curva de *melting* de 65 a 95°C com incrementos de 0,5°C e duração de 5seg.

A detecção de presença e/ou aumento de DI-RNAs e moléculas tipo DI-RNA foi feita por meio dos primers específicos TSWV-JS-DI-RealF [5'-AATGGAACCACTTTAGTGTTGTC-3'],

TSWV-JS-DI-RealRev [5'-GCTGTCTTTGCCATTAAGTAGGG-3'], DI-GRSV-RealF [5'-AACCTTTTAGGGATGATACAGCT-3'] e DI-GRSV-RealRev [5'-TCTAAGCTGGCGAGATTCA-3'].

As análises de regressão linear,  $\Delta\Delta C_t$  e outros cálculos, foram todas feitas nos próprios *softwares* dos instrumentos.

### Purificação de partículas virais completas e complexos RNP infecciosos

Para a purificação de partículas virais completas (envelopadas) fez-se uma adaptação de protocolos utilizados no IPSP (Itália) para a purificação de partículas de nucleorhabdovírus utilizando colchões de celite branca e filtração por sistema de vácuo. No mínimo 50g de material foliar sistemicamente infectado de *N. benthamiana* ou 100g de *D. stramonium* eram macerados em um liquidificador em diluição 1:10 (p/v) em tampão de extração com sacarose [Tampão fosfato de sódio 0,1M + sulfito de sódio 0,01M + 10% sacarose (p/v), pH 7,0] gelado. O líquido era coado em malha sintética de náilon, elastano, poliuretano e algodão (fibras-têxteis de uma meia-calça) e eram adicionados 20g de celite branca. Se deixava a solução em leve agitação com auxílio de barra magnética por 30 minutos a 4°C e depois filtrava-se sob sistema de vácuo passando em filtro de porcelana passando por fina camada de papel filtro (Whatman). A solução filtrada era colocada em gelo e o extrato de celite e o papel-filtro descartados. Novamente montava-se o sistema a vácuo, mas antes de versar a solução filtrada sobre o filtro de porcelana adicionava-se 10g de celite branca diretamente no filtro, espalhando-os homogeneamente a fim de formar um colchão cobrindo os poros do filtro. O novo filtrado era coletado e distribuído em tubos plásticos de 200ml e centrifugado em rotor GSA (Sorvall) a 10.000RPM por 20 minutos. Os *pellets* eram ressuspensos em volume final total de 50-100ml de tampão de extração sem sacarose e novamente centrifugados a 3000RPM em rotor GSA por 10min. Desta centrifugação coletava-se o sobrenadante e centrifugava-se a 30.000RPM em rotor R55.2 (Beckman-Coulter) por 1 hora. Os sobrenadantes eram descartados e os *pellets* ressuspensos em 2ml de tampão de extração e aplicados sobre gradiente de sacarose de 20-60% feito com tampão de

extração. Procedia-se a centrifugação a 35.000RPM em rotor SW41 Ti (Beckman-Coulter) por 2h e coletava-se uma banda branca fracamente opaca no último terço dos tubos para concentração a 100.000RPM por 1 hora em rotor TL 100 (Beckman-Coulter). Os *pellets* finais eram ressuspensos em 250-500µl de tampão de extração sem sacarose e usava-se tipicamente 10µl por transfecção de protoplastos.

Para purificação de RNPs utilizou-se o protocolo padrão para tospovírus do laboratório de sorologia e caracterização de vírus desenvolvido pela Dra. Marina Ciuffo. Aproximadamente 15g de folhas sistemicamente infectadas de *N. benthamiana* foram maceradas em liquidificador diluídas 1:5 em tampão de extração de RNPs (0,1M Tris-HCl, pH 8,0 + 10mM EDTA + 10mM DIECA + 10mM sulfito de sódio – alternativamente Tris-HCl pode ser substituído por acetato de sódio 0,1M, pH 5,2). O material homogeneizado era filtrado na mesma malha descrita no parágrafo anterior e centrifugado a 3.000RPM por 10 minutos em rotor GSA. Coletava-se os sobrenadantes e centrifugava-se a 40.000RPM em rotor R50.2 por 1 hora. Os *pellets* eram ressuspensos em 25ml de tampão de clareamento [Tris-HCl 0,01M, pH 8,0 ou Ac. de sódio 0,01M, pH 5,2 + 2% (p/v) de sulfobetaína + 1% (v/v) de Triton X-100] e se deixava em leve agitação com auxílio de barra magnética por 1 hora a 4°C. Em seguida, as amostras eram centrifugadas a 8.000RPM em rotor GSA por 10 minutos e os sobrenadantes coletados cuidadosamente, sem carregar detritos do *pellet*, e aplicados sobre colchão de sacarose a 20% (p/v) feito em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0 ou Ac. de sódio 0,01M, pH 5,2 para centrifugação a 40.000RPM por 75 minutos. O *pellet* final foi ressuspendido em 1ml de Tris-HCl ou Ac. de sódio (ambos a 0,01M) e centrifugado por 1 min a 13.400 em centrífuga de bancada (Eppendorf) para posterior centrifugação a 35.000RPM por três horas em gradiente de sacarose de 10-50% (p/v) feito em tampão Tris-HCl ou Ac. de sódio (ambos a 0,01M) em rotor SW41 Ti. Tipicamente eram coletadas todas as bandas brancas correspondentes ao complexo RNP genômico, misturadas as alíquotas e precipitadas a 100.000RPM por 1 hora em rotor TL 100. Por fim, o *pellet* era ressuspendido em 100-200µl de Tris-HCl ou Ac. de sódio (ambos a 0,01M).

Após purificação as amostras provenientes de ambos os protocolos de extração foram testadas ao menos uma vez para infectividade em plantas de *N. benthamiana* e *D. stramonium* em diferentes diluições de inóculo (1, 1/10, 1/50, 1/100 – diluições feitas em tampão de inoculação).

### Microscopia confocal a laser

As amostras de protoplastos transfetadas com construções tipo-DI contendo mGFP4 foram suavemente aspiradas (i.e., o líquido dos tubos de ensaio) para retirar o excesso de solução de sais de Aoki sem perturbar as células e posteriormente ressuspendidas em volume residual (150µl) ao momento da visualização. Alíquotas de 10µl foram aplicadas em lâminas FastRead® 102 (Immune Systems) e visualizadas em microscópio confocal a laser (Leica TCS SP2) configurado para emitir excitação na zona do vermelho (autofluorescência) e do verde (GFP). As amostras de controle negativo (protoplastos transfetados com água) foram usadas para calibrar os lasers a fim de reduzir o ruído de fundo (*background*) nas visualizações.

### Construção de plasmídeos contendo cassetes de expressão de DI-RNAs e moléculas tipo DI-RNAs

#### Construções sintéticas

Por meio de síntese química realizada pela companhia Epoch Life Science foram produzidas duas moléculas, cada qual correspondente ao RNA deficiente-interferente mais eficiente de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV) como descrito por Resende e colaboradores (1992). Estas moléculas são derivadas dos respectivos segmentos genômicos L e possuem ambas as regiões regulatórias não-traduzíveis (UTRs) de cada espécie. Ambas sequências virais são flanqueadas por um par de ribozimas derivadas de *Avocado sun blotch*

*viroid* (ASbVd, chamada HHRZ por ser do tipo cabeça-de-martelo, do inglês *hammer head*) e *Hepatitis delta virus* (HDV, chamada HDVRZ). Flanqueando externamente as ribozimas há dois promotores bacteriofágicos (T7 e Sp6) a fim de produzir transcritos em ambas orientações. Estas moléculas sintéticas foram clonadas em vetor pBlueScript SK+ nos sítios de restrição *SacI* e *KpnI* (Fig. 32, A e B).

Foram também geradas duas moléculas de “tipo defectivo-interferente” com tamanho mínimo, i.e., as moléculas carregam ambas as UTR’s do segmento genômico L de TSWV, mas ao invés de conter uma fase de leitura aberta codificante para a versão truncada da polimerase viral, foi inserido o gene da proteína verde fluorescente (GFP) otimizado para expressão em plantas (mGFP4). Essas duas moléculas sintéticas tipo-DI distinguem-se entre si pela presença ou ausência do par de ribozimas HHRZ e HDVRZ posicionadas nos flancos externos as UTR’s virais. À sequência contendo as ribozimas chamou-se DI-RZ e à sequência sem as duas ribozimas chamou-se DI-ROT (da sigla em inglês run-off transcription). Na construção em que faltam ribozimas foi buscado um sítio de restrição conveniente para a geração de uma extremidade 3’ do transcrito terminando rigorosamente no último nucleotídeo de origem viral. Ambas as sequências possuem sítios únicos para transcrição *in vitro* (TIV) guiada pela sequência promotora canônica do fago T7. A orientação das moléculas em relação ao promotor é tal que o RNA nascente é complementar ao RNA codificante para mGFP4, garantindo assim que apenas no caso de reconhecimento pela polimerase viral e posterior replicação dos construtos seja produzida a molécula repórter. As moléculas foram clonadas em pUC19 nos sítios de *BamHI* e *PstI*. Para a linearização dos plasmídeos contendo esses cassetes foram escolhidas as enzimas *PstI* e *BspEI* de corte único em toda a sequência (Figura 32, C e D).

### Vetores Binários

Os DIs mais eficientes de TSWV e GRSV (Resende et al., 1992) foram transferidos para pGreenII-62-SK+ nos sítios de *SacI* e *KpnI* (Figura 32, E e F). O

vetor pGreenII-62-SK+ possui promotor 35S simples e terminador 35S, ambos de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), e para expressão é dependente de co-agroinfiltração com o plasmídeo pSOUP, responsável pela expressão do gene *virA*, necessário para a eficiente ATTE.

Para a clonagem em vetor pJL89, os DIs foram amplificados de ribozima a ribozima do vetor pBluescript, usando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) fosforilados (Macrogen, Coreia do Sul), e o vetor pJL89 digerido com a enzima de restrição *SmaI*, que gera extremidades de terminação abrupta (*blunt end*). Logo, foram obtidos clones em ambas as orientações (RNA viral genômico – vgRNA e RNA viral complementar – vcRNA) dos genes de interesse em relação ao promotor 35S. O vetor pJL89 possui um duplo promotor 35S e antes do terminador NOS possui uma ribozima derivada de HDV. Em adição, o vetor carrega o gene *virA* em sua própria sequência (*backbone*) (Figura 32 G, H, I e J).

Para a clonagem das construções “tipo-DI” (i.e., mini-genomas contendo genes repórter cujas regiões UTR correspondem ao segmento L RNA), as moléculas sintéticas foram cortados do vetor pUC19 com *BamHI* e *PstI* e clonados em pGD cortado com as mesmas enzimas gerando um clone de expressão de mGFP4 (Figura 32 K) no qual a fita de RNA transcrita pelo promotor 35S do vetor era um ssRNA (+) para o gene repórter. Para obter a outra orientação das moléculas “tipo-DI” úteis para os ensaios de co-expressão com vírus ou proteínas virais *in planta* (ssRNA(-)) foi usado o vetor pBin61 cortado com as enzimas *BamHI* e *SmaI* (Figura 32 L). Neste caso, como os insertos das moléculas sintéticas tipo-DI em pUC19 não possuem sítios de *SmaI*, foi realizada primeiro uma digestão com *PstI* seguida de recessão da extremidade coesiva 3' por meio da atividade enzimática do fragmento grande (Klenow) da DNA polimerase I de *E. coli* para gerar uma extremidade abrupta (similar a *SmaI*), seguida de digestão com *BamHI* para clonagem em pBin61.

#### Outras construções geradas e/ou obtidas utilizadas

Para produção de transcritos sem ribozimas flanqueadoras foram usados *primers* fosforilados longos a fim de amplificar diferencialmente as UTRs 5' e 3' dos DIs de TSWV e GRSV. Os primers foram desenhados de modo a gerar, por meio do promotor T7, tanto transcritos vgRNA quanto vcRNA. *Amplicons* gerados por meio de enzima polimerase de alta fidelidade (Phusion Polymerase, NEB) foram clonados em vetor pUC18 linearizado com *Sma*I (Figura 32, M e N).

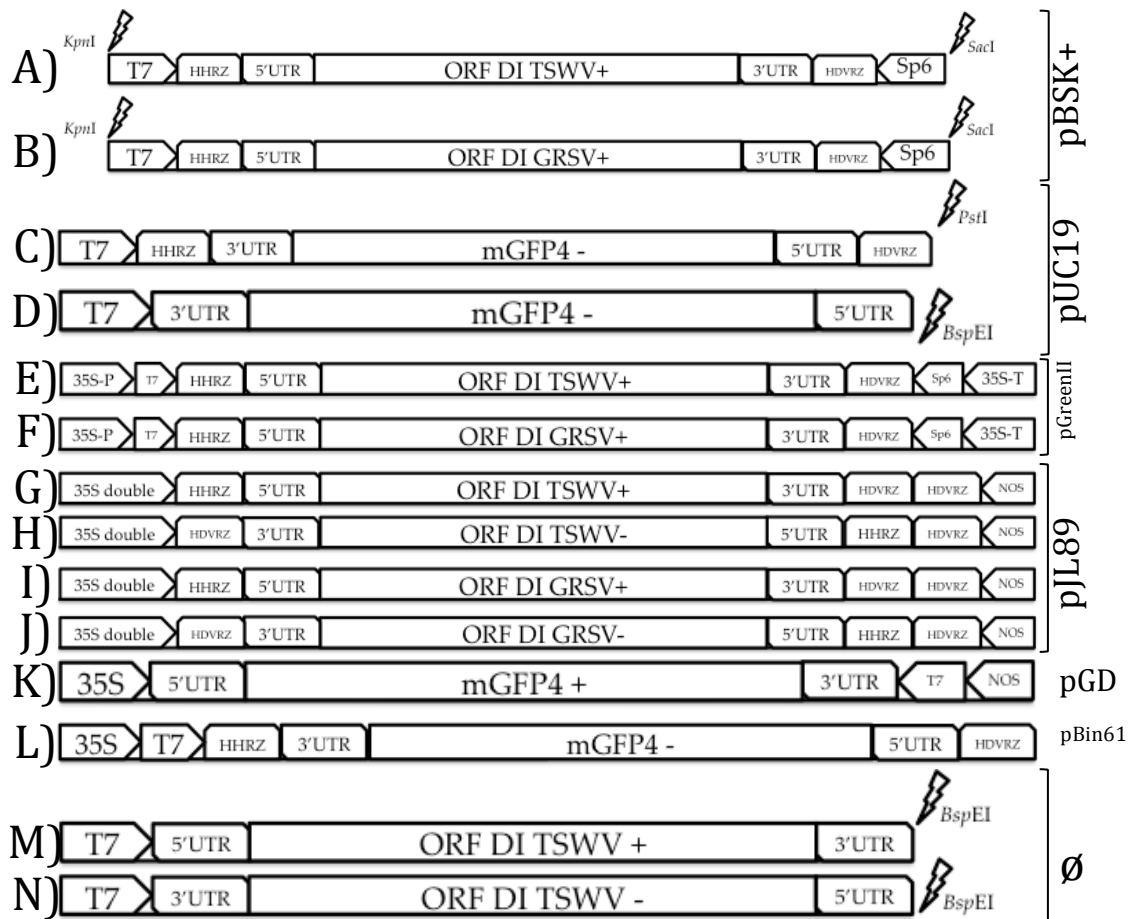
Construções similares à retratada acima, sem ribozimas e com sítio de linearização para TIV coincidente com o último nucleotídeo do vírus, foram feitas nas duas orientações dos segmentos S, M e L de TSWV BR-20 pela pós-doc Dr<sup>a</sup> Anelise Orílio, associada a este projeto de pesquisa na Universidade de Brasília, Brasil. Foram produzidos também clones em vetores binários da série pCAMBIA 2300 ou 0380 para expressão das proteínas vírais estruturais N e L e para os DIs de TSWV e GRSV contendo ribozimas flanqueadoras.

Foram usadas para diversos ensaios construções já produzidas previamente pelo grupo do Dr. Turina (IPSP-CNR, Turim, Itália). Entre elas, vetores binários expressando a proteína supressora de silenciamento gênico p19 de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) e a proteína NSs de TSWV, além de um vetor expressando mGFP4-ER. Foi cedida também construção de clone infeccioso de TBSV fusionado a GFP para TIV.

A Dr<sup>a</sup> Anelise Orílio, também gerou por meio da tecnologia de Gibson Assembly (desenvolvida pelo instituto de pesquisa do empreendedor em biotecnologia Craig Venter em 2009) clones dos três segmentos de TSWV em orientação vgRNA e vcRNA para TIV *run-off*. As sequências completas dos genomas foram fusionadas ao vetor pUB19 (derivado de pUC19, mas sem o gene LacZ). A Dr<sup>a</sup>. Orílio também produziu clones dos mRNAs da RdRp e da proteína N em vetor binário pK2.

#### Construções para transfecção de células animais

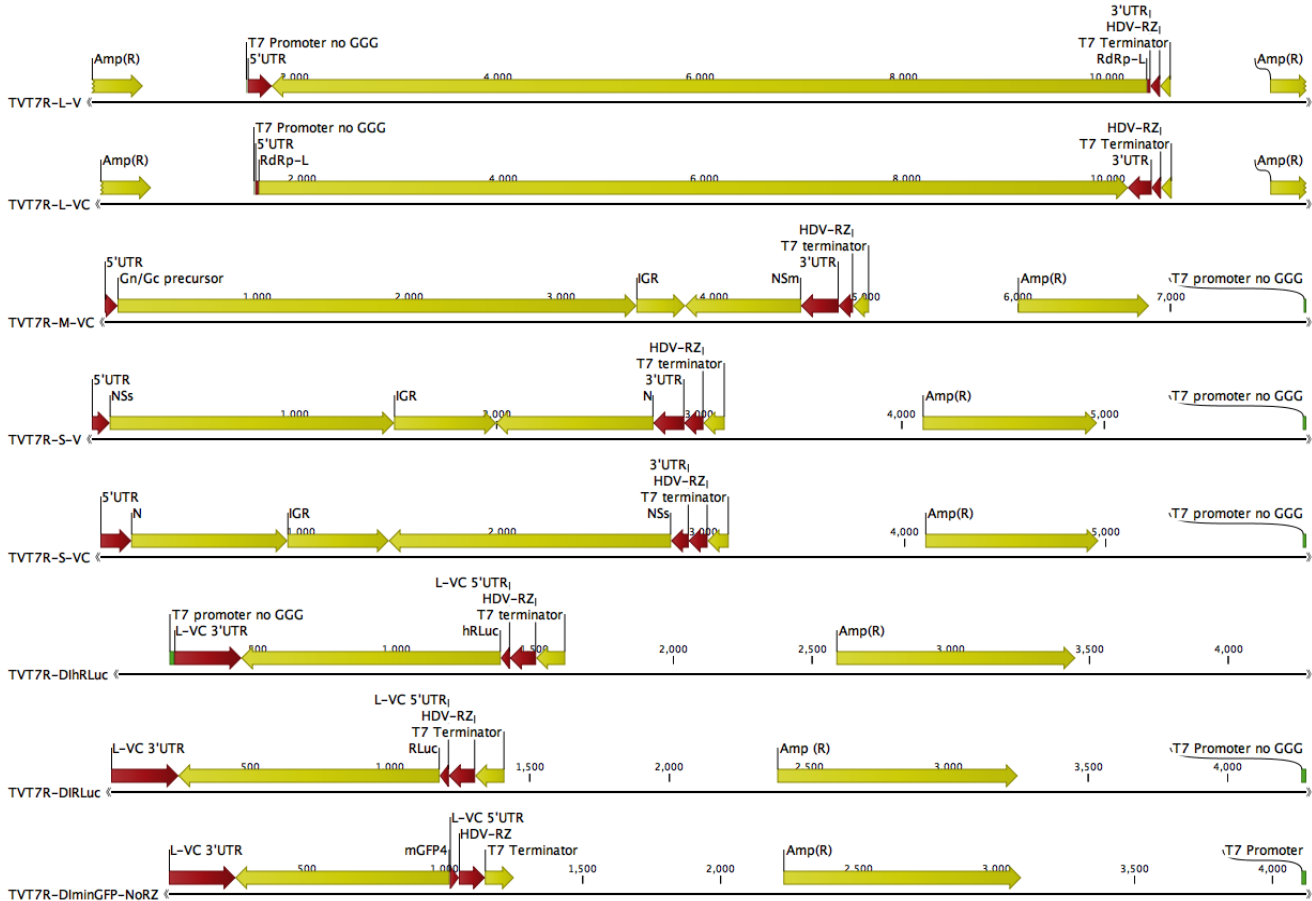
A parceria com o laboratório do Dr. Turina nos deu a possibilidade de interagir também com outros grupos de pesquisa. Foi estabelecida uma parceria com o grupo do Dr. Richard Elliott (Univ. de Glasgow, Escócia) para realização de ensaios de replicação de mini-genoma e de produção de clone infeccioso em células de inseto e humanas. Para tanto, foram obtidos do grupo escocês vetores de transcrição e de expressão para i) clonagem dos segmentos genômicos, ii) produção de mini-genomas contendo os genes-repórter mGFP4 e *Renilla* luciferase entre as UTRs do segmento L (*DI-like*) e iii) clonagem dos mRNAs virais codificantes para a proteína do capsídeo, N, e a polimerase viral, L.



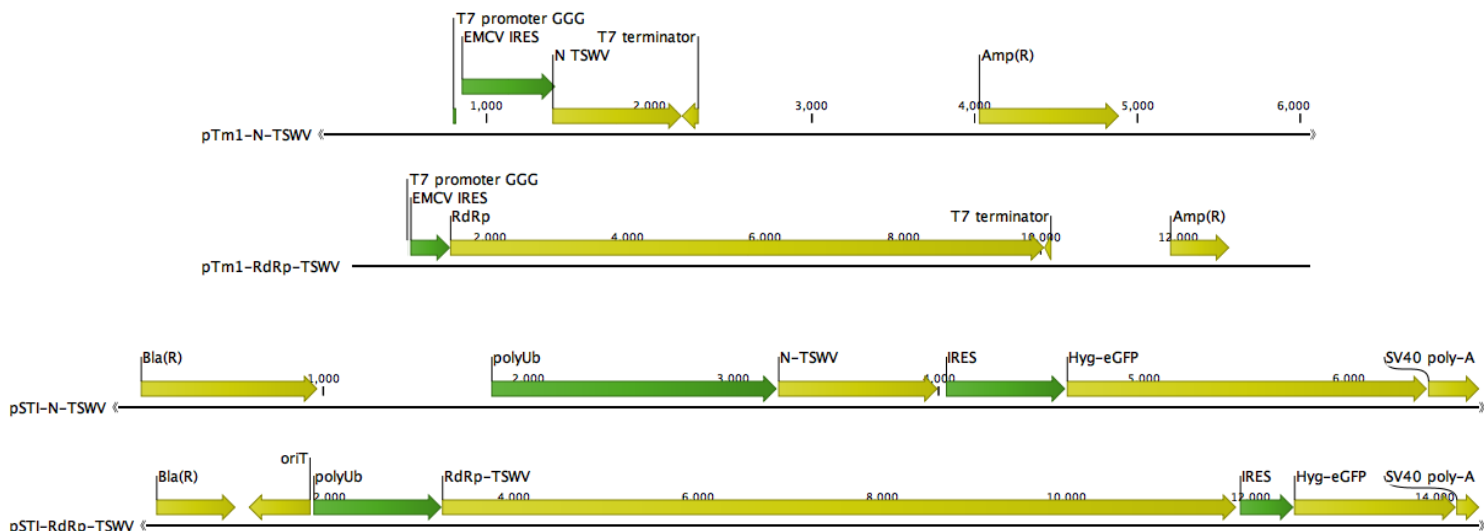
**Figura 32. Esquema dos diversos cassetes de transcrição de DI-RNAs e moléculas tipo-DI.** Os componentes funcionais de cada item são apresentados na forma de caixas e o nome dos plasmídeos é apresentado no lado direito. As chaves agrupam construções clonadas no mesmo tipo de vetor. O símbolo do relâmpago indica seqüências de DNA de sítios de restrição. T7 - seqüência de DNA promotor do bacteriófago T7; Sp6 - Seqüência de DNA promotor do bacteriófago Sp6; UTR - região não traduzível; HHRZ - seqüência complementar ao RNA da ribozima modificada de *Avocado sunblotch viroid*; HDVRZ - seqüência



complementar ao RNA da ribozima do *Hepatitis delta virus*; 35S e 35S-P – sequência de DNA promotor de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); 35S-T – sequência de DNA do terminador de CaMV; NOS – sequência de DNA do terminador do gene nopalina sintase; ORF – fase de leitura aberta de um gene; DI – RNA defeitivo interferente; TSWV – *Tomato spotted wilt virus*; GRSV – *Groundnut ringspot virus*; mGFP4 – proteína verde fluorescente otimizada para expressão em plantas; + e - indicam se o RNA transcrito a partir do cassete é imediatamente traduzível (+) ou deve ser replicado (-); ∅ – cassetes sem vetor; transcritos produzidos a partir de produtos de PCR purificados.



**Figura 33. Esquema das construções utilizadas para transcrição citosólica dos RNAs genômicos virais e construções de mini-genomas contendo genes-repórter no vetor pTVT7'R.** Os esquemas apresentam representações lineares de moléculas circulares (i.e., plasmídeos), portanto, dependendo de como foi montada a molécula no programa de dados, elementos dos plasmídeos (e.g. T7 Promotor no GGG) podem ser vistos em posições distintas. Os transcritos gerados por esses plasmídeos começam sempre no promotor T7 (T7 Promotor no GGG) e terminam em dois elementos: HDV-RZ (ribozima do *Hepatitis delta virus*) e um terminador transcricional do fago T7 (T7 Terminator). As cinco primeiras construções de cima para abaixo apresentam os segmentos genômicos completos do isolado BR-20 de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV BR-20) clonados no vetor pTVT7'R. As últimas três construções apresentam mini-genomas, i.e., genes-repórter flanqueados por extremidades não traduzíveis (UTR, na sigla em inglês) regulatórias do segmento L de TSWV BR-20. Para as construções de mini-genoma as regiões UTR são representadas tais quais as do segmento L-VC. V - orientação genômica viral encontrada predominantemente nas partículas virais maduras; é negativa para a produção das proteínas virais estruturais (N, Gn/Gc e L). VC - orientação genômica viral complementar; é positiva para a produção das proteínas virais estruturais. IGR - região intergênica, presente nos segmentos S e M. RLuc - enzima catalizadora de luminescência do organismo *Renilla reniformis*. hRLuc - versão modificada do gene RLuc para qual foi realizada otimização de códons para o padrão de *codon usage* humano e mudança de um aminoácido. mGFP-4 - gene-repórter codificante para a proteína verde fluorescente em versão otimizada para expressão em células vegetais. NSm e NSs - proteínas não-estruturais (i.e., não encontradas no vírion maduro) codificadas nos segmentos M e S, respectivamente, dos tospovírus. Amp (R) - gene de resistência ao antibiótico Ampicilina; marca seletiva para clonagem molecular.



**Figura 34. Esquema das construções utilizadas para dirigir expressão heteróloga das proteínas N e L (RdRp) de *Tomato spotted wilt virus* em células de mamífero (pTM1) e inseto (pSTI).** Os esquemas apresentam representações lineares de moléculas circulares (i.e., plasmídeos). A expressão de proteínas no vetor pTM1 é dirigida pela indução do acoplamento da subunidade ribossomal menor das células hospedeiras diretamente ao mRNA, que por ser transcrito por um promotor T7 e terminado por um promotor T7, não possui CAP 5' nem cauda de poli-A. Esta indução à montagem ribossomal é dirigida por uma sequência IRES (*internal ribosome entry site*, da sigla em inglês) de *Encephalomyocarditis virus* (EMCV IRES). A expressão das proteínas virais é dirigida em células de mosquito por um promotor do gene Poli-ubiquitina 5 de *Drosophila melanogaster* (polyUb). Os mRNAs virais produzidos nessas células possuem CAP 5', dirigida pelo promotor eucariótico e cauda poli-A, dirigida pelo elemento SV40 poly-A. Amp(R) e Bla(R) – gene de resistência ao antibiótico ampicilina; marca de seleção para clonagem molecular em bactérias. Hyg-eGFP – gene de resistência a higromicina (Hyg) fusionado ao gene da proteína verde fluorescente em versão otimizada para expressão em células de mamífero (eGFP); marca de seleção para transdução e expressão constitutiva em cultura de células animais. IRES – sequência de internal ribosome entry site obtida do genoma do pulgão *Rhopalosiphum padi*.

Os vetores para transcrição citosólica dos segmentos genômicos virais e dos mini-genomas (Figura 33) possuem promotores T7 mínimos (sem a presença dos últimos três resíduos de guanina (G) comumente associados a grande eficiência dessa sequência promotora) para garantir que a transcrição do RNA ocorra sem a adição de ribonucleotídeos extras na extremidade 5' do transcrito nascente (Janda et al., 1987), e a sequência da ribozima de *Hepatitis delta virus* (HDV) *downstream* ao inserto seguida de um terminador T7. Os vetores de expressão em células humanas (i) e de inseto (ii) (Figura 34) se caracterizam pela presença de uma sequência IRES (*internal ribosome entry site*) forte obtida de *Encephalomyocarditis virus* (EMCV) (Jang and Wimmer, 1990) dirigindo a tradução dos mRNAs virais (i) e de um promotor do gene da poli-ubiquitina de *Drosophila melanogaster* (Lee et al., 1988) para expressão dos mRNAs em células de inseto (ii).

### Linhagens celulares e cultivo de células in vitro

Células de inseto C6/36 (*Aedes albopictus*) estavelmente transduzidas para expressão constitutiva do gene da T7 RNA polimerase sob seleção por resistência a Zeocin™ (Invitrogen) (realizado pelo Dr. Margus Varjak do laboratório da Dra. Esther Schnettler, da Universidade de Glasgow) e células de hamster BHK modificadas para expressão constitutiva do gene da T7 RNA polimerase sob seleção por resistência a Geneticina (G-418 sulfato) denominadas BSR-T7 (formalmente, BSR-T7/5) (Buchholz et al., 1999) foram utilizadas durante todo o estudo. Culturas iniciais das duas linhagens celulares foram obtidas de células ativamente sendo passadas por membros do laboratório do Dr. Richard Elliott da Universidade de Glasgow (Dra. Ingeborg C. van Knippenberg proveu as células C6/36-T7 e BSR-T7). Todos os procedimentos foram realizados observando-se as boas práticas de laboratório e condições de assepsia necessárias para o cultivo de tecidos, evitando assim a contaminação de células, meios de cultura e reagentes.

As células C6/36-T7 foram mantidas em meio L-15 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino termicamente inativado (heat inactivated FCS, Gibco, doravante denominado FCS) a 10% (v/v) e tampão triptose fosfato (TPB, Gibco) a 10% (v/v). As células BSR-T7 foram mantidas em meio de cultura GMEM BHK-21 (Gibco) suplementado com FCS e TPB, ambos a 10% (v/v). Para semeadura de novas garrafas e placas, observou-se o crescimento de culturas já iniciadas até nível de confluência de 80-100% (tipicamente 24h para garrafas T<sub>25</sub> e 72h para garrafas T<sub>75</sub> da marca Corning. A numeração de cada modelo de placa indica a quantidade em cm<sup>2</sup> de área de superfície para o crescimento das células). As células C6/36-T7 foram mantidas em incubadora a 28°C sem pressão positiva de CO<sub>2</sub> e sem umidade, em frascos e placas sem ventilação (Corning). As células BSR-T7 foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de pressão positiva de CO<sub>2</sub> e umidade controlada à 80%, em frascos e placas ventilados (Corning).

Para as células C6/36-T7, uma vez alcançada a confluência desejada, removia-se o meio de cultura das garrafas e desadheria-se fisicamente as células da

superfície plástica interna da garrafa com um raspador de células (TPP) a fim de tê-las em suspensão em volume residual de meio de cultura. Para semeadura de garrafas T<sub>25</sub> as células raspadas em volume residual eram coletadas por meio de lavagem da superfície interna da placa com 5 ou 10ml (dependendo se as células foram crescidas previamente em garrafas T<sub>25</sub> ou T<sub>75</sub>, respectivamente) de meio L-15 suplementado e transferidas para tubos falcon estéreis de 15ml. Tipicamente, 1ml das células ressuspendidas em meio suplementado era utilizado para semeadura das novas garrafas. Completava-se o volume das novas garrafas com 4 ou 13ml (T<sub>25</sub> e T<sub>75</sub>, respectivamente) de meio L-15 suplementado adicionado de 0,1% (v/v) do antibiótico para manutenção da expressão constitutiva do gene da T7 RNA polimerase (Zeocin™). Para semeadura de placas de 24 poços (fundo chato, Corning) utilizava-se 500µl/poço de células à concentração de 1 x 10<sup>5</sup> céls./ml. Para semeadura de placas de 12 poços (fundo chato, Corning) utilizava-se 750µl/poço das células à mesma concentração. Para semeadura de placas de Petri de 60mm de diâmetro (Corning) utilizava-se 5ml /placa das células à mesma concentração. Para aferir a concentração das células utilizou-se o sistema de contagem automática de células TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad).

Para as células BSR-T7, uma vez alcançada a confluência desejada, removia-se o meio de cultura das garrafas e tratava-se quimicamente as células por com tripsina-EDTA (0,05%) em solução contendo phenol-red (Gibco) para promover a desaderência. As células eram lavadas e as placas levemente agitadas manualmente com 2ml da solução de tripsina-EDTA por um minuto, após o qual removia-se a solução. Este procedimento era realizado duas as vezes e as células eram então deixadas por 15-30 minutos na incubadora a 37°C. Após o tempo referido, as garrafas eram levemente batidas contra a palma da mão a fim de remover o contato físico com o plástico da superfície interna das garrafas e a eficiência do processo era avaliada visualmente colocando o fundo das garrafas contra a luz e verificando a presença e mobilidade das células agora em suspensão em volume residual. O processo de desalojamento físico (batida contra a palma da mão) era repetido até que a maior parte das células se encontrasse em suspensão. Procedia-se então a

ressuspensão dessas células e lavagem da superfície interna de cada garrafa com 5 ou 10ml (T<sub>25</sub> ou T<sub>75</sub>, respectivamente) de meio GMEM BHK-21 suplementado. As células em meio de cultura eram transferidas para tubos falcon de 15 ml estéreis. Para semeadura de novas garrafas utilizou-se 1ml das células ressuspendidas por garrafa e adicionou-se 4 ou 13ml (T<sub>25</sub> ou T<sub>75</sub>, respectivamente) de meio GMEM BHK-21 suplementado acrescido de 0,1% de Geneticina para manutenção da expressão constitutiva do gene da T7 RNA polimerase. Para semeadura de placas de 24 poços utilizou-se 500µl/poço de células à concentração de 7 x 10<sup>4</sup> céls./ml. Para semeadura de placas de 12 poços utilizou-se 750µl/poço de células à concentração de 1 x 10<sup>5</sup> céls./ml. Para semeadura de placas de Petri de 60mm de diâmetro utilizou-se 5ml/placa de células à concentração de 1 x 10<sup>5</sup> céls./ml. Para aferir a concentração das células utilizou-se o sistema de contagem automática de células TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad).

#### Transfecção de células C6/36-T7 e BSR-T7 cultivadas in vitro

Após 16-24h da semeadura de placas de 24 e 12 poços e de placas de Petri de 60mm de diâmetro, procedia-se a inspeção do percentual de confluência das células por meio de microscopia à luz branca em microscópios invertidos. As células eram utilizadas para transfecção quando estavam entre 70-90% confluentes.

Para os plasmídeos de expressão das proteínas N e L de TSWV e *Bunyamwera virus* (BUNV) (vetores pTM1 e pSTI, conferir abaixo no item Construções para transfecção de células animais) foram utilizados 100ng de DNA plasmidial/poço para ensaios em placas de 24 poços. Também utilizou-se 100ng para os plasmídeos pTM1 e pSTI expressando a proteína GFP (controles de eficiência de transfecção). Já para os diferentes plasmídeos construídos da série pTVT7'R para transcrição citosólica dos segmentos genômicos virais e mini-genomas contendo genes-repórter (conferir abaixo no item Construções para transfecção de células animais) utilizou-se 10ng de DNA plasmidial/poço para ensaios em placas de 24 poços. Para os ensaios de medição de luminescência [Luciferase - conferir abaixo no item Ensaio de emissão de

luz (luminescência) por atividade catalítica de genes-repórter em sistema de mini-replicon] utilizou-se 1ng de DNA plasmidial (*firefly* luciferase clonada em vetor pTM1 ou pSTI) do controle/poço em placas de 24 poços. A fim de tornar as quantidades de DNA plasmidial transfectadas entre os diferentes tratamentos iguais, utilizou-se plasmídeos pTM1 ou pSTI vazios nas misturas dos diferentes DNAs plasmidiais a serem co-transfectados.

Para ensaios em placas de 12 poços utilizou-se cinco vezes mais DNA por poço e para ensaios em placas de Petri de 60mm utilizou-se 10 vezes mais DNA de cada construção transfectada, respectivamente, em relação aos experimentos realizados em placas de 24 poços. A transfecção das células mantidas por meio de cultura de tecidos *in vitro* foi realizada com agente de transfecção LT-1 (Mirus) de acordo com o protocolo do fabricante com pequenas alterações.

Resumidamente, as misturas de DNA (preparadas fora da capela de fluxo laminar) a serem transfectadas para cada tratamento das células eram diluídas dentro de capela de fluxo laminar em meio Opti-MEM® (Gibco) em tubos de centrifuga novos autoclavados de 1,5ml (Star Labs, Escócia). Preparava-se à parte (dentro da capela de fluxo laminar), em tubos falcon de 15ml, uma mistura de Opti-MEM® com o reagente de transfecção pipetando o reagente diretamente no meio Opti-MEM® e misturando por pipetagem e inversão do tubo. Aos tubos contendo as misturas de DNA diluídas em Opti-MEM® era adicionado volume apropriado do reagente de transfecção também diluído em Opti-MEM® e a solução pipetada várias vezes para garantir a mistura completa das duas partes (i.e., DNAs e LT-1). Os tubos contendo as misturas de DNA e LT-1 eram então mantidos à temperatura ambiente dentro da capela de fluxo laminar por 5-30min.

Paralelamente a esse tempo de espera, procedia-se a remoção do meio de cultura de cada poço das placas contendo as células a serem transfectadas, por meio de sucção com pipetas de plástico descartáveis (Corning) acopladas a um pipetador automático, e marcação das tampas das placas com a escrita dos delineamentos experimentais, tratamentos e data de transfecção. Após remoção do meio de cultura,

aplicava-se por gotejamento através de pipetagem manual 100µl da mistura de transfecção (DNAs + LT-1) por poço em placas de 24 poços, 250µl da mistura de transfecção por poço em placas de 12 poços e 500µl da mistura de transfecção por placa de Petri de 60mm. As células em contato com a mistura de transfecção eram mantidas por 5-15min à temperatura ambiente dentro da capela de fluxo laminar e em seguida eram adicionados 500µl, 1ml e 5ml (placas de 24 e 12 poços e placas de Petri de 60mm, respectivamente) do meio de cultura suplementado apropriado (L-15 para C6/36-T7 e GMEM BHK-21 para BSR-T7). Em seguida as placas eram vedadas com Parafilm M® (Bemis) (C6/36-T7 apenas) e levadas para incubação nas temperaturas desejadas.

As incubações das células transfectadas foram realizadas a 33°C (com CO<sub>2</sub> e umidade controlados para BSR-T7 e sem esses dois fatores para C6/36-T7), 28°C (com CO<sub>2</sub> e umidade controlados para BSR-T7 e sem esses dois fatores para C6/36-T7) e 24°C (sem CO<sub>2</sub>). Os tempos de incubação, dependendo do experimento (apresentado caso a caso nos resultados) variaram entre 48 a 120h após o tratamento (h p.t.).

#### *Infeções in vitro de células BHK-21 e C6/36*

Células BHK-21 e C6/36 que não expressam constitutivamente o gene heterólogo da T7 RNA polimerase foram cultivadas como mencionado acima para ensaios de infecção a partir de material biológico (sobrenadante e lisado celular) coletado de ensaios de resgate de infecção de TSWV realizados em células BSR-T7 e C6/36-T7. Estes ensaios foram realizados em placas de 12 poços, crescidas de acordo com o mencionado no item *Linhagens celulares e cultivo de células in vitro* acima. Para a infecção, retirou-se o meio de cultura de cada poço das placas e aplicou-se alíquotas de 500µl (aprox.. 1/8 do total) de sobrenadante ou 250µl (aprox.. 1/8 do total) de lisado de células por poço. As células em confluência de 70-80% foram incubadas com os materiais biológicos mencionados acima por 3h a 33°C (BHK-21) ou 28°C (C6/36), após as quais foi removido o sobrenadante e adicionados

1ml de meio GMEM BHK-21 e L-15 suplementados para BHK-21 e C6/36, respectivamente. Para os tratamentos minusL, 5plm e 3plm (conf. Fig. 52) foram feitas infecções em triplicata (i.e., três poços para cada tratamento). Os sobrenadantes e lisados celulares coletados dos ensaios de resgate de infecção de TSWV em BSR-T7 foram usados para infecção em células BHK-21 e C6/36 e os resgates feitos em C6/36-T7 foram usados para infecção em células C6/36 e BHK-21, reciprocamente.

#### Microscopia de fluorescência e de luz (epifluorescência) para imageamento celular

Todas as microfotografias dos experimentos foram realizadas com microscópio EVOS FL (Thermo-Scientific) utilizando objetiva de 4x (limite de resolução de 1,375 $\mu$ m, valor de abertura numérica da lente igual a 0,20), sem nenhum tipo de ampliação digital. Foram tiradas fotos de campo claro (luz transmitida) e de fluorescência para GFP (cubo de luz com excitação a 470nm e emissão a 525nm), utilizando intensidade de 70% do sinal fluorescente para todas as capturas. No próprio aparelho foram geradas imagens de sobreposição (*merge*) para o campo claro e o campo de GFP, utilizando a função '*boost*' para o sinal de GFP e valores de sobreposição de 54% para o sinal de GFP e 51% para o campo claro. Brilho e contraste foram mantidos a 50% no software do microscópio EVOS FL em todas as fotos.

#### Ensaio de emissão de luz (luminescência) por atividade catalítica de genes-repórter em sistema de mini-replicon

A avaliação quantitativa da atividade de replicação e transcrição de mini-genomas de TSWV foi feita através da produção de luz dependente de expressão de gene-repórter por meio do luminômetro GloMax® 20/20 (Promega) utilizando os reagentes do sistema Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) assay (Promega). Resumidamente, células BSR-T7 e C6/36-T7 foram co-transfectadas com



plasmídeos pTM1 e pSTI, respectivamente, expressando o gene da *firefly* luciferase, cuja atividade serve como uma medida controle de eficiência de transfecção e padronização da expressão de outro gene repórter, *Renilla* luciferase, inserido na construção de mini-genoma de TSWV em versão tipo-selvagem (*wild type* – WT) e em versão humanizada (hRLuc)(Zhuang et al., 2001).

O protocolo do sistema foi seguido com algumas modificações: i) após remoção do meio de cultura e lavagem de cada poço das placas contendo as células transfectadas com PBS 1x autoclavado, foi aplicado sobre as células, em cada poço, 100µl de tampão *Passive lysis buffer* (PLB, Promega) 2x ao invés de 1x; em sequência, as placas foram armazenadas a -20°C *overnight*. ii) No dia da mensuração de atividade, as placas eram removidas do freezer e deixava-se que descongelassem a temperatura ambiente. Quando descongeladas, aplicava-se 100µl de água Milli-Q estéril por poço. Procedia-se a ressuspensão do material celular de cada poço e transferência para tubos de microcentrífuga de 1,5ml. As amostras eram centrifugadas a 14.000 RPM em centrífuga 5430r (Eppendorf) refrigerada a 4°C por 5 minutos. iii) Os tampões de reação LAR II e Stop & Glo® Reagent (S&G) foram utilizados em diluição cinco vezes superior ao recomendado para o protocolo. iv)

Para cada leitura de luminescência utilizou-se 5µl de cada amostra, coletando-se o sobrenadante sem tocar o *pellet* contendo o *debris* celular. De acordo com o manual, para cada amostra, 5µl foram brevemente misturados a 50µl de LAR II e a atividade de *firefly* luciferase medida no luminômetro. Imediatamente após essa medição, 50µl de tampão S&G eram adicionados ao tubo e a medição da atividade de *Renilla* luciferase era feita. Como resultado, o software GloMax (Promega) gerava, para cada amostra, uma entrada em tabela Excel contendo os valores de intensidade luminosa (RLU) para *firefly*, para *Renilla* e uma medida de *firefly* dividida por *Renilla* (*F/R ratio*). Valores de *F/R ratio* inferiores a 1 foram considerados qualitativamente positivos para atividade do gene-repórter *Renilla* em suas versões WT e hRLuc.

Todos os diferentes tratamentos experimentais foram realizados em triplicata (i.e., transfecção de três poços por tratamento) a fim de permitir posteriores análises estatísticas com maior grau de confiabilidade. Após coleta dos dados de luminescência procedeu-se a análises estatísticas de média, desvio padrão e expressão relativa do gene da *Renilla* luciferase (WT e hRLuc) pela expressão do gene de *firefly* luciferase (R/F *ratio*). As análises estatísticas e gráficos foram produzidos no software Excel do pacote Office for Mac 2011 (Microsoft).

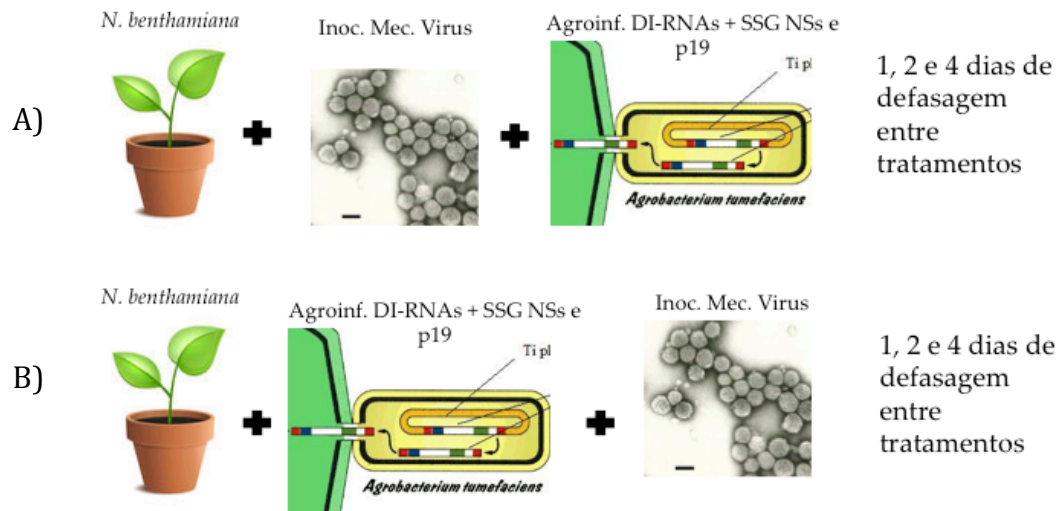
## **Resultados**

Os resultados apresentados neste capítulo são fruto de diversas abordagens para o mesmo fim: provar a replicação de um DI-RNA exógeno pelo vírus auxiliar. Foram realizados diversos desenhos experimentais de projetos-piloto e testadas diversas combinações e condições de entrega dos DIs. No entanto, até o momento os resultados foram negativos. Uma replicação evidente das diversas construções testadas não foi observada com as técnicas de detecção utilizadas. Para facilitar a compreensão, preferiu-se focar nos desenhos experimentais apresentados abaixo, de modo resumido, em forma de esquemas. Para cada experimento com plantas usou-se ao menos 3 réplicas por tratamento. As amostras de RNA foram coletadas como um *pool* entre as réplicas. Os resultados de Real-Time PCR, por serem negativos, não foram apresentados.

### *Estratégia 1: Co-inoculação vírus helper e DI-RNAs por inoculação mecânica e agroinfiltração*

A primeira metodologia testada para a realização da prova conceitual da capacidade de reconhecimento e replicação de DI-RNAs exógenos introduzidos a partir de *Agrobacterium tumefaciens* foi a co-inoculação com um vírus *helper* (isolados p105 e BR-20 de TSWV e SA-05 de GRSV)(Fig. 35). Neste modelo

metodológico a premissa era de que a expressão gênica do vírus auxiliar (*helper*) produzisse *in trans* todos os elementos necessários para a replicação dos DI-RNAs.



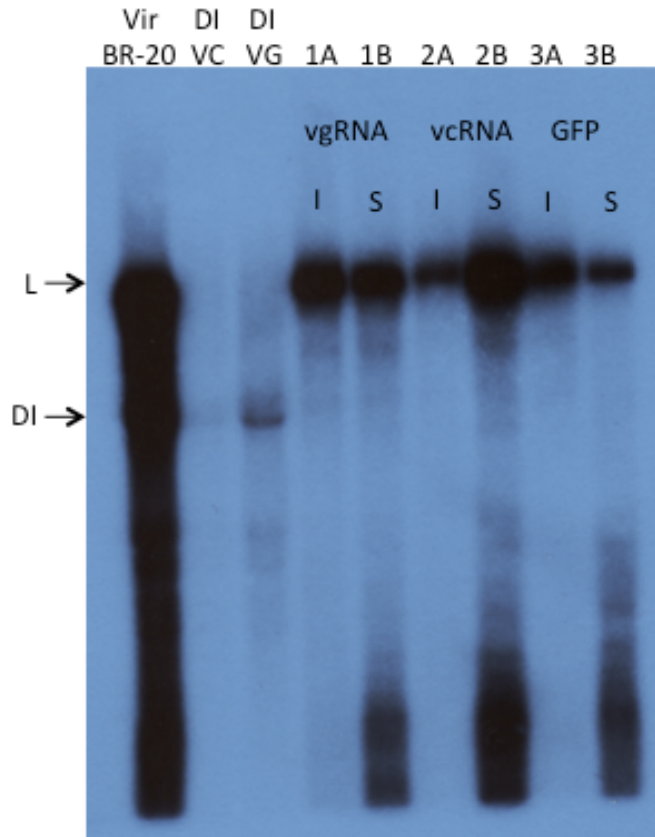
Vírus inoculados: TSWV BR20, TSWV p105 e GRSV SA-05  
 Moléculas injetadas: DI-RNAs TSWV e GRSV vg e vcRNA; p19 e NSs (Sup. Sil. Gen.) co-infiltrados com todos os tratamentos; GFP (C-)  
 Vetores binários: pGreenII-62-SK; pJL89; pCAMBIA2300 e 0380; pBin61 (GFP, NSs e p19)  
 Coletas: Folhas inoculadas a 5dpi e folhas sistêmicas a 10dpi do vírus

**Figura 35. Estratégia de genética reversa baseada em replicação de DI-RNAs por vírus *helper* através da geração de transcritos de DI-RNA gerados por promotor 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) via expressão transiente mediada por agrobactéria.** Foram utilizados nessa estratégia diferentes vetores binários (i.e., plasmídeos para expressão transiente via agrobactéria) que são apresentados no texto da figura. Os diferentes vetores binários e suas características estão explicitados na figura 32. Foram testadas moléculas de DI-RNAs que possuem ou não possuem sequências de ribozimas flanqueando as duas extremidades da molécula. Foram testadas moléculas de DI-RNAs clonadas em duas orientações distintas em relação ao promotor 35S de CaMV, denominadas vg e vc (fig. 32). Como explicitado no texto da figura, foram utilizadas em esquema de co-infiltração agrobactérias transformadas com plasmídeos expressando as proteínas supressoras de silenciamento gênico (SSG e Sup. Sil. Gen.) p19 de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) e NSs de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) expressados pelo vetor pBin61. Os dois desenhos experimentais traçados para a estratégia de expressão de DI-RNAs via agrobactéria estão representados, da esquerda para a direita, nos itens A) e B). Em A) primeiro infectava-se a planta com o vírus *helper* (TSWV ou *Groundnut ringspot virus* – GRSV) e nas mesmas folhas inoculadas com vírus fazia-se o tratamento de co-infiltração das agrobactérias para transcrição de DI-RNAs com 1, 2 e 4 dias de defasagem entre tratamentos. Em B), primeiro infiltrava-se folhas jovens das plântulas de *Nicotiana benthamiana* com as agrobactérias transcrevendo DI-RNAs e expressando SSG e depois promovia-se a infecção das mesmas folhas com o vírus *helper*. Os experimentos foram realizados em combinações de DI-RNA e vírus *helper* intra- e inter-específicas, i.e., DI-RNA TSWV + *helper* TSWV, DI-RNA GRSV + *helper* TSWV e assim sucessivamente. GFP – proteína verde fluorescente usado como controle positivo de agroinfiltração (expresso em vetor pBin61).

Foram realizados ensaios de co-inoculação sem defasagem de tempo e com defasagens de tempo de 24, 48 e 96h entre tratamentos aplicando primeiro os vírus e depois as agrobactérias contendo as construções a serem testadas ou vice-versa. Como controles, plantas foram inoculadas somente com vírus, ou inoculadas com

vírus e agroinfiltradas com plasmídeo expressando GFP. Para potencializar a expressão dos cassetes heterólogos agroinfiltrados coinfiltrou-se uma mistura de plasmídeos expressando as proteínas supressoras de silenciamento gênico NSs (TSWV) e p19 de TBSV em cada tratamento. Foram coletadas amostras das folhas inoculadas e sistemicamente infectadas de cada tratamento a 5 e 10d.p.i., respectivamente. Foram testadas combinações de vírus auxiliar e DI-RNAs de mesma espécie (DI-TSWV/TSWV p105 e BR-20) e interespecíficos (DI-GRSV/TSWV p105 e BR-20 e DI-TSWV/GRSV SA-05). Inicialmente optou-se por usar o vetor binário pGreenII-62-SK+ mas provou-se que a expressão neste vetor não foi minimamente eficiente para os métodos de detecção utilizados (RT-PCR e northern blot). Assim, durante o período de doutorado sanduíche na Itália testou-se os vetores pJL89, pCAMBIA2300 e pCAMBIA0380. Em análise realizada por meio de northern blot (Figura 36) é possível ver a expressão pouco intensa de uma banda de RNA de tamanho similar ao tamanho de DIs presentes na amostra do controle de TSWV BR-20 para plantas tratadas apenas com o DI TSWV vgRNA (controle de expressão do transcrito).

Embora tenha sido detectado o DI no controle de expressão, nenhum sinal de DI expresso foi visível nas folhas inoculadas com vírus ou sistemicamente infectadas. Como a expressão dos DIs estava no limite de detecção pela técnica de northern Blot, decidiu-se utilizar a técnica de RT-qPCR, a partir da qual realizaram-se testes de comparação da expressão dos DIs entre diferentes vetores binários e concluiu-se que pJL89 foi o vetor que melhor expressou cópias do transcrito do DI-RNA de TSWV optando-se, portanto, por realizar todos os experimentos seguintes com o vetor pJL89. Devido à presença das ribozimas flanqueando os DI-RNAs, que por sua função auto-catalítica mantém as extremidades (UTR's) dos defectivos-interferentes livres de nucleotídeos extras, mas também removem o Cap 5' adicionado pelo promotor 35S e a cauda de poli-A dos terminadores 35S e NOS, e considerando conseqüentemente baixos níveis de exportação e sobrevivência desses RNAs para o citoplasma é possível compreender porque esta metodologia não funcionou.



**Figura 36. Northern blot com ribossonda derivada de um fragmento do L RNA demonstrando expressão de DI-RNAs por agrobactéria.** Amostras de RNA total foram extraídas de plantas infiltradas com pJL89 contendo a sequência do DI mais estável de *Tomato spotted wilt virus* BR-01 em orientação viral genômica (vgRNA) ou viral complementar (vcRNA). As amostras 1 e 2 (A e B) depois de agroinfiltradas com pJL89 foram inoculadas mecanicamente com TSWV BR-20 com 72h de defasagem. As amostras 3A e 3B foram agroinfiltradas com proteína fluorescente verde (GFP) e posteriormente (72h depois) inoculadas com TSWV BR-20. Vir BR-20 – controle positivo de infecção viral, planta não tratada com agrobactéria; DI VC e DI VG – controles de expressão transitente dos DI-RNAs nas orientações vc e vgRNA, coletados a 72h pós infiltração; I – amostras de folhas infiltradas com agrobactéria, inoculadas mecanicamente com vírus um dia após a agroinfiltração e coletadas a 5 dpi da inoculação do vírus; S – amostras de folhas sistemicamente infectadas coletadas a 10 dias após inoculação do vírus.

Os DIs exógenos foram eficientemente detectados por RT-qPCR em todos os casos nas folhas infiltradas, mas a análise de folhas sistemicamente infectadas não mostrou nenhum sinal para os DIs exógenos, i.e., os DIs, se replicados nas folhas inoculadas, não estavam sendo carreados pelos tecidos floemáticos em direção as folhas mais jovens e a infecção sistêmica. Não houve diferença entre os níveis de acumulação para os DIs nos controles de expressão e nas folhas co-inoculadas.

Além disso, foram realizados experimentos para verificar o potencial protetor dos DIs contra a infecção viral por indução da síntese de pequenos RNAs

pela maquinaria de RNAi celular do hospedeiro. Nestes experimentos, foram abolidos os supressores de silenciamento gênico comumente empregados nos ensaios de ATTE realizados. Não foi observada diferença significativa de dias do início da infecção até o aparecimento de sintomas sistêmicos entre os tratamentos com plasmídeos contendo DIs e o plasmídeo contendo GFP. Não houve diferença de sintomatologia entre tratamentos, nem plantas imunes, e não foi visualizada recuperação da infecção pelas plantas de *N. benthamiana* até 21 dias após a inoculação viral.

Estratégia 2: Co-inoculação vírus helper e DI-RNAs por meio de inoculação mecânica

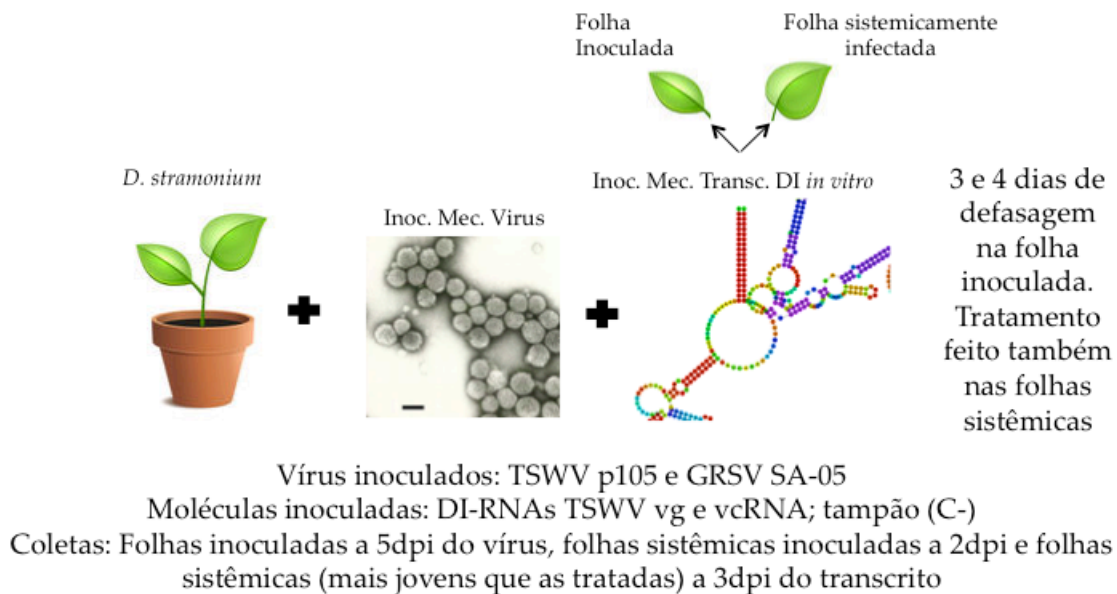
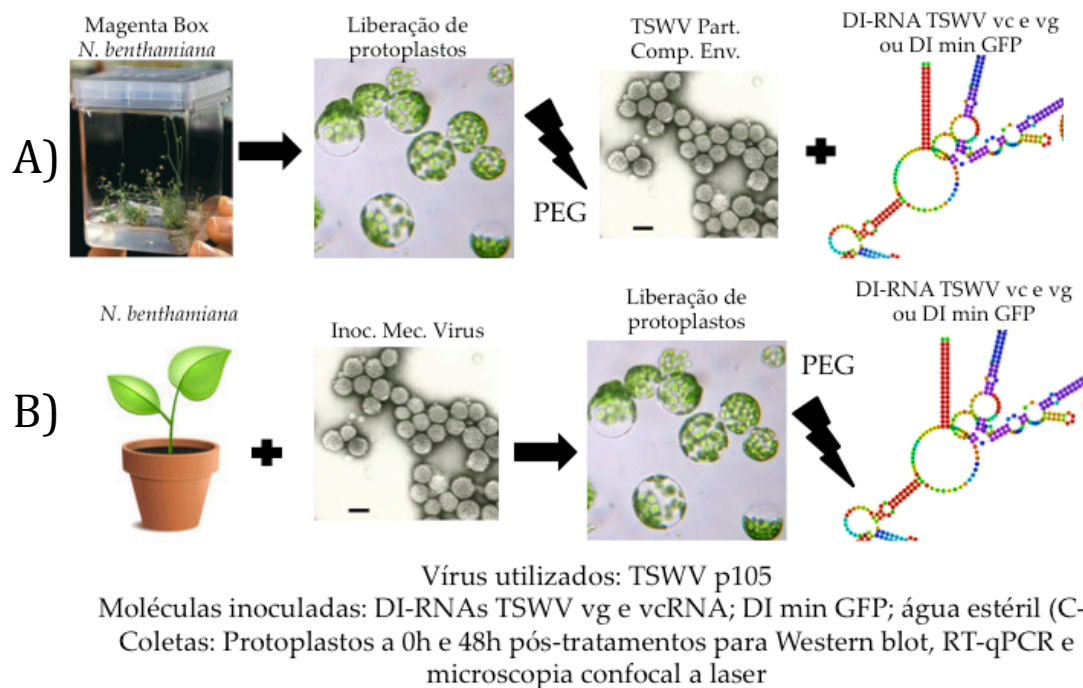


Figura 37. Esquema de genética reversa baseada em entrega de DI-RNAs via inoculação mecânica em plantas infectadas com vírus *helper*.

Para avaliar a hipótese de que a agroexpressão estivesse produzindo transcritos mas estes estivessem sendo degradados ou não transportados do núcleo ao citosol, realizou-se ensaios temporais de co-inoculação usando vírus auxiliar e

DI-RNAs produzidos por meio de transcrição *in vitro* e inoculados mecanicamente sobre as folhas (Fig. 37). Nesta metodologia, folhas jovens foram inoculadas com vírus e co-inoculadas com DI-RNAs a 72 e 96h de defasagem e as amostras foram coletadas a 5dpi do vírus (folhas inoculadas). Foram realizados também ensaios de inoculação em folhas sistemicamente infectadas coletadas dois dias após tratamento com DI-RNAs e em folhas sistemicamente infectadas mais jovens que as tratadas para avaliar possível migração dos DIs entre as folhas. Ensaios preliminares em *N. benthamiana* demonstraram que as folhas jovens não permaneciam em condições adequadas para uma extração eficiente de RNA total após os tratamentos por ficarem muito danificadas, portanto procurou-se utilizar como organismo hospedeiro modelo plantas da espécie *D. stramonium*. Novamente, a detecção dos DIs foi eficiente após 24, 48 e 72h da inoculação mecânica dos transcritos, mas quando comparados o tempo zero, com a expressão do gene N e referenciados pelo gene COX, verificou-se o decaimento da concentração dos DI-RNAs ao longo do tempo (dados não mostrados).

Estratégia 3: Co-transfecção de partículas virais completas e DI-RNAs mediada por PEG em protoplastos



**Figura 38. Estratégias de genética reversa baseada em replicação de DI-RNAs e RNAs tipo-DI (mini-genoma contendo mGFP4) via co-transfecção de protoplastos de *N. benthamiana* com partículas virais completas envelopadas e RNA alvo.** Em A) os protoplastos transfetados foram produzidos à partir de folhas removidas de plântulas de *N. benthamiana* cultivadas de modo asséptico em Magenta Box. Em B) plantas crescidas em casa de vegetação eram inoculadas com TSWV e folhas sistemicamente infectadas eram coletadas para produção de protoplastos e posterior transfecção com as moléculas-alvo.

Tendo em vista que nas folhas inoculadas de uma planta existe uma assincronia de infecção entre os diversos focos de infecção que são produzidos e que isso poderia influenciar nos resultados obtidos até o momento pela ausência de uniformidade de infecção, decidiu-se sair dos modelos biológicos de plantas inteiras para modelos de cultura *in vitro* de células vegetais livres de parede celular (protoplastos) produzidos sempre a partir de folhas frescas no mesmo dia da transfecção (Fig. 38). De acordo com a metodologia utilizada, os protoplastos permaneciam viáveis por no máximo 72h. Folhas provenientes de plantas crescidas de modo asséptico em Magenta Box rendiam protoplastos melhores e mais viáveis do que aquelas provenientes de plantas crescidas na estufa da casa de vegetação.



Foram testados dois tipos diferentes de PEG para a transfecção, de peso molecular 1450 e 6000. Embora para a infectividade do vírus purificado o tipo de PEG não tenha feito diferença (um exemplo de resultado positivo para replicação viral é apresentado na Fig. 39), para a transfecção e expressão de GFP de um TBSV modificado usado como controle, o PEG1450 mostrou melhores resultados do que o PEG6000, com eficiências de transfecção estimadas em 70-80% para PEG1450 e 50-60% para PEG6000 portanto, optou-se por usar o PEG1450 nas transfecções seguintes. A purificação de partículas virais completas (i.e., envelopadas) provou-se de difícil realização e atingia apenas um grau moderado de pureza do extrato viral purificado ao final do processo de isolamento (ainda contaminado por restos de vesículas e membranas celulares). Além disso, o processo não foi sempre reproduzível e o purificado viral mantido em alíquotas perdia infectividade rapidamente, mesmo quando mantido sempre a -80°C. A fim de facilitar a realização dos experimentos em protoplastos provou-se infectar as células vegetais *in vitro* com purificados de complexos de RNP, mas o ensaio foi negativo para acumulação da proteína N (dados não mostrados).

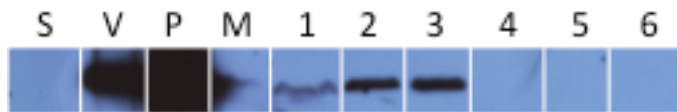
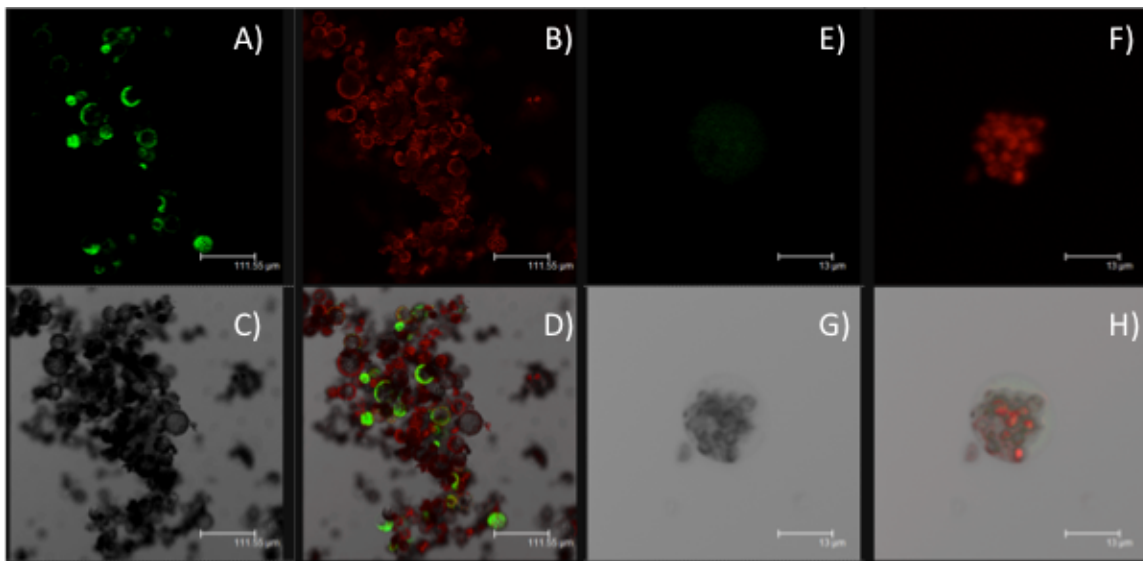


Figura 39. Western blot para a proteína N de protoplastos transfetados com partículas virais completas de *Tomato spotted wilt virus*. Amostras de protoplastos foram coletadas a 0, 24 e 48h após transfecção com o vírus purificado. As amostras foram transfetadas com 10µl do purificado viral (1, 2 e 3) ou com 1µl do purificado viral (4, 5 e 6). S – protoplastos sadios não transfetados; V – amostra da purificação viral diluída 1:2; P – protoplastos produzidos a partir de material foliar sistemicamente infectado; M – marcador.

Protoplastos co-transfetados com os DIs e partículas virais completas apresentaram na qPCR padrão de aumento de número de cópias para o gene N e diminuição para os DIs, indicando que o número de cópias diminuiu entre 0 e 48h após o tratamento. Para protoplastos provenientes de folhas já infectadas com TSWV o mesmo resultado foi obtido, com diminuição do número de cópias dos DI-RNAs. As amostras tratadas com o cassete de expressão tipo-DI foram visualizadas em microscopia confocal tendo como controle amostras transfetadas com RNA de

um clone infeccioso de TBSV expressando GFP. Nos controles a expressão de GFP foi evidente e sinais intensos foram detectados em todo o citosol (Fig. 40). Já para as amostras tratadas com o DI mínimo carregando GFP não houve sinal de intensidade superior ao nível de ruído (*background*) do laser sobre a amostra e ao invés de sinais intensos permeando todo o espaço celular eram visualizados pequenos pontos, muito pouco intensos para representarem uma evidência positiva da expressão de GFP.



**Figura 40. Microscopia confocal para estratégia de genética reversa em protoplastos com moléculas “tipo-DI” detalhada na figura 38.** Nas composições a esquerda (A, B, C e D), exemplo de resultado para transfecção de RNA de um controle TBSV-GFP. Nas composições a direita (E, F, G, H), resultados obtidos para co-transfecção de partículas virais e moléculas tipo-DI carregando cópia do gene mGFP. As barras representam unidades de distância medidas em  $\mu\text{m}$ .

*Estratégia 4: Indução de rearranjo de segmentos S em condição de alta pressão seletiva como método de genética reversa para tospovírus*

Tendo em vista as dificuldades de obtenção de resultados positivos utilizando-se DI-RNAs e moléculas tipo-DI como alvos para reconhecimento e replicação por um vírus auxiliar, tentou-se mudar a estratégia de genética reversa para uma que conferisse vantagem adaptativa ao vírus ao adquirir o RNA viral designado no experimento. Para tanto, foi usado um isolado de TSWV gerado pelo grupo do Dr. Turina denominado p202/3RB (Margaria and Turina, 2007). Este

isolado é uma variante do isolado de TSWV WT p202/3 que possui deleções na sequência codificante para a proteína NSs, não produzindo um gene funcional (Margarita *et al.* 2014).

Uma vez que o isolado p202/3RB é um isolado deficiente em NSs, hipotetizou-se que a entrega de moléculas de RNA do segmento S WT de TSWV confeririam muita vantagem ao vírus no processo infeccioso e que por isso poderiam ser reconhecidas, replicadas e incorporadas ao ciclo infeccioso, compondo um sistema não-ortodoxo de genética reversa por rearranjo de um segmento genômico.

Os ensaios biológicos consistiam em inocular plantas de *N. benthamiana* com p202/3RB a 22°C e inocular as folhas sistemicamente infectadas destas plantas com transcritos do segmento S de BR-20. Após um período de 24 a 48h, as folhas sistêmicas tratadas eram usadas como fonte de inóculo para infectar *D. stramonium* mantidas a 28°C em cela climática. Os testes foram realizados, mas nenhuma diferença de sintomatologia foi observada em relação ao controle tratado apenas com p202/3RB. Novamente, como as folhas de *N. benthamiana* mostraram ser muito sensíveis à abrasão, especialmente as folhas sistemicamente infectadas, optou-se por realizar os testes diretamente em *D. stramonium*. Novamente, nenhuma variação de sintomatologia foi observada. Além disso, em western blot não verificou-se a expressão da proteína NSs nas amostras tratadas com os transcritos do segmento S de BR-20 (dados não mostrados).

Estratégia 5: Atividade de mini-replicons baseada em expressão de genes-repórter e tentativa de resgate de infecção em culturas celulares de mamífero e inseto

Em recente parceria estabelecida com o grupo do Dr. Richard Elliott da Universidade de Glasgow (campus Garscube) sob supervisão da Dra. Ingeborg C. van Knippenberg, foram realizados, no período de um mês entre janeiro e fevereiro de 2016, experimentos de transfecção de linhagens celulares de hamster (BSR-T7,

derivada de BHK 21) e mosquito (C6/36-T7), ambas expressando constitutivamente o gene da T7 RNA polimerase, com o objetivo de avaliar a capacidade de reconhecimento, replicação e transcrição (i.e. atividade de mini-replicon) de mini-genomas de TSWV (*DI-like*) contendo genes-repórter pelas proteínas virais N e L de TSWV expressas transientemente a partir de plasmídeos pTM1 ou pSTI (conferir seção Material e Métodos do Capítulo 3 para detalhes sobre os plasmídeos). A transcrição dos mini-genomas contendo os genes-repórter mGFP4 ou RLuc e hRLuc foi dirigida pela T7 RNA polimerase a partir da transfecção das sequências de interesse clonadas em vetor pTVT7'R. Foram também produzidos plasmídeos para transcrição citosólica dos RNAs genômicos virais para os três segmentos virais, S, M e L nas duas orientações das moléculas, vg e vc.

A análise da correta inserção dos genes e sequências de interesse nos respectivos plasmídeos foi feita por sequenciamento de Sanger automatizado (Macrogen Inc., Coreia do Sul e SourceBio, Escócia). A partir dos resultados de sequenciamento verificou-se que as construções para expressão dos genes N e L em pTM1 e pSTI estavam corretas, assim como as construções para transcrição dos segmentos S e L (pTVT7'R), tanto em orientação vg quanto vc, de UTR a UTR de acordo com comparações com sequências obtidas pela mesma técnica pela Dra Anelise Orílio a partir de amplificações e transcrições reversas segmento específicas a partir de RNA total de plantas infectadas com o isolado BR-20 de TSWV (dados não mostrados).

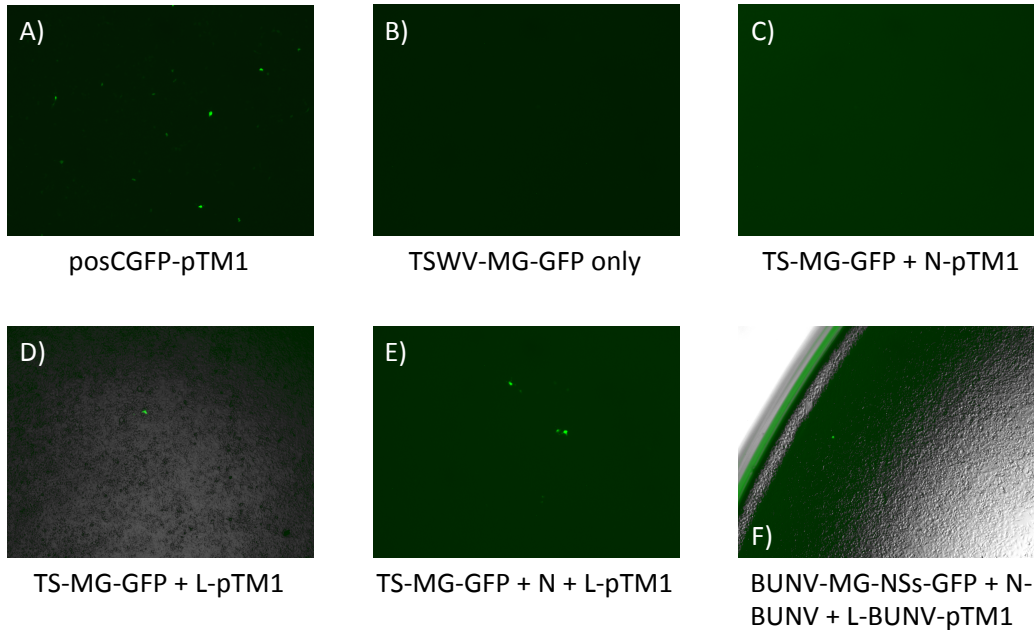
As construções para transcrição do segmento M nas duas orientações apresentaram mutações que causaram interrupção do gene codificante para o precursor das glicoproteínas virais na orientação vc e uma inversão de pedaço da glicoproteína e interrupção do gene codificante para a proteína NSm. Procedeu-se ao reparo da construção do segmento M em orientação vc, mas não houve tempo hábil para reparo do segmento M em orientação vg até a realização dos experimentos. A ocorrência destas mutações de caráter deletério especialmente sobre o gene codificante para as glicoproteínas virais é um fator comum para outras espécies da família *Bunyaviridae* e para solucioná-lo realiza-se crescimento

bacteriano a temperatura ambiente (24°C), minimizando assim as taxas de crescimento e assumindo-se menor efeito tóxico da expressão do gene viral sobre as bactérias transformadas (Dra. Agnieszka Szemiel, comunicação pessoal). Após correção da construção do segmento M em orientação vc por meio da técnica de Gibson assembly procedeu-se a transformação de células de *E. coli* da cepa DH10B e crescimento a temperaturas mais baixas em placa (28°C) e em cultura líquida (24°C).

Uma vez confirmados os diversos clones quanto a sequência e orientação corretas procedeu-se aos ensaios de transfecção em células BSR-T7 e C6/36-T7. Os resultados apresentados na figura 41 mostram o resultado do primeiro ensaio de atividade de mini-replicon de TSWV com incubação a 33°C. Neste, a eficiência de transfecção foi muito baixa, cerca de 0,1-1% do total de células, estimado pelo número de focos fluorescentes do controle de transfecção (posCGFP-pTM1, Fig. 41A) em relação ao total de células visualizadas no campo. Não houve sinal de fluorescência para um controle de transfecção contendo apenas o mini-genoma de TSWV (TSWV-MG-GFP, Fig. 41B) transcrito pelo vetor pTVT7'R ou o mini-genoma em co-transfecção com o plasmídeo pTM1 expressando a proteína N de TSWV (TS-MG-GFP + N-pTM1, Fig. 41C). A co-transfecção do mini-genoma mais o vetor pTM1 expressando a proteína L gerou sinal fluorescente, embora nos poços transfectados apenas uma ou outra célula fosse fluorescente, indicando uma atividade de mini-replicon em um número extremamente reduzido de células (TS-MG-GFP + L-pTM1, Fig. 41D). Quando o mini-genoma de TSWV foi co-transfectado com plasmídeos expressando tanto a proteína N quanto a proteína L (TS-MG-GFP + N + L-pTM1, Fig. 41E), foi detectado sinal qualitativamente mais intenso (i.e., focos celulares fluorescentes mais fortes) em uma quantidade superior de células em relação ao visto para TS-MG-GFP + L apenas.

# First mini-replicon GFP activity assay

BSR-T7 cells, 33°C + CO<sub>2</sub> for 48h.p.t

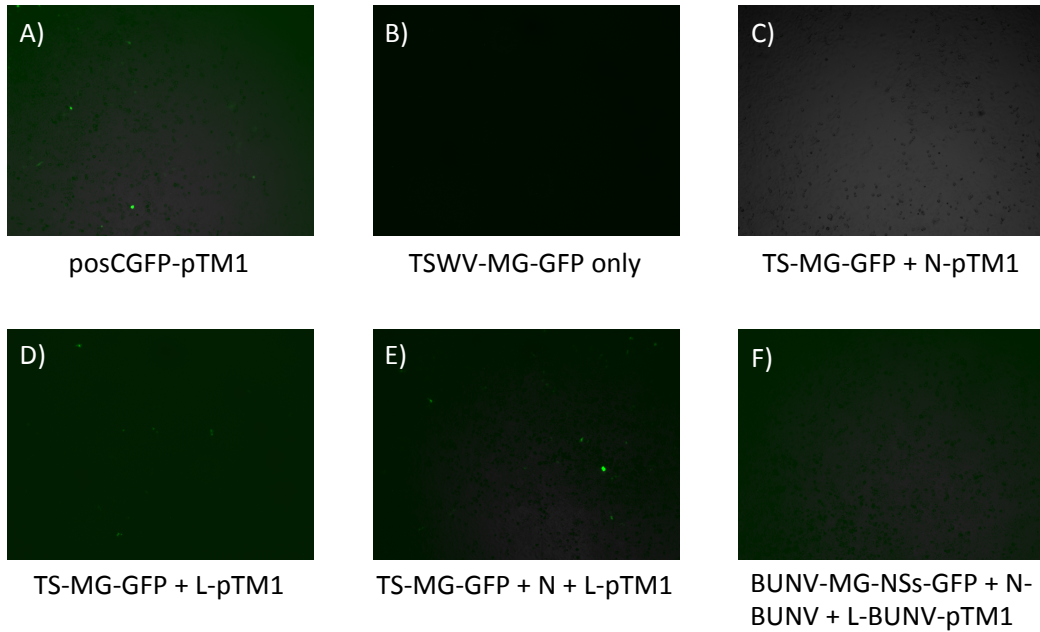


**Figura 41. Primeiro ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 33°C, baseado em expressão do gene reporter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC).** Os diferentes tratamentos (A-F) foram realizados em placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 33°C em estufa de cultivo celular com pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 48h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP – eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP – construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7'R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV; BUNV N e BUNV L - proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de *Bunyamwera virus* (BUNV). O mini-genoma de BUNV (BUNV-MG-NSs-GFP) é detalhado no trabalho de van Knippenberg *et al.* 2013.

Também como controle de eficiência de transfecção e de atividade, um sistema de mini-replicon de BUNV desenvolvido pela Dra. Van Knippenberg foi empregado nos experimentos (van Knippenberg *et al.*, 2013). Para a atividade de mini-replicon de BUNV, fez-se um tratamento controle transfectando apenas o mini-genoma (BUNV-MG-NSs-GFP, controle negativo, dado não mostrado) e um tratamento contendo o mini-genoma (em vetor pTVT7'R) e a expressão das proteínas N e L de BUNV pelo vetor pTM1 (BUNV-MG-NSs-GFP + BUNV N + BUNV L-pTM1, Fig. 41F). Como resultado para o mini-replicon de BUNV neste ensaio, poucas células foram fluorescentes, menos do que para o tratamento TS-MG-GFP + L.

# First mini-replicon GFP activity assay

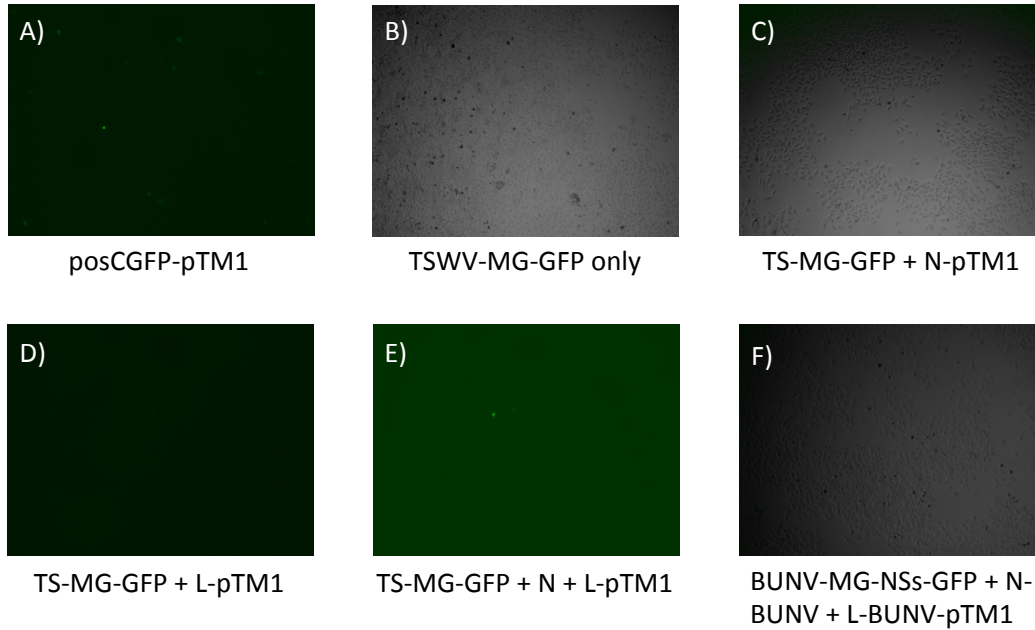
BSR-T7 cells, 28°C + CO<sub>2</sub> for 48h.p.t



**Figura 42. Primeiro ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 28°C, baseado em expressão do gene reporter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC).** Os diferentes tratamentos (A-F) foram realizados em placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 28°C em estufa de cultivo celular com pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 48h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP – eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP – construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7'R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV; BUNV N e BUNV L - proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de *Bunyamwera virus* (BUNV). O mini-genoma de BUNV (BUNV-MG-NSSs-GFP) é detalhado no trabalho de van Knippenberg *et al.* 2013.

# First mini-replicon GFP activity assay

BSR-T7 cells, 24°C without CO<sub>2</sub> for 48h.p.t



**Figura 43. Primeiro ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 24°C, baseado em expressão do gene reporter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC).** Os diferentes tratamentos (A-F) foram realizados em placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 28°C em estufa de cultivo celular sem pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 48h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP – eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP – construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7'R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV; BUNV N e BUNV L - proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de *Bunyamwera virus* (BUNV). O mini-genoma de BUNV (BUNV-MG-NSs-GFP) é detalhado no trabalho de van Knippenberg *et al.* 2013.

As figuras 42 e 43 apresentam os resultados do primeiro ensaio de atividade de mini-replicon baseado em expressão de GFP para as células BSR-T7 mantidas a 28°C e 24°C, respectivamente.

Tomados globalmente, os resultados das figuras 41 a 43 demonstram que a melhor temperatura de incubação para os ensaios de atividade de mini-replicon foi 33°C, sendo a segunda melhor temperatura 28°C. A 24h p.t. não foi visualizado sinal fluorescente para nenhum dos tratamentos em nenhuma das temperaturas de incubação (dados não mostrados). Como as células mantidas a 24°C foram



cultivadas em incubadora sem pressão positiva de CO<sub>2</sub> e o meio de cultura apresentava visualmente pH mais ácido dada sua coloração arroxeadada, optou-se por apresentar de agora em diante apenas os resultados para as temperaturas de incubação de 33°C e 28°C.

A fim de tornar claro o desenho experimental em placas de 24 poços e como foram realizadas as misturas de DNA para cada tratamento, é apresentado na figura 44 um exemplo de como foram realizados.

Os experimentos de atividade de mini-replicon de TSWV por expressão da proteína mGFP4 foram realizados apenas em células BSR-T7 pois para as células C6/36-T7 o plasmídeo pSTI utilizado para expressão das proteínas N e L de TSWV já expressava eGFP a partir de outras ORFs presentes no *backbone* do vetor (dados não mostrados). Em células C6/36-T7 foram realizados apenas ensaios de luminescência por expressão de luciferase.

Treatments	pTM1-L TSWV	pTM1-N TSWV	TSWV MG- GFP	pTM1-L BUNV	pTM1-N BUNV	BUNV- MG- NSsGFP	Filler- pTM1	pTM1- eGFP
1-GFP transfection control	-	-	-	-	-	-	100ng	100ng
2-TSWV MG only	-	-	10ng	-	-	-	200ng	-
3-TSWV MG + N	-	100ng	10ng	-	-	-	100ng	-
4-TSWV MG + L	100ng	-	10ng	-	-	-	100ng	-
5-TSWV MG + N + L	100ng	100ng	10ng	-	-	-	-	-
6-BUNV MG only	-	-	-	-	-	10ng	200ng	-
7-BUNV MG + N + L	-	-	-	100ng	100ng	10ng	-	-

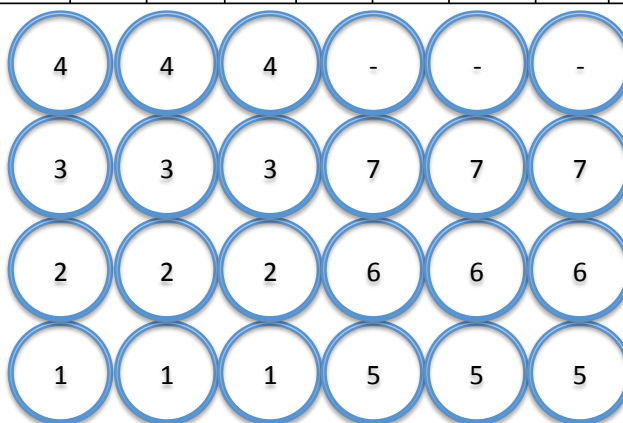
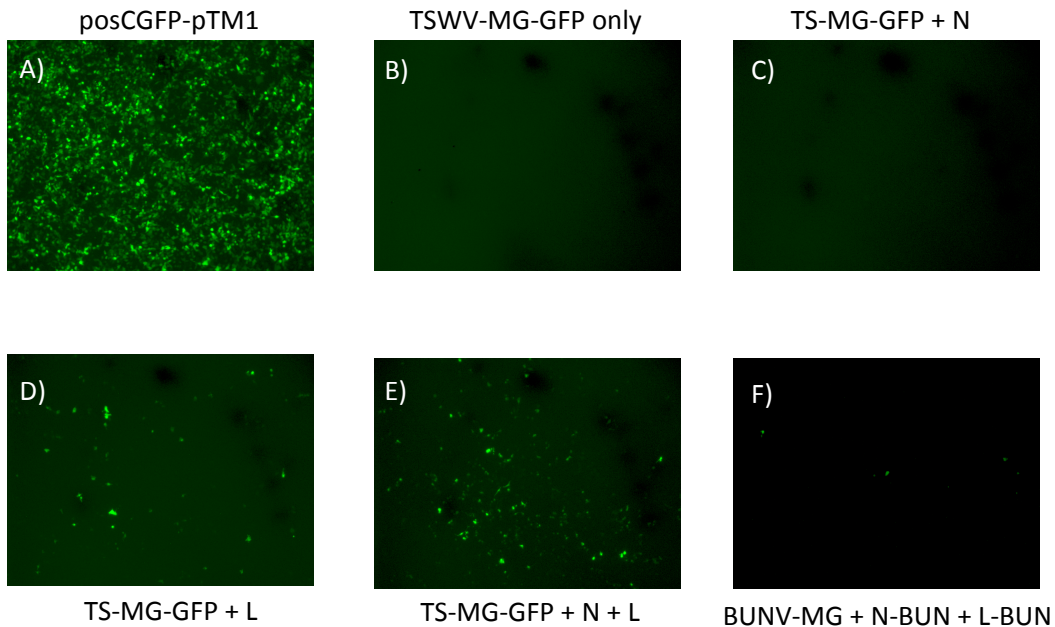


Figura 44. Representações dos esquemas de misturas de DNA realizados por tratamento e da distribuição dos tratamentos em placas de 24 poços para os ensaios das figuras 41-43.

Os ensaios de atividade de mini-replicon por expressão de GFP foram repetidos por cinco vezes em células BSR-T7 com crescentes eficiências de transfecção até a obtenção de eficiências de transfecção para o controle positivo pTM1-eGFP de visualmente 80-90% das células em um campo examinado (Fig. 45A). A metodologia para a melhor eficiência de transfecção obtida está descrita na seção Material e Métodos do Capítulo 3.

## BSR-T7 GFP mini-replicon activity at 33°C + 5% CO<sub>2</sub>, 48h.p.t.



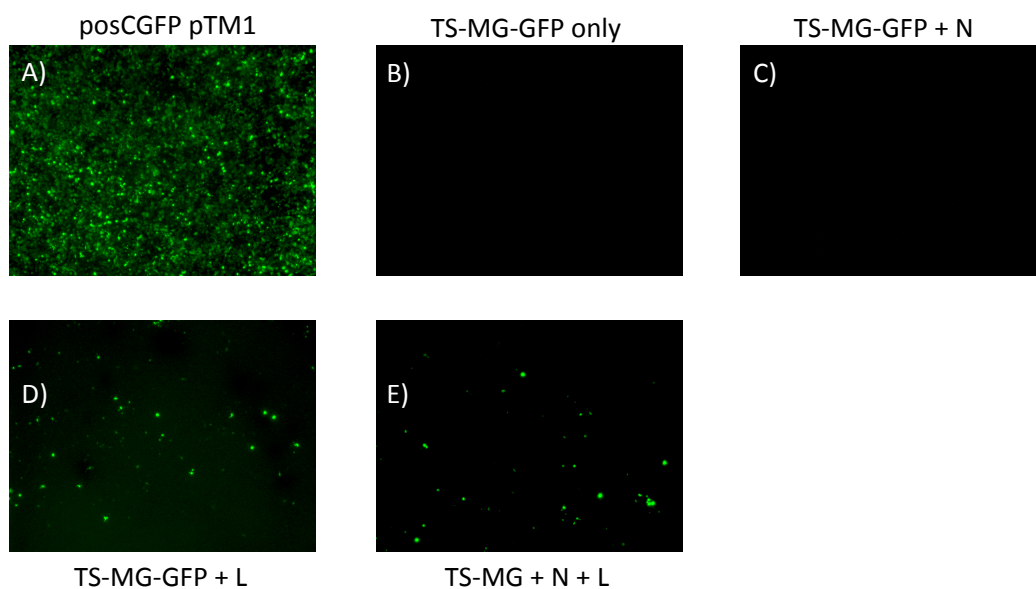
**Figura 45. Ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) com melhor eficiência de transfecção em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 33°C, baseado em expressão do gene repórter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC).** Os diferentes tratamentos (A-F) foram realizados em placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 33°C em estufa de cultivo celular com pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 48h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP - eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP - construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7'R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV expressas por vetor pTM1; BUNV N e BUNV L - proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de *Bunyamwera virus* (BUNV) expressas por vetor pTM1. O mini-genoma de BUNV (BUNV-MG-NSs-GFP) é detalhado no trabalho de van Knippenberg *et al.* 2013.

Os resultados de melhor eficiência de transfecção a temperatura de incubação de 33°C são apresentados na figura 45. É possível ver que há atividade de mini-replicon para TSWV apenas quando o mini-genoma é co-transfectado com plasmídeo pTM1 expressando a proteína L (Fig. 45D) ou em esquema de co-transfecção com expressão das proteínas N e L (Fig. 45E). Estes resultados comprovam que a atividade de mini-replicon é dependente da presença da polimerase viral (L), responsável pela replicação e transcrição do gene-repórter

mGFP4 e demonstram pela primeira vez um sistema de genética reversa funcional para TSWV.

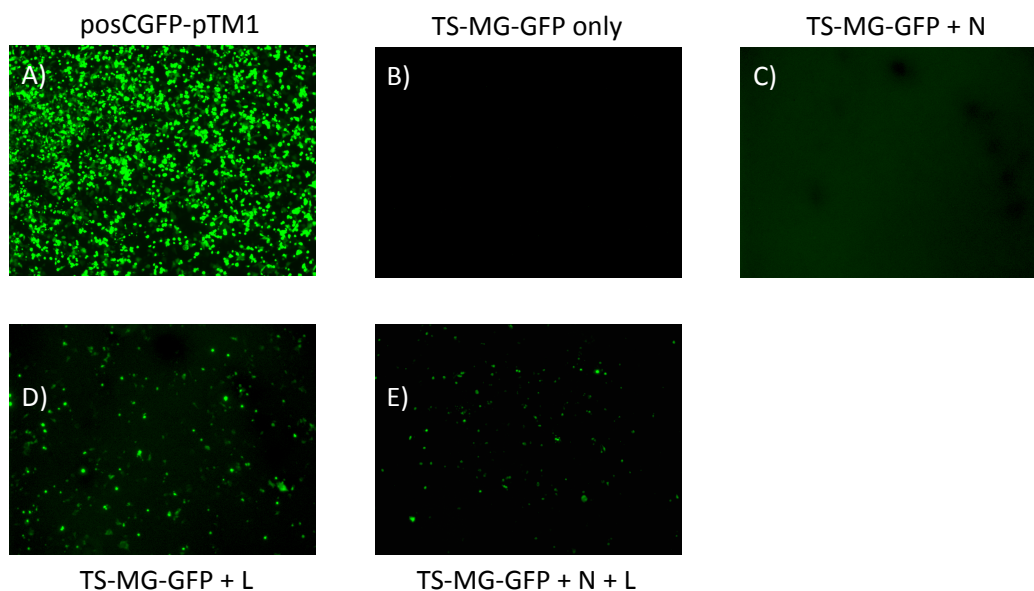
As figuras 46 e 47 demonstram que a atividade de mini-replicon observada a 48h p.t. perdurou em 72h p.t. e 96h p.t., respectivamente. A atividade do mini-replicon expressando mGFP4 foi visualizada até 120 h p.t. em ensaios com menor eficiência de transfecção (dados não mostrados).

## BSR T7 33°C – 72h



**Figura 46. Ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) com melhor eficiência de transfecção em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 33°C, baseado em expressão do gene reporter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC).** Os diferentes tratamentos (A-E) foram realizados em placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 33°C em estufa de cultivo celular com pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 72h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP – eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP – construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7'R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV expressas por vetor pTM1.

## BSR-T7 33°C - 96h

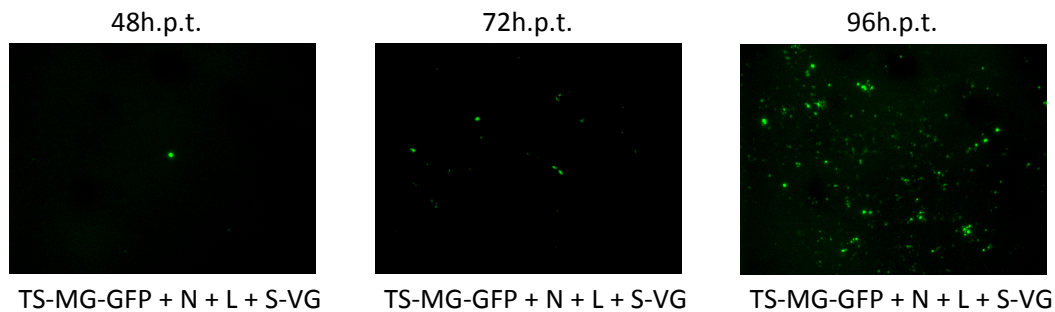


**Figura 47. Ensaio de atividade de mini-replicon para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) com melhor eficiência de transfecção em células da linhagem BSR-T7 mantidas a 33°C, baseado em expressão do gene reporter mGFP4 dependente de formação de complexo de replicação viral (VRC).** Os diferentes tratamentos (A-E) foram realizados em placas de 24 poços com triplicatas de cada tratamento e mantidos a 33°C em estufa de cultivo celular com pressão positiva de CO<sub>2</sub> por 96h até serem fotografados. Todas as descrições dos plasmídeos utilizados e da metodologia de cultivo e transfecção celulares estão no texto (Material e Métodos do capítulo 3). posCGFP – eGFP-pTM1; TSWV-MG-GFP e TS-MG-GFP – construção sintética de mini-genoma contendo o gene mGFP4 flanqueado pelas regiões UTR do segmento L do isolado BR-20 de TSWV em orientação invertida ao sentido do promotor T7 mínimo do vetor pTVT7'R; N e L proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase, respectivamente, de TSWV expressas por vetor pTM1.

Foram realizados ensaios de co-transfecção do mini-genoma de TSWV contendo mGFP4 + N + L de TSWV para testar se a presença do segmento S RNA do isolado BR-20 de TSWV em orientação vg poderia agir como um *enhancer* da expressão das proteínas virais e consequentemente aumentar a atividade de mini-replicon visualizada, tal qual é aplicado (o segmento inteiro ou apenas a proteína NSs) em ensaios de ATTE. O resultado observado a 48, 74 e 96h p.t., no entanto, foi diverso. Interessantemente, a co-transfecção do segmento S RNA vg parece ter agido como um regulador temporal da expressão do mGFP4, de modo que a 96h p.t. visualizou-se mais sinal fluorescente do que a 48h p.t. (Figura 48). Não é possível precisar se o efeito visualizado da adição do segmento S RNA vg atuou de tal forma sobre a atividade do mini-replicon de TSWV devido a competição pela replicação

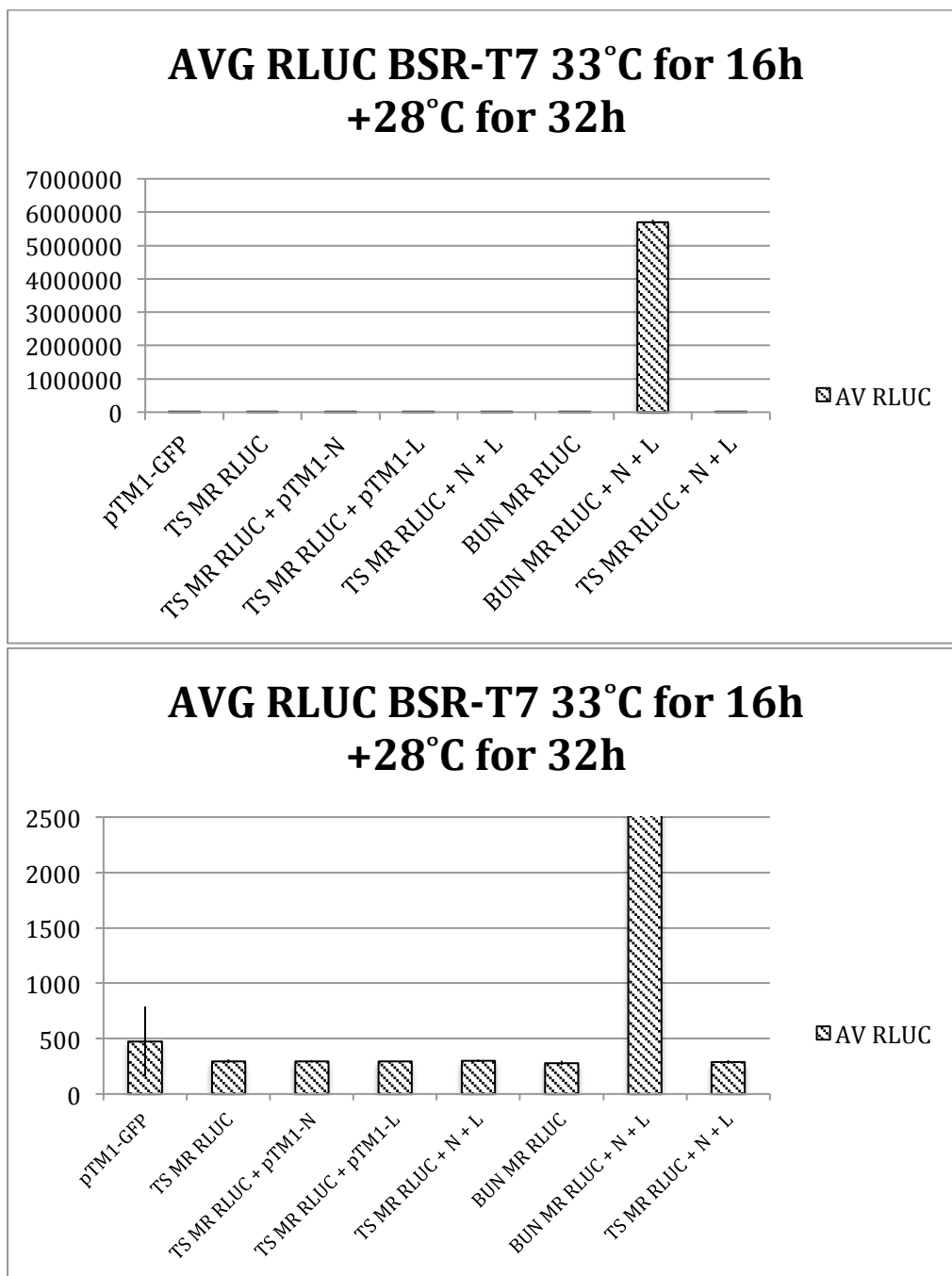
pela proteína L entre o segmento S RNA e o mini-genoma (cujas regiões UTR são do segmento L do isolado BR-20 de TSWV), ou pelo efeito da expressão da proteína NSs.

## Effect of the co-transfection of the S-VG segment on TSWV mini-replicon activity



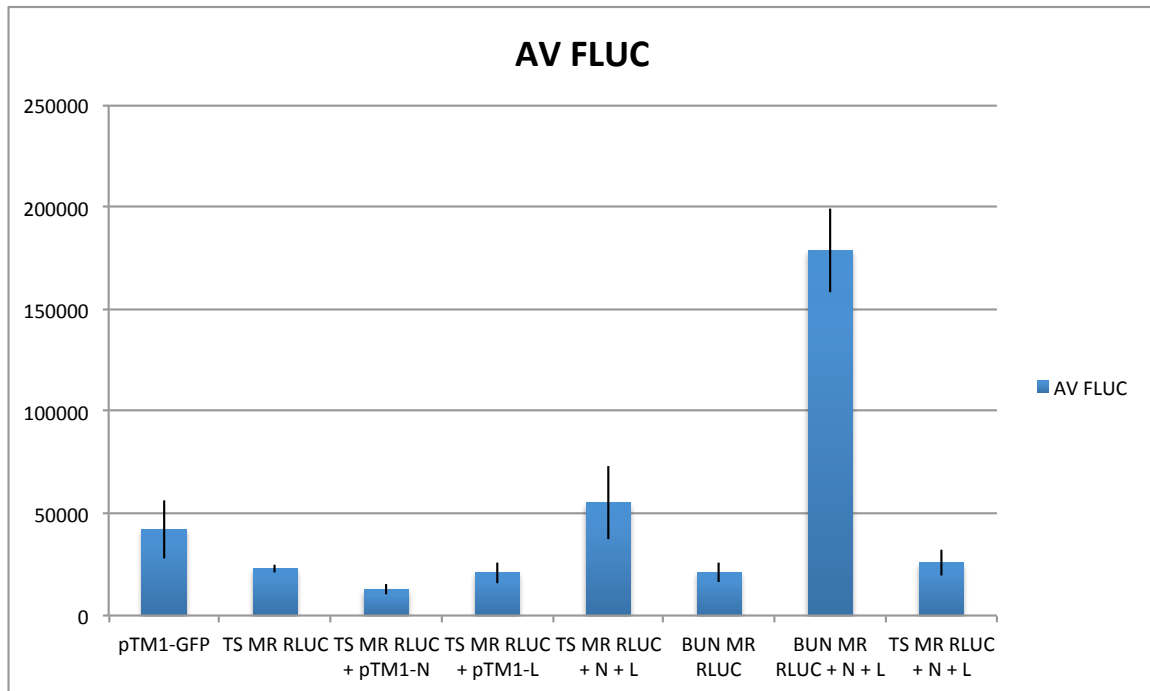
**Figura 48. Efeito da adição do segmento S RNA do isolado BR-20 de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em orientação viral genômica (vg) sobre a atividade do gene-repórter mGFP4 do mini-replicon de TSWV.** O segmento S RNA em orientação vg pode servir diretamente como mRNA codificante para a proteína NSs. Nesta figura não mostro os controles de transfecção expressando eGFP pelo vetor pTM1 pois são os mesmos das figuras 45 a 47. Foi observado um efeito de retardo da atividade do mini-replicon de TSWV, possivelmente associado ao controle da expressão gênica, ou a competição entre o mini-genoma de TSWV e o segmento S RNA, provocado pela adição do segmento S RNA vg. Assim como para TS-MG-GFP, 10ng/poço da construção do segmento S RNA foram utilizados neste experimento (ver Fig. 44). TS-MG-GFP – mini-genoma de TSWV (*Dilike*, ver texto do Material e Métodos do capítulo 3) carregando o gene mGFP4 em orientação invertida em relação ao promotor T7 do vetor pTVT7'R; N e L – proteínas estruturais de TSWV: capsídeo e polimerase, respectivamente, expressos a partir do vetor pTM1; S-VG – segmento S RNA do isolado BR-20 de TSWV transcrito a partir do vetor pTVT7'R.

A fim de obter dados de caráter quantitativo a respeito da atividade de mini-replicons de TSWV em células BSR-T7 foram realizados ensaios de atividade de mini-replicon para um mini-genoma contendo o gene RLuc ou hRLuc com tempos de incubação de 48 e 72h e em esquema de temperaturas de incubação de 33°C por 16h + 28°C por 32h ou 56h ou incubação a temperatura constante de 28°C. A figura 49 apresenta os resultados obtidos para ensaio de luminescência a partir de atividade de mini-replicon de TSWV. Nela, são mostrados os valores brutos de luminescência obtidos para RLuc.



**Figura 49. Ensaio de atividade de mini-replicon de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) baseado em emissão de luminescência (RLuc) em células BSR-T7.** Após a transfecção, as células foram mantidas por 16h a 33°C e por 32h a 28°C com 5% de pressão positiva de CO<sub>2</sub>. Os resultados apresentados para cada tratamento nos dois gráficos são valores de média +/- desvio padrão de triplicatas biológicas. Estes valores não possuem uma unidade e são considerados valores brutos de luminescência. O gráfico superior apresenta os dados em escala numérica proporcional ao maior valor obtido para RLuc. O gráfico de baixo é idêntico ao de cima, mas apresenta os dados em escala cortada a fim de melhor representar as nuances de valores entre os resultados dos diferentes tratamentos. pTM1-GFP - tratamento negativo para atividade de luminescência pois o vetor transfectado não contém RLuc. TS MR RLUC - mini-genoma de TSWV contendo o gene-repórter RLuc em orientação invertida. BUN MR - mini-genoma de *Bunyamwera virus* (BUNV) contendo o gene-repórter hRLuc em orientação invertida. N e L - proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase de TSWV e *Bunyamwera virus* (BUNV) expressas pelo vetor pTM1 (neste experimento as proteínas estruturais virais de TSWV foram usadas apenas em combinação com mini-genoma de TSWV, assim como para BUNV). Favor desconsiderar o ultimo tratamento da esquerda para a direita.

Os resultados da figura 49 apresentam reação positiva (i.e., verdadeira atividade de mini-replicon) apenas para o tratamento BUN MR RLUC + N + L. Tipicamente no grupo do Dr. Elliott, resultados positivos para atividade de mini-replicon medidos por luminescência necessitam estar na casa das centenas de milhares de valor bruto de luminescência (Dra. Van Knippenberg, comunicação pessoal).



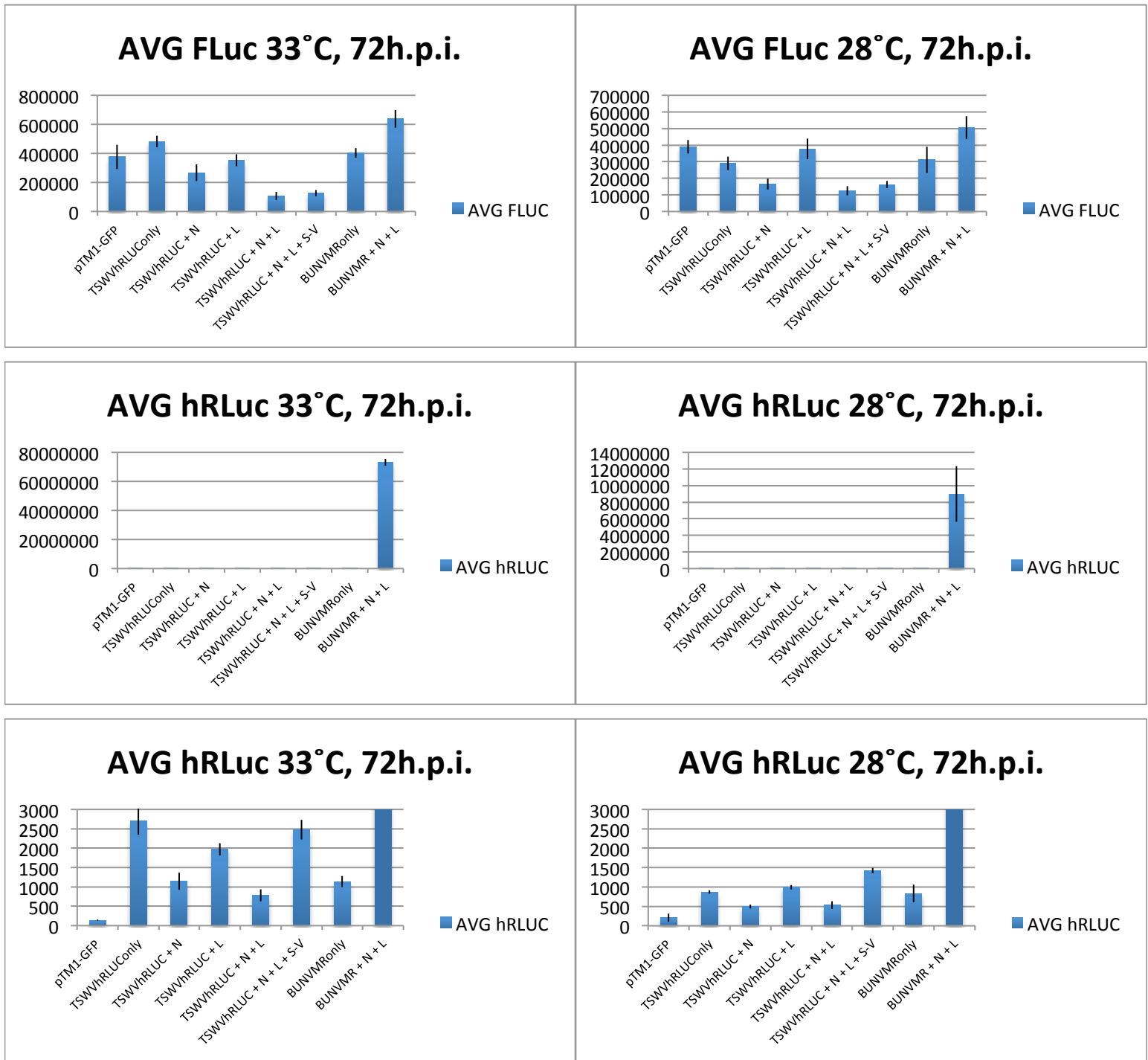
**Figura 50. Valores do controle *firefly* luciferase (FLuc) para o ensaio de atividade de mini-replicon de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) baseado em emissão de luminescência pelo gene-repórter RLuc em células BSR-T7 apresentado na Fig. 49.** Após a transfecção, as células foram mantidas por 16h a 33°C e por 32h a 28°C com 5% de pressão positiva de CO<sub>2</sub>. Os resultados apresentados no gráficos são valores de média +/- desvio padrão de triplicatas biológicas realizadas para cada tratamento. Estes valores não possuem uma unidade e são considerados valores brutos de luminescência. O gráfico superior apresenta os dados em escala numérica proporcional ao maior valor obtido para RLuc. O gráfico de baixo é idêntico ao de cima, mas apresenta os dados em escala cortada a fim de melhor representar as nuances de valores entre os resultados dos diferentes tratamentos. pTM1-GFP – tratamento negativo para atividade de luminescência pois o vetor transfectado não contém RLuc. TS MR RLUC – mini-genoma de TSWV contendo o gene-repórter RLuc em orientação invertida. BUN MR - mini-genoma de *Bunyamwera virus* (BUNV) contendo o gene-repórter hRLuc em orientação invertida. N e L – proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase de TSWV e *Bunyamwera virus* (BUNV) expressas pelo vetor pTM1 (neste experimento as proteínas estruturais virais de TSWV foram usadas apenas em combinação com mini-genoma de TSWV, assim como para BUNV). Favor desconsiderar o ultimo tratamento da esquerda para a direita.

Curiosamente, os níveis de *firefly* luciferase (FLuc), que neste tipo de experimento é utilizado como um controle de equalização entre tratamentos (i.e., tal qual um gene de referência para PCR quantitativa, FLuc deveria ter



aproximadamente o mesmo valor em todos os tratamentos, caso os diferentes tratamentos em si não interfiram com sua atividade), variaram. A figura 50 apresenta os resultados da expressão de FLuc pelo vetor pTM1 para o experimento da Fig. 49. A expressão de FLuc foi diretamente afetada pelo tipo de tratamento realizado. Aparentemente, a expressão das proteínas N e L de BUNV favoreceram maior atividade de FLuc no experimento. Por outro lado, a expressão da proteína N de TSWV no tratamento TS MR RLUC + N apresentou efeito negativo sobre a expressão de luminescência por FLuc. De maneira interessante, o tratamento TS MR RLUC + N + L recuperou a atividade de FLuc a níveis similares aos do tratamento pTM1-GFP. De acordo com o gráfico, os tratamentos contendo apenas os mini-genomas de TSWV e BUNV e o tratamento TS MR RLUC + L representariam os níveis basais de expressão de FLuc para o experimento. Os experimentos de luminescência foram repetidos com cinco diferentes clones de RLuc com incubação a 28°C por 48h. Todos os clones tiveram atividade de RLuc considerada negativa para atividade de mini-replicon (dados não mostrados).

Foram também realizados ensaios para a versão humanizada do gene RLuc, denominada hRLuc. Nestes ensaios, apresentados na figura 51, foram feitas incubações por 72 horas a 33°C ou 28°C. Todos os resultados obtidos para atividade de mini-replicon de TSWV foram negativos. O contraste entre os valores obtidos para todos os tratamentos com o mini-genoma de TSWV e o tratamento com o mini-genoma de BUNV torna evidente a diferença entre as atividades de mini-replicon obtidas. Mini-genomas funcionais produzem sinais de luminescência muito intensos, como pode ser observado para o tratamento BUNMR + N + L. Interessantemente, verificou-se, como apresentado na figura 51, um padrão de alteração dos níveis do controle FLuc em diversos tratamentos, nos quais verifica-se que a expressão da proteína N de TSWV agiu negativamente sobre a luminescência produzida por FLuc. O efeito negativo da expressão da proteína N sobre a luminescência por FLuc é especialmente claro a temperatura de 28°C.



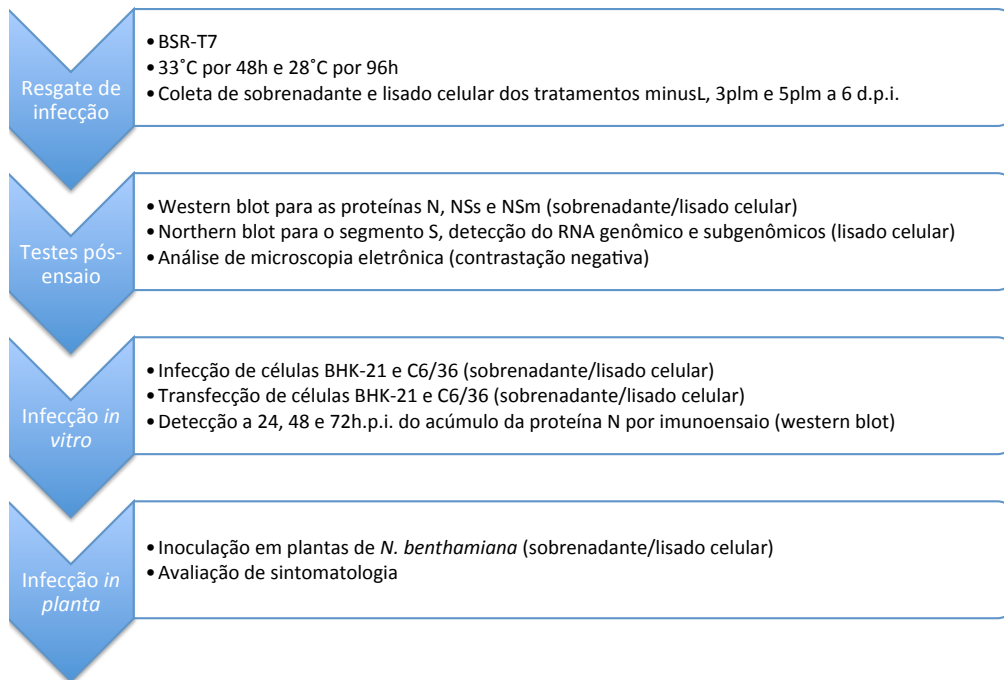
**Figura 51. Ensaios de atividade de mini-replicon de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) baseado em emissão de luminescência (hRLuc) em células BSR-T7.** Após a transfecção, as células foram mantidas a 33°C ou 28°C por 72h em incubadoras com 5% de pressão positiva de CO<sub>2</sub>. Os resultados apresentados para cada tratamento em cada gráfico são valores de média +/- desvio padrão de triplicatas biológicas. Estes valores não possuem uma unidade e são considerados valores brutos de luminescência. O gráfico superior apresenta os dados em escala numérica proporcional ao maior valor obtido para RLuc. O segundo e o terceiro gráficos de cada coluna de cima para baixo são idênticos, mas o gráfico mais abaixo apresenta os dados em escala cortada a fim de melhor representar as nuances de valores entre os resultados dos diferentes tratamentos. Nestes experimentos foi adicionado um tratamento extra (TSWVhRLUC + N + L + S-V) composto pela transfecção do mini-genoma de TSWV (hRLuc), de plasmídeos de expressão das proteínas N e L e, adicionalmente, um plasmídeo de transcrição do segmento viral S RNA em orientação vg (ver texto). TM1-GFP – tratamento negativo para atividade de luminescência pois o vetor transfectado não contém RLuc. TSWVhRLUC – mini-genoma de TSWV contendo o gene-repórter hRLuc em orientação invertida. BUNVMR - mini-genoma de *Bunyamwera virus* (BUNV) contendo o gene-repórter hRLuc em orientação invertida. N e L – proteínas virais estruturais: capsídeo e polimerase de TSWV e BUNV expressas pelo vetor pTM1 (neste experimento as proteínas estruturais virais de TSWV foram usadas apenas em combinação com mini-genoma de TSWV, assim como para BUNV).

Além dos ensaios de atividade de mini-replicon de TSWV também foram realizados em células BSR-T7 ensaios de resgate de infecção viral. Os ensaios de resgate de infecção viral consistem em tratamentos de co-transfecção de plasmídeos contendo as sequências para transcrição dos segmentos genômicos virais, genes-repórter (mini-genomas de TSWV) e expressão das proteínas virais em diferentes combinações. Cada tratamento foi realizado separadamente em placas de Petri de 60mm de diâmetro. O controle negativo deste tipo de experimento, denominado '**minusL**' (S-V + M-VC + L-V + N) consiste da co-transfecção de plasmídeos de transcrição (pTVT7'R) para o S RNA em orientação vg (S-V), o M RNA em orientação vc (M-VC) e o L RNA em orientação vg (L-V), além do plasmídeo de expressão da proteína N (pTM1). Os experimentos de resgate de infecção tinham como controle positivo a transfecção do vetor pTM1-eGFP ('**posCGFP-pTM1**'). Tanto para minusL quanto para o controle positivo foi feita apenas uma placa (i.e., tratamentos sem réplicas). Outros tratamentos realizados foram: '**5plm**' (S-V + M-VC + L-V + N + L) no qual utilizou-se os mesmos elementos do tratamento minusL com a adição da co-transfecção do plasmídeo de expressão da proteína L (pTM1); '**3plm**' (S-VC + M-VC + L-VC) no qual utiliza-se apenas os plasmídeos de transcrição dos três segmentos virais em orientação vc estimando-se que eles são minimamente suficientes para expressar as proteínas virais estruturais e gerar RNPs e infecção tal qual demonstrado previamente para outros bunyavírus (BUNV, *Schmallenberg virus* – SBV – e RVFV, (Brennan et al., 2011, Bridgen, 2012, Elliott et al., 2013, van Knippenberg et al., 2013); '**VLP**' (S-V + M-VC + TS-MG-GFP + N + L) no qual, em comparação ao tratamento 5plm, o plasmídeo de transcrição do segmento L RNA foi substituído pelo mini-genoma de TSWV contendo o gene-repórter mGFP4 (TS-MG-GFP). Foi incluído ainda mais um controle negativo no qual foi removido o meio de cultura das células crescidas *overnight* em placa de Petri e simplesmente adicionou-se novo meio de cultura ('**noTransf**'). Este último tratamento foi feito para facilitar a comparação entre os diferentes tratamentos a fim de determinar possíveis efeitos citopáticos (CPE, na sigla em inglês) associados ao reagente de transfecção ou ao resgate de infecção propriamente dito. As construções utilizadas em cada

tratamento e o desenho experimental de observação, coleta e usos posteriores dos tratamentos realizados está resumido na Figura 52.

## Resgate de infecção TSWV em células BSR-T7 a 33°C

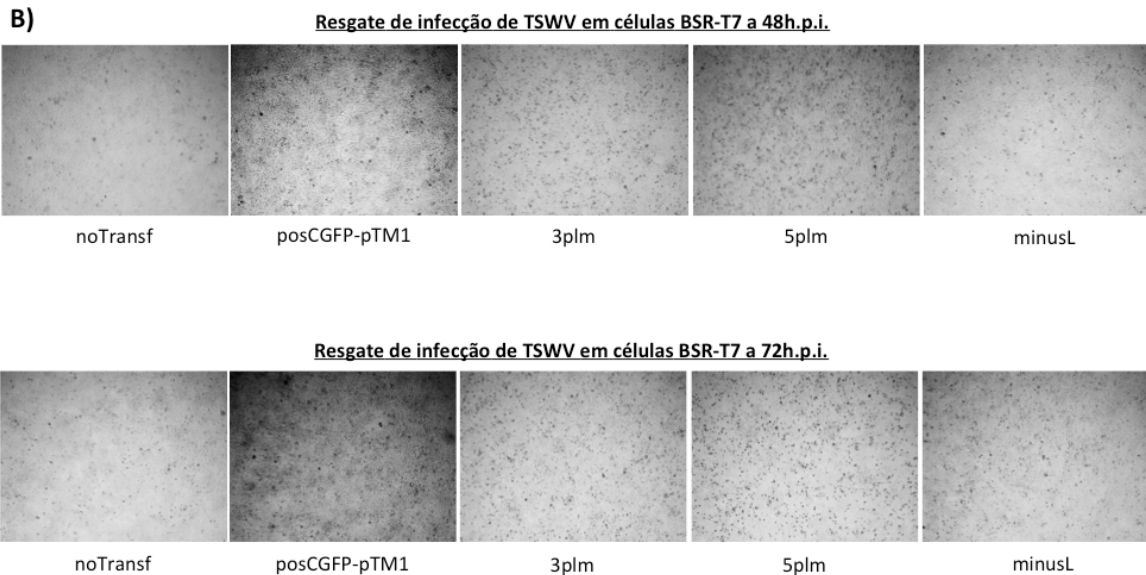
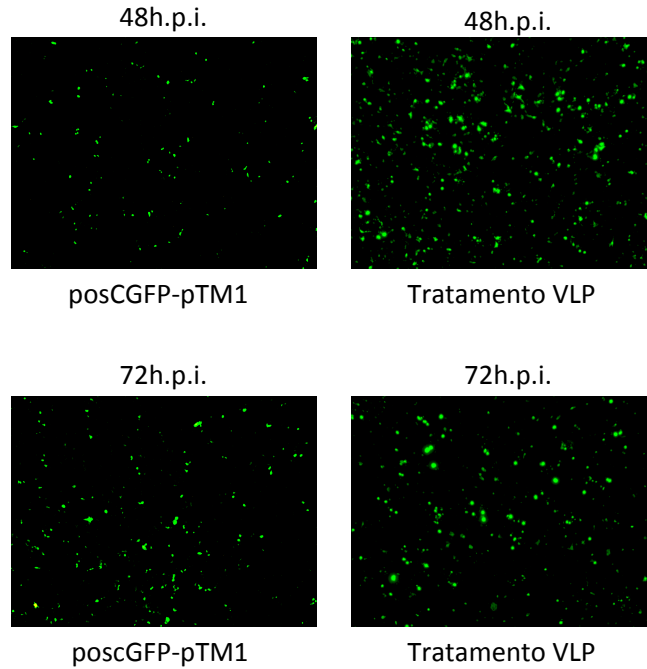
- **Tratamentos**
  - noTransf (x1)
  - posCGFP-pTM1 (x1) [C]
  - minusL (x1) [1, 3, 4, A]
  - VLP (x1) [1, 3, 6, A, B]
  - 3plm (x4) [2, 3, 5]
  - 5plm (x4) [1, 3, 4, A, B]
- **Coletas a 6 d.p.t.**
- **Fotos a 48 e 72 h.p.t.: expressão de mGFP4 (tratamento VLP) e CPE**
- **Vetor de transcrição: pTVT7'R (promotor T7 mínimo, ribozima ao fim dos insertos). Transcritos sem Cap 5' ou cauda poli-A**
  1. S-V
  2. S-VC
  3. M-VC
  4. L-V
  5. L-VC
  6. TSWV MG GFP
- **Vetor de expressão de proteínas: pTM1 (promotor T7 completo e sequência IRES de EMCV)**
  - A. N
  - B. L
  - C. eGFP



**Figura 52. Desenho experimental do ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células BSR-T7 e resumo dos ensaios *a posteriori*.** Na parte superior da figura estão representados os diferentes tratamentos realizados no ensaio de resgate de infecção de TSWV evidenciando a quantidade de replicas para cada tratamento (coluna da esquerda). São mostrados também quais elementos compõem cada tratamento e as principais características dos plasmídeos utilizados (coluna da direita). Na parte de baixo da figura, estão apresentados os principais pontos dos três tipos de ensaios realizados com as amostras biológicas coletadas dos resgates de infecção.

Os tratamentos 5plm e 3plm foram realizados em quadruplicatas a fim de garantir material suficiente para ensaios posteriores (explicados abaixo). É importante frisar que neste ensaio de resgate de infecção, diferentemente de todos os ensaios de atividade de mini-replicon realizados, não foi utilizado na feitura das misturas de DNA dos diferentes tratamentos o vetor pTM1 vazio (denominado *filler*, conf. Fig. 44) visando equilibrar as quantidades de DNA transfectadas e agente de transfecção, pois as quantidades de DNA utilizadas nos tratamentos eram muito altas e não havia DNA do plasmídeo *filler* suficiente, além de evitar o uso de grandes quantidades de agente de transfecção em todos os tratamentos. O ensaio de resgate de infecção de TSWV em células BSR-T7 foi realizado apenas uma vez.

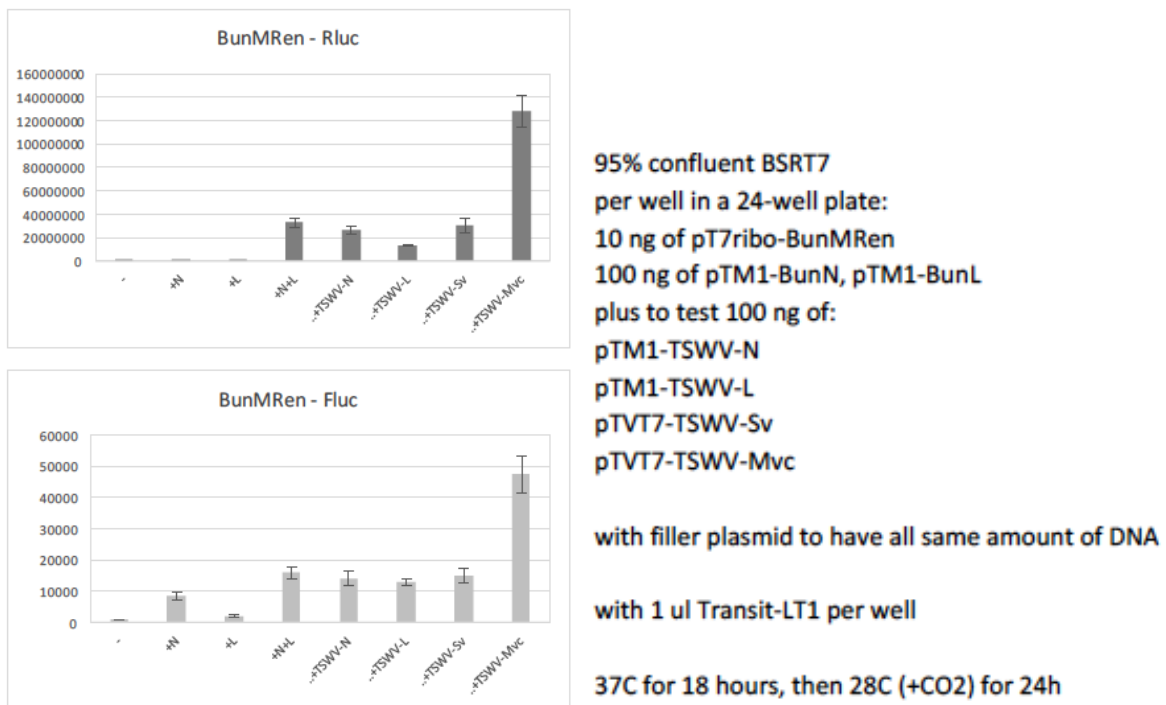
Na Figura 53 são apresentadas as características morfológicas das células BSR-T7 usadas no ensaio de resgate de infecção e a atividade do mini-replicon no tratamento VLP em comparação ao controle positivo pTM1-eGFP. Nela, ressalto que o tratamento VLP gerou mais sinais de fluorescência e mais intensos que o tratamento controle posCGFP-pTM1 tanto a 48h.p.i. quanto a 72h.p.i. (Fig. 53A). Ressalto também que os diversos tratamentos não geraram aparentemente efeitos CPE. Amostras dos diferentes tratamentos foram coletadas a 6 dias pós-infecção (d.p.i.). Para cada tratamento foram feitas coletas tanto dos sobrenadantes das placas quanto das células transfectadas. Os sobrenadantes das réplicas dos tratamentos 5plm e 3plm foram misturados, centrifugados para retirar de solução quaisquer células remanescentes e aliquoteados. As células transfectadas das réplicas dos tratamentos 5plm ou 3plm foram desaderidas fisicamente das placas, ressuspendidas em 4ml de volume total de PBS 1X autoclavado e aliquoteadas.



**Figura 53.** Comparação da atividade de fluorescência entre os tratamentos posCGFP-pTM1 e VLP (A) e análise de efeito citopático (CPE, na sigla em inglês) para os tratamentos (B) do ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) feito em células BSR-T7. A descrição dos diferentes tratamentos e de como foram feitas as transfecções, coletas e análises estão no texto do capítulo 3 e na Fig. 52

Tendo em vista que o tratamento VLP intensificou a fluorescência de mGFP4 visualizada em comparação a atividade vista nos ensaios de mini-replicon (Figs. 45, 46 e 47) e que a co-transfecção do segmento S RNA em orientação vg teve um efeito

de retardo temporal da expressão de fluorescência (Fig. 48), testou-se o efeito da co-transfecção do segmento M RNA em orientação vc. Além disso, foram testadas outras construções de TSWV (N e L em vetor pTM1 e S-V em vetor pTVT7'R) sobre a atividade de mini-replicon hRLuc de BUNV na expectativa de que pudesse ser observado incremento dos níveis de luminescência gerados por M-VC e para observar o efeito das outras proteínas de TSWV (N e L e teoricamente NSs) em um ensaio de luciferase funcional (Figura 54).



**Figura 54. Efeito da co-transfecção de construções de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) [pTM1-N-TSWV, pTM1-L-TSWV, pTVT7'R-S-V-TSWV e pTVT7'R-M-VC-TSWV] sobre a atividade do mini-replicon de *Bunyamwera virus* (BUNV) em ensaios de luminescência (gene repórter hRLuc) em células BSR-T7. O vetor pTM1 foi utilizado para expressar as proteínas estruturais N e L de TSWV e BUNV e o vetor pTVT7'R foi utilizado para transcrição citosólica dos segmentos genômicos virais S RNA em orientação vg (ver texto) e o segmento M RNA em orientação vc. A co-transfecção do segmento M-VC aumentou aproximadamente 4 vezes o valor de expressão do controle *firefly* luciferase (FLuc) e 3 vezes o valor de expressão do gene-repórter hRLuc do mini-genoma de BUNV. A medição da atividade de luciferase foi feita a aprox. 42h p.t. A co-transfecção do vetor pTM1-L-TSWV interferiu negativamente na atividade de mini-replicon de BUNV. Na parte direita da figura são apresentadas as características deste ensaio. Diferentemente do padrão seguido para todos os ensaios de atividade realizados, nesse as células foram incubadas após a transfecção a 37°C ao invés de 33°C.**

De acordo com os dados apresentados na Figura 54, a adição do segmento M-VC de TSWV interferiu positivamente na atividade de mini-replicon de BUNV. A expressão de luminescência por FLuc (controle do ensaio de luminescência) foi

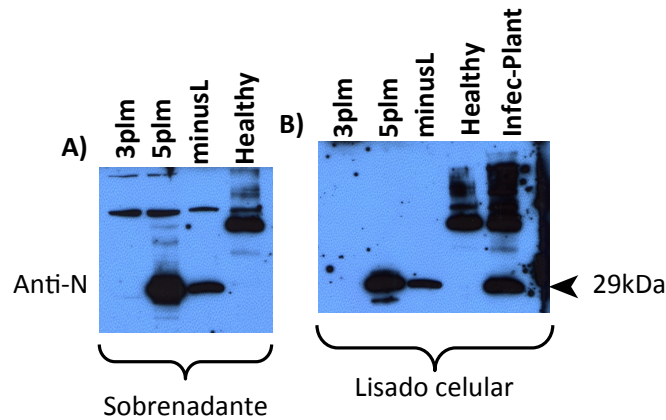
aumentada em quatro vezes na presença do segmento M-VC. Já a atividade do mini-replicon de BUNV (N + L de BUNV em vetor pTM1 + mini-genoma de BUNV contendo hRLuc em vetor pTVT7'R) foi aumentada em três vezes pela presença do segmento M-VC. A adição por co-transfecção do plasmídeo de expressão pTM1-L-TSWV afetou negativamente a atividade do mini-replicon de BUNV. Diferentemente do observado nos ensaios de expressão de luminescência realizados para atividade de mini-replicon de TSWV nos quais a expressão da proteína N impactou negativamente a expressão de FLuc, nos ensaios de atividade de mini-replicon de BUNV o mesmo não foi observado.

Foram realizados ensaios de imunodeteção (western blotting) e hibridização com ribosonda radioativa (northern blotting) nas amostras de sobrenadante e lisados celulares coletados do ensaio de resgate de infecção de TSWV. De acordo com a figura 55, observa-se que a proteína N de TSWV foi detectada no ensaio de resgate de infecção realizado em células BSR-T7 no sobrenadante dos tratamentos 5plm e minusL (Fig. 55A) e, igualmente, nos lisados celulares de 5plm e minusL (Fig. 55B). Na figura 56, a imunodeteção da proteína NSs de TSWV foi fracamente positiva para o lisado celular do tratamento 3plm e negativa para os tratamentos 5plm e minusL. A proteína NSs detectada no tratamento 3plm, no entanto, não apresentou massa molecular (i.e. padrão de migração) similar ao do controle positivo (TSWV - folha sistemicamente infectada de *N. benthamiana*). Em repetição do western blot para a proteína NSs não houve detecção (dados não mostrados). Não foi realizada detecção para a proteína NSs em amostras de sobrenadante do ensaio de resgate de infecção de TSWV em células BSR-T7. Foram também realizados ensaios de inoculação mecânica das amostras de sobrenadante e lisados celulares do ensaio de resgate de infecção de TSWV em células BSR-T7 em plantas de *N. benthamiana*. Após 21 dias, nenhuma lesão local ou manifestação sistêmica de infecção foram observados (dados não mostrados). Ensaios de infecção das amostras de sobrenadante e lisados celulares dos diferentes tratamentos do mesmo ensaio de resgate de infecção foram realizados em células BHK-21 e C6/36 e amostras foram coletadas após 24, 48 e 72h da infecção para



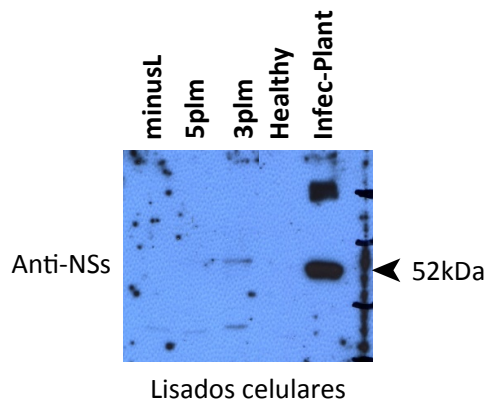
detecção da proteína N de TSWV. Não houve detecção da proteína N para nenhuma das tentativas de infecção (dados não mostrados).

**Western Blotting BSR-T7 rescues, 6d.p.t.**

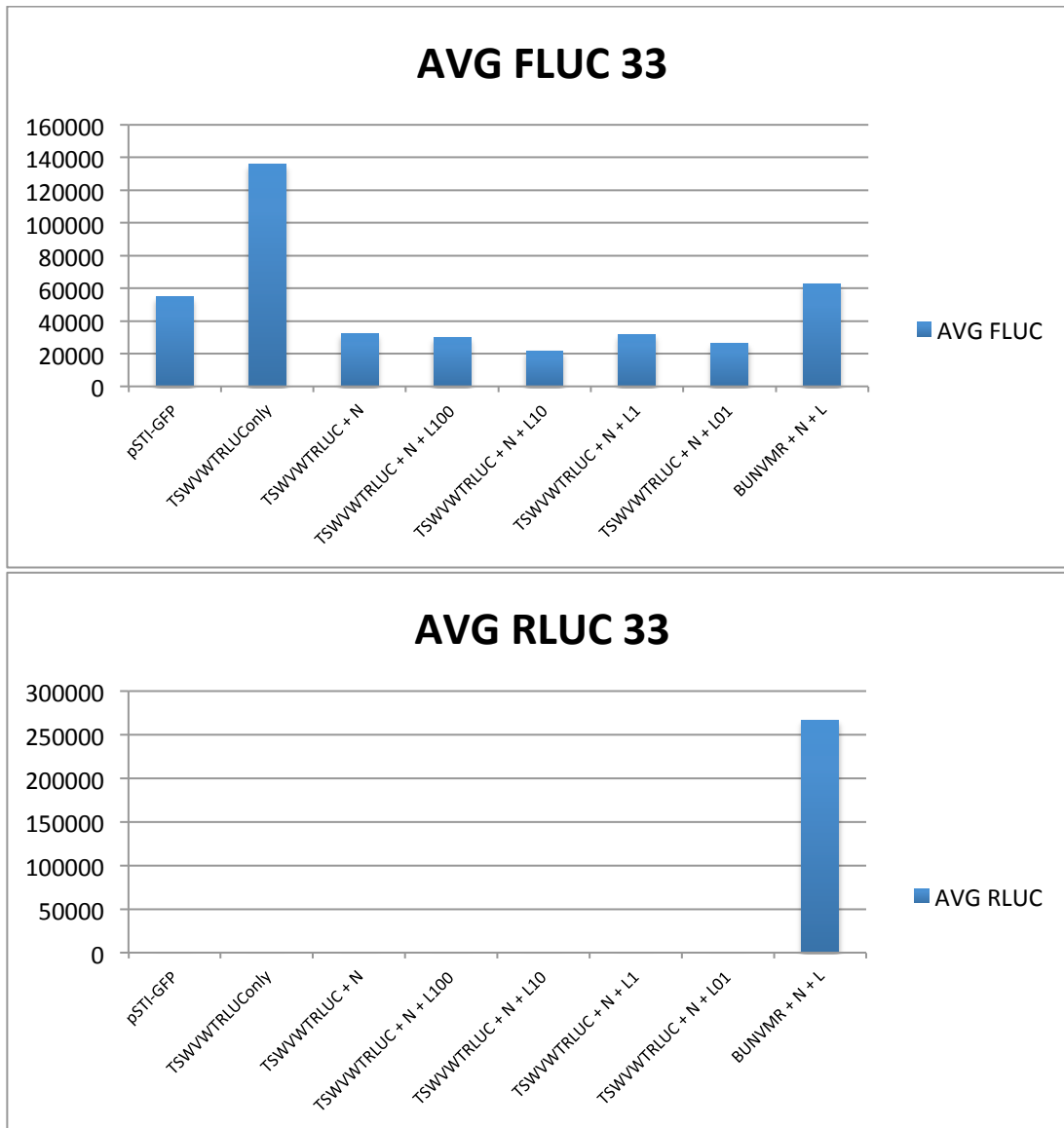


**Figura 55. Detecção por western blotting da proteína N de TSWV utilizando anticorpo policlonal contra a proteína N purificada de plantas infectadas por TSWV-p105 em amostras de sobrenadante e lisados celulares do ensaio de resgate de infecção de TSWV em células BSR-T7 coletadas a 6d.p.t.** A) Amostras de sobrenadante do ensaio, das quais 5plm e minusL são positivas para a expressão da proteína N. B) Amostras de sobrenadante do ensaio, das quais 5plm e minusL são positivas para a expressão da proteína N. Os tratamentos 3plm, 5plm e minusL são explicados em detalhe na figura 52. Healthy – amostras de proteína total de folha de *N. benthamiana* não infectada. Infec-Plant – amostra de proteína total de folha de *N. benthamiana* sistemicamente infectada por TSWV p105. A seta à direita indica a posição nas membranas e a massa molecular da proteína N de TSWV.

**Western blotting TSWV rescue in BSR-T7, 6d.p.t.**



**Figura 56. Detecção por western blotting da proteína NSs de TSWV em amostras de lisados celulares do ensaio de resgate de infecção de TSWV em células BSR-T7 coletadas a 6d.p.t.** Os tratamentos 3plm, 5plm e minusL são explicados em detalhe na figura 52. Healthy – amostras de proteína total de folha de *N. benthamiana* não infectada. Infec-Plant – amostra de proteína total de folha de *N. benthamiana* sistemicamente infectada por TSWV p105. A seta à direita indica a posição nas membranas e a massa molecular da proteína NSs de TSWV.

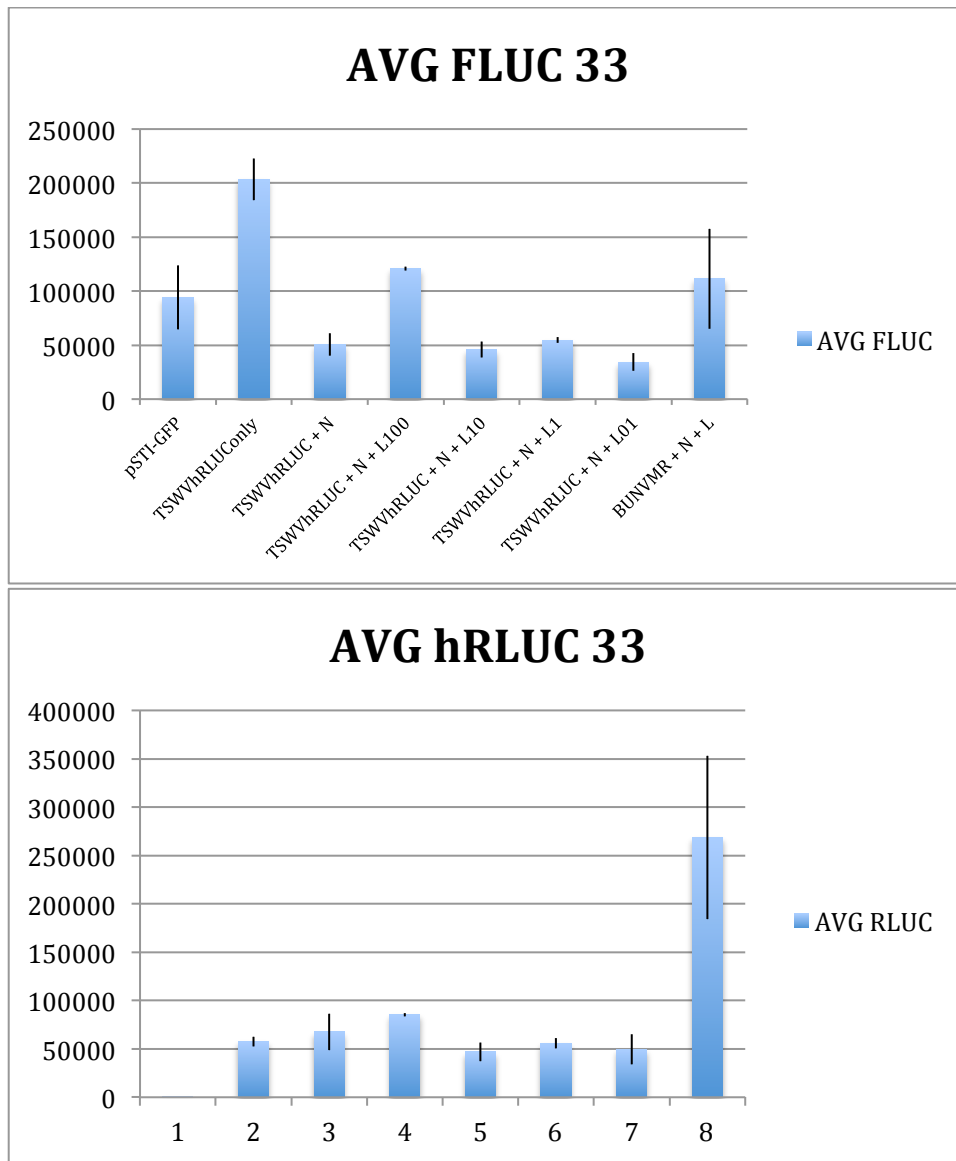


**Figura 57. Ensaio de expressão de luminescência (RLuc) por atividade de mini-replicon de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7. Após a transfecção as células foram mantidas a 33°C por 72h até coleta e mensuração da luminescência. O controle positivo BUNVMR + N + L foi o único a apresentar atividade entre todos os tratamentos. Neste ensaio foi realizada uma titulação do plasmídeo pSTI expressando a proteína L. Foram usados 100, 10, 1 e 0,1 ng/μl do vetor pSTI-L-TSWV nas misturas de DNA. pSTI-GFP – controle negativo do ensaio. TSWVWTRLUConly – tratamento apenas com o mini-genoma de TSWV carregando o gene RLuc em orientação invertida. N e L são proteínas estruturais (capsídeo e polimerase viral, respectivamente) de TSWV e *Bunyamwera virus* (BUNV).**

Os ensaios de atividade de mini-replicon em células C6/36-T7 não foram realizados com o gene repórter mGFP4 visto que os plasmídeos pSTI utilizados para expressão das proteínas N e L de TSWV continham o gene eGFP fusionado ao gene de resistência a higromicina no *backbone* do vetor, logo foram realizados apenas

ensaios de atividade de mini-replicon com os genes repórter RLuc e hRLuc (Figuras 57 e 58). Destes ensaios, em contraste ao controle positivo de atividade de mini-replicon de BUNV, concluiu-se que não houve atividade de mini-replicon de TSWV que se pudesse considerar positiva. As sequências dos genes RLuc e hRLuc, suas orientações em relação ao promotor e a ribozima no vetor pTVT7'R e as sequências tanto da ribozima HDV quanto do promotor T7 mínimo foram conferidas e não apresentaram mutações em relação as sequências planejadas *in silico*. Tendo em vista que também para os experimentos em células C6/36-T7 a expressão das proteínas estruturais N e L de TSWV interferiu com a atividade de luciferase FLuc, RLuc e hRLuc, conclui-se que o sistema de gene-repórter luciferase não é compatível com a genética reversa de *Tospovirus* possivelmente devido a algum efeito tóxico.

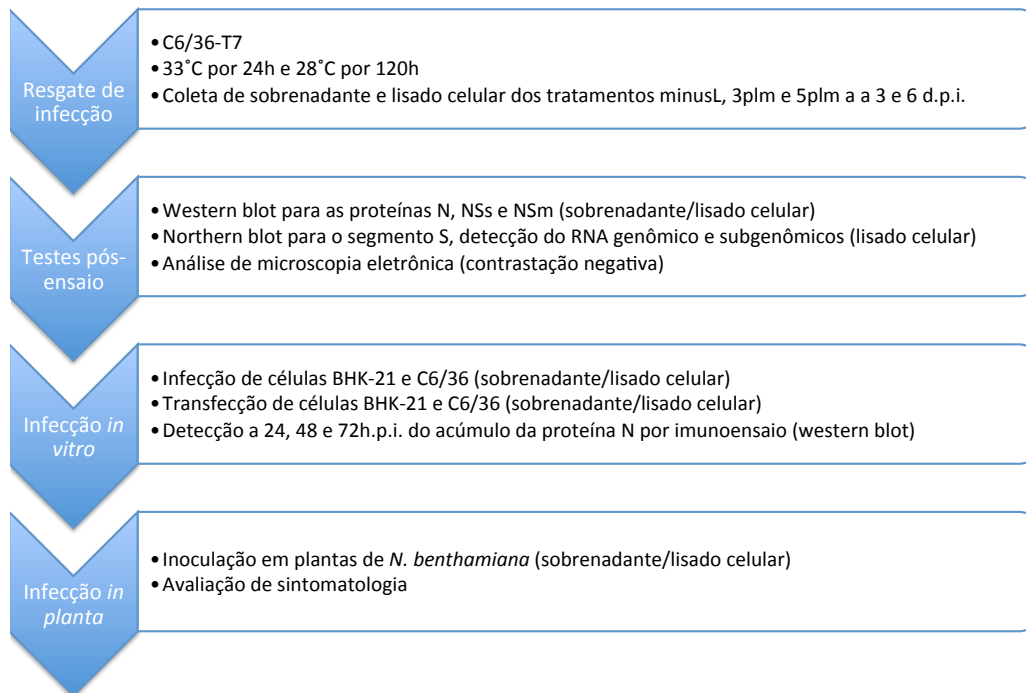
Ensaios de resgate de infecção de TSWV também foram realizados em células C6/36-T7 (Figura 59). Nestes, não foi realizado o tratamento VLP tendo em vista a presença de eGFP no *backbone* do vetor pSTI. Diferentemente do que foi realizado para o ensaio de resgate de infecção de TSWV em células BSR-T7, o ensaio em células C6/36-T7 foi coletado a 3d.p.t., além de 6d.p.t. Para o ensaio de resgate de infecção de TSWV em células BSR-T7 foi feita observação das células para efeitos citopáticos, coleta de sobrenadante e células para imunoenaios, infecção *in vitro* de células BHK-21 e C6/36 e inoculação mecânica *in planta*, tal qual para o ensaio realizado em células BSR-T7 (Fig. 59).



**Figura 58. Ensaio de expressão de luminescência (hRLuc) por atividade de mini-replicon de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7. Após a transfecção as células foram mantidas a 33°C por 72h até coleta e mensuração da luminescência. O controle positivo BUNVMR + N + L foi o único a apresentar atividade entre todos os tratamentos. Neste ensaio foi realizada uma titulação do plasmídeo pSTI expressando a proteína L. Foram usados 100, 10, 1 e 0,1 ng/μl do vetor pSTI-L-TSWV nas misturas de DNA. pSTI-GFP – controle negativo do ensaio. TSWVhRLUConly – tratamento apenas com o mini-genoma de TSWV carregando o gene hRLuc em orientação invertida. N e L são proteínas estruturais (capsídeo e polimerase viral, respectivamente) de TSWV e *Bunyamwera virus* (BUNV). No gráfico de baixo os números 1 a 8 representam os tratamentos descritos no gráfico de cima, na mesma ordem.**

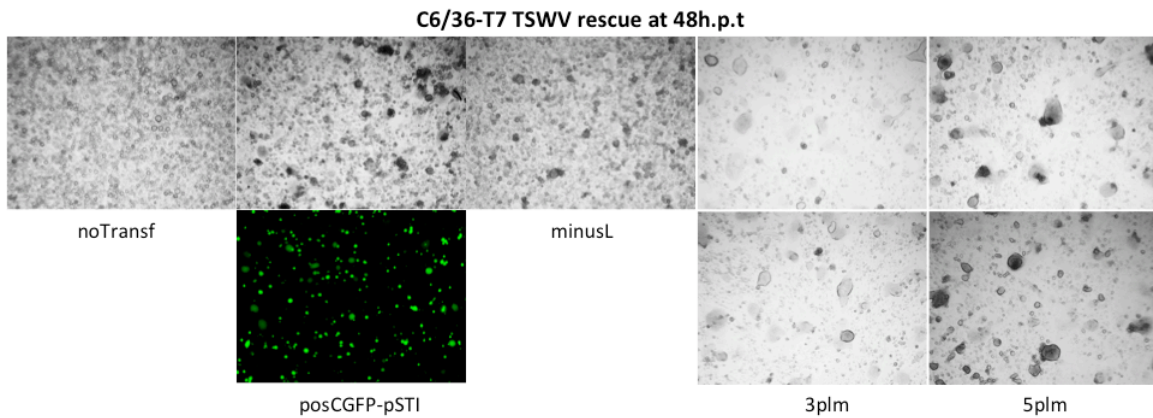
## Resgate de infecção TSWV em células C6/36-T7 a 33°C + 28°C

- **Tratamentos**
  - noTransf (x1)
  - posCGFP-pSTI (x1) [C]
  - minusL (x1) [1, 3, 4, A]
  - 3plm (x4) [2, 3, 5]
  - 5plm (x4) [1, 3, 4, A, B]
- **Coletas a 3 e 6 d.p.t.**
- **Fotos a 48 e 72 h.p.t.: eficiência de transfecção e análise de CPE**
- **Vetor de transcrição: pTVT7'R** (promotor T7 mínimo, ribozima ao fim dos insertos). Transcritos sem Cap 5' ou cauda poli-A
  1. S-V
  2. S-VC
  3. M-VC
  4. L-V
  5. L-VC
  6. TSWV MG GFP
- **Vetor de expressão de proteínas: pSTI** (promotor Poli-ubiquitina 5 de *D. melanogaster*)
  - A. N
  - B. L
  - C. eGFP fusionado ao gene de resistência a higromicina



**Figura 59. Desenho experimental do ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7 e resumo dos ensaios *a posteriori*.** Na parte superior da figura estão representados os diferentes tratamentos realizados no ensaio de resgate de infecção de TSWV evidenciando a quantidade de replicas para cada tratamento (coluna da esquerda). São mostrados também quais elementos compõem cada tratamento e as principais características dos plasmídeos utilizados (coluna da direita). Na parte de baixo da figura, estão apresentados os principais pontos dos três tipos de ensaios realizados com as amostras biológicas coletadas dos resgates de infecção.

A análise de efeitos citopáticos a 48h p.t. é apresentada na figura 60. Nela, é possível ver que há fortes sinais de formação de sincício celular nos tratamentos 3plm e 5plm, enquanto nos tratamentos minusL, posCGFP e noTransf a morfologia celular é normal. A eficiência de transfecção foi aferida, com 70-80% das células expressando eGFP em um campo.

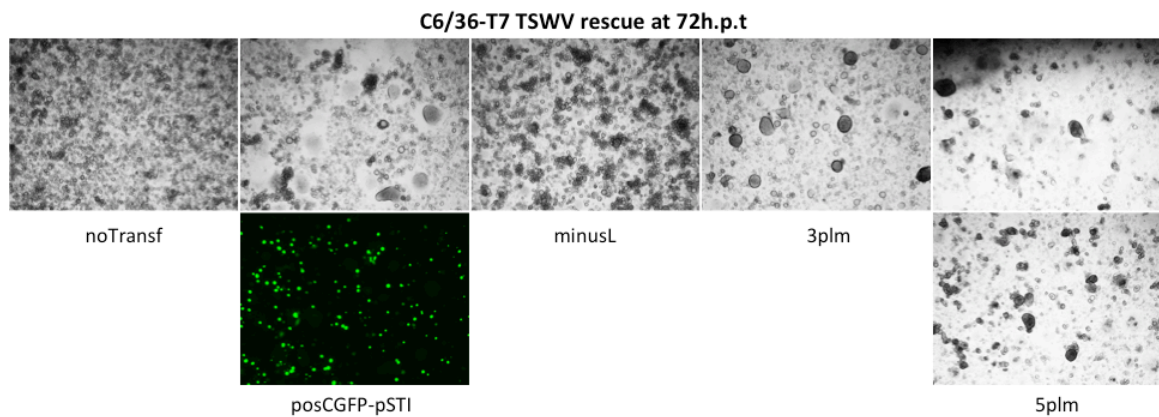


**Figura 60. Análise de efeitos citopáticos (CPE na sigla em inglês) observados a 48h p.t. para o ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7.** Os diferentes tratamentos são explicados em detalhe na figura 59. Para o tratamento posCGFP-pSTI apresentado na foto superior a aparência do campo claro (luz transmitida) e na foto inferior a fluorescência emitida por eGFP (controle de transfecção). Para os tratamentos 3plm e 5plm apresento fotos de duas das quatro replicas experimentais realizadas. Nestas, é possível observar alteração da morfologia celular de C6/36-T7 apresentando sinais de sincício celular.

A 72h.p.i., no entanto, o controle posCGFP também apresentou sinais de CPE, mas os tratamentos minusL e noTransf permaneceram com morfologia celular característica (Figura 61). A ocorrência de CPE para o tratamento controle posCGFP pode ser referente ao efeito do envelhecimento do agente de transfecção no meio de cultura ou ao fato de que o vetor pSTI-T7-eGFP expresse a proteína T7 RNA polimerase que no contexto das células C6/36-T7 já é constitutivamente expressa. Curiosamente, a ocorrência de CPE para os tratamentos 3plm e 5plm foi associada a coloração amarelada do meio de cultura L-15. Placas de Petri das réplicas dos tratamentos 3plm cuja coloração estava roxa ou amarelada apresentaram morfologia celular diferenciada (Figura 62). Quando o meio de cultura estava amarelado (Yellow media, na Fig. 62) observou-se os efeitos de CPE, como formação de sincício celular. Quando o meio de cultura não ficou amarelado, eventualmente

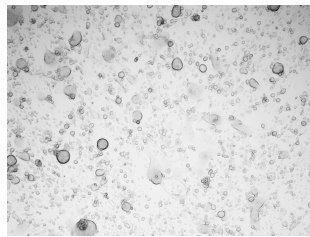
tornando-se roxo (Purple media, na Fig. 62), não foi visualizado nenhum tipo de efeito CPE e as células apresentaram morfologia similar à do controle noTransf.

Nos ensaio de western blot não foi verificada detecção das proteínas N ou NSs seja em amostras de sobrenadante ou de lisado celular para nenhum dos tempos de coleta (3d.p.t. ou 6d.p.t., dados não mostrados). Nos ensaios de infecção *in vitro* também não foi detectada proteína N ou seu acúmulo, a 24, 48 ou 72h p.t. (dados não mostrados). A inoculação mecânica de amostras de sobrenadante e lisado celular em plantas de *N. benthamiana* também não gerou lesões locais ou infecção sistêmica após 21 dias da inoculação (dados não mostrados).

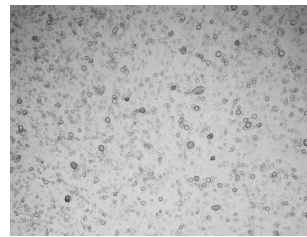


**Figura 61. Análise de efeitos citopáticos (CPE na sigla em inglês) observados a 72h p.t. para o ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7.** Os diferentes tratamentos são explicados em detalhe na figura 59. Para o tratamento posCGFP-pSTI apresentado na foto superior a aparência do campo claro (luz transmitida) e na foto inferior a fluorescência emitida por eGFP (controle de transfecção). Para o tratamento 5plm apresento fotos de duas das quatro replicas experimentais realizadas. Para os tratamentos posCGFP-pSTI, 3plm e 5plm é possível observar alteração da morfologia celular de C6/36-T7 apresentando sinais de sincício celular.

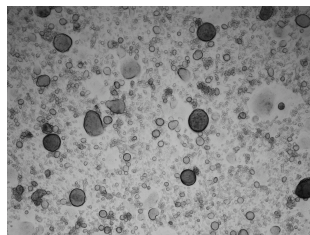
### C6/36-T7 TSWV rescue 3plm treatment



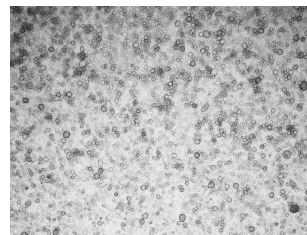
Yellow media – 48h.p.t.



Purple media – 48h.p.t.



Yellow media – 72h.p.t.

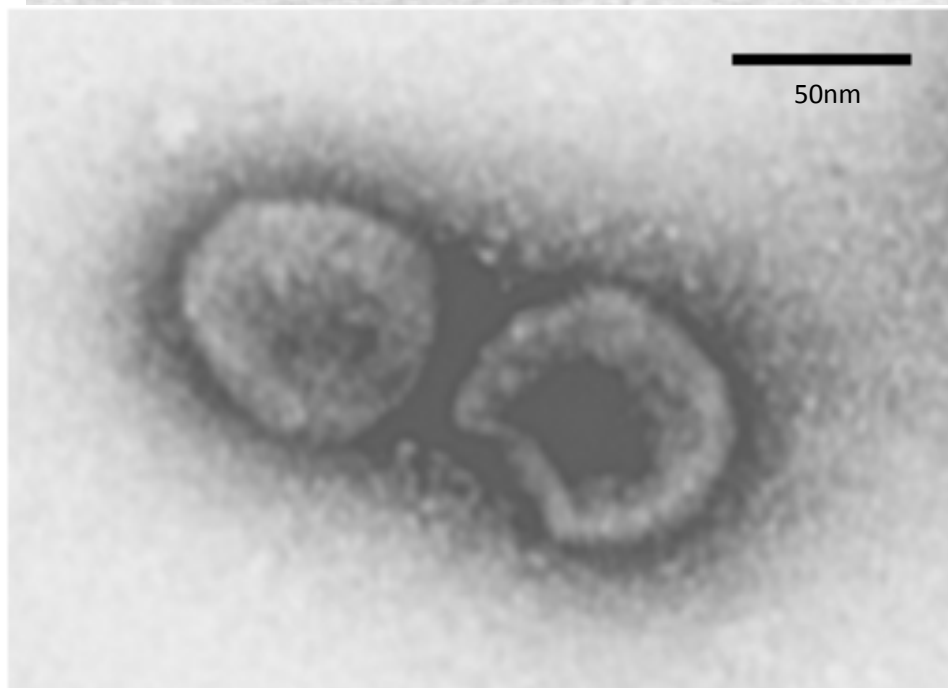
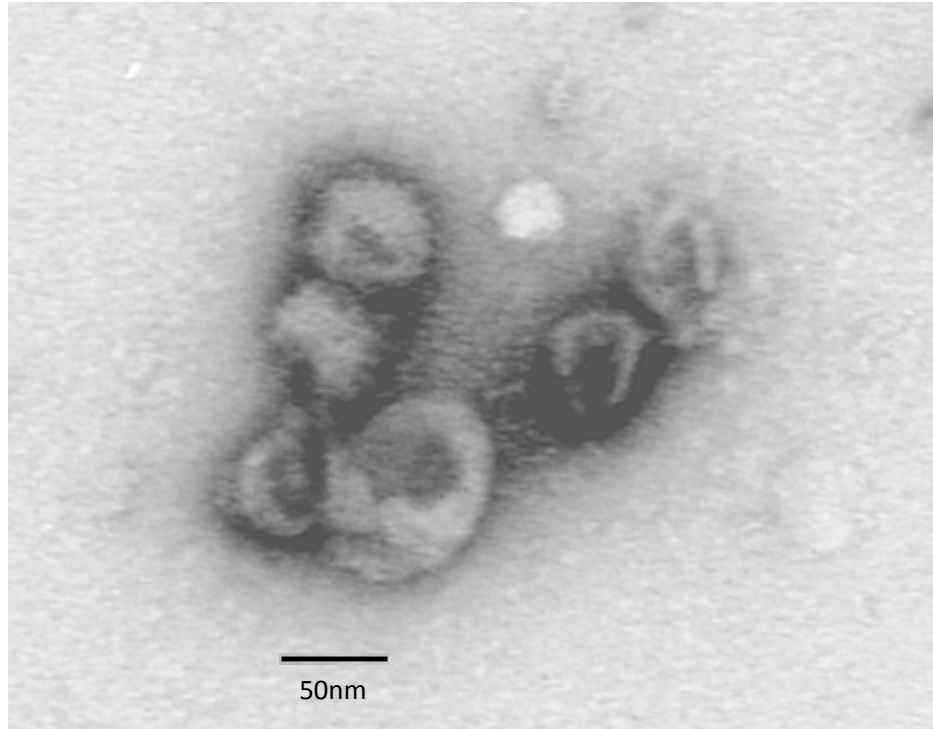


Purple media – 72h.p.t.

**Figura 62. Análise de surgimento de efeitos citopáticos (CPE, na sigla em inglês) associados a coloração do meio de cultura para o tratamento 3plm (ver Fig. 59) em células C6/36-T7.** Na figura, a coloração amarelada do meio (Yellow media) correlacionou-se à presença de sincícios celulares e uma coloração do meio arroxeada (Purple media) correlacionou-se à ausência de CPE, seja a 48h p.t. que a 72h p.t.

Análises de microscopia realizadas em parceria com o *Istituto di Protezione Sostenibile delle Piante* (IPSP – Itália, Dra. Vera Masenga) para os diferentes tratamentos do ensaio de resgate de infecção de TSWV em células C6/36-T7 não mostraram presença de RNPs para nenhum dos tratamentos (dados não mostrados). Para o tratamento 5plm (amostra de lisado celular) coletado a 3 d.p.i. foram vistas partículas agrupadas em dois quadrantes para apenas uma das réplicas do experimento (Figura 63). De acordo com a barra de medida, no entanto, as partículas vistas possuem tamanho inferior (aprox. 50nm de diâmetro) ao esperado para verdadeiras partículas de *Tospovirus* (80-120nm de diâmetro).





**Figura 63. Análise de microscopia eletrônica por contrastação negativa de uma amostra de lisado celular do tratamento 5plm (ver figura 59) do ensaio de resgate de infecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em células C6/36-T7 a 3d.p.i. Nas duas figuras vê-se partículas agrupadas (painel superior) e partículas individuais, mas proximamente localizadas (painel inferior). Para os outros tratamentos do ensaio de resgate de infecção de TSWV (figura 59) não houve visualização de partículas virais, *virus-like* (VLP) ou ribonucleoproteínas (RNPs). A barra de medida é equivalente a 50nm.**

## Discussão

O desenvolvimento de um sistema de genética reversa para tospovírus se faz necessário pois, até o momento, boa parte dos trabalhos de interação proteína-proteína, localização subcelular e função de proteínas virais para o gênero tem sido feitos em sistemas onde as proteínas virais não estão presentes como um todo (i.e., N, NSs, NSm, L e glicoproteínas virais co-expressas heterologamente ao mesmo tempo) e não há infecção viral pelo vírus que se deseja estudar. Somente quando se for capaz de manipular uma sequência viral ou uma artificial, reconhecida como viral, e reintroduzir esta sequência no contexto de uma célula infectada para verificar seu funcionamento é que será possível ter noção real dos diferentes papéis, interações e localizações das proteínas virais. A produção deste conhecimento é de interesse, por exemplo, para o desenvolvimento de estratégias de defesa de cultivares contra tospovírus. Os tospovírus estão entre os maiores causadores de perdas econômicas de produção e estão presentes em virtualmente todas as zonas agrícolas do mundo onde haja populações do inseto vetor e estão no *ranking* dos top 10 vírus vegetais mais importantes do mundo (Scholthof et al., 2011, Rybicki, 2015).

Recentemente um sistema de genética reversa baseado em mini-replicon foi descrito para um vírus de planta de polaridade negativa *Sonchus yellow net virus* (SYNV, *Nucleorhabdovirus* – *Rhabdoviridae*) por Ganesan e colaboradores (2013). Neste trabalho, os autores promovem a co-infiltração de genes repórter inseridos em um arcabouço de genoma viral com vetores binários expressando as proteínas necessárias para replicação e transcrição de mRNAs: capsídeo (N), polimerase (L) e fosfoproteína (P). A expressão dos genes repórter se deu em múltiplos focos de replicação e só foi mais intensamente visualizada quando co-infiltrados simultaneamente três supressores de silenciamento gênico, demonstrando que, embora o grupo tenha sido bem-sucedido, trata-se de uma expressão pouco eficiente do gene repórter. Enquanto os nucleorhabdovírus sabidamente infectam o núcleo das células, as infecções por tospovírus são restritas ao citoplasma e esta é uma diferença crucial na aplicação da metodologia sugerida pelo grupo.

Em comunicação pessoal com o Dr. Richard Elliot da Universidade de Glasgow soube-se que de acordo com a *expertise* deste pesquisador, um expoente dos sistemas de genética reversa para membros da família *Bunyaviridae*, a utilização de vírus *helper* como provedor de todas as proteínas virais para encapsidação e replicação de um mini-genoma introduzido artificialmente nunca foi eficiente. Na experiência do grupo escocês, a super-expressão de proteínas virais L e N por promotores virais fortes (fago T7 principalmente) é melhor condutora da replicação e expressão de mini-genomas. O Dr. Elliott levantou ainda a possibilidade de que se trabalhasse em outros sistemas celulares, para os quais as culturas de células são mais eficientes, como leveduras, células de insetos e mamíferos. Atualmente não existem culturas de células primárias de tripes disponíveis, como as realizadas por Nagata e colaboradores (1997). Estas seriam de grande valia para a realização de estudos moleculares de tospovírus.

Durante três anos foram testadas estratégias de genética reversa por meio do tratamento com vírus auxiliar e, é de comum-acordo neste grupo de pesquisas que a metodologia não é funcional. Provavelmente, para a entrega de RNAs exógenos no contexto da infecção viral seria necessário que o RNA transcrito dos mini-genomas fosse complexado *a priori* a proteína do capsídeo. No tempo transcorrido do doutorado sanduíche na Itália cogitou-se a realização de experimentos com este intuito, mas eles não ocorreram. Pensou-se em purificar a proteína N a partir de purificação de RNPs virais extraíndo-as do gel e renaturando-as na presença de RNA transcrito para posteriormente inocular mecanicamente e transfectar todo o conjunto complexado em plantas e protoplastos, respectivamente. Na opinião do Dr. Richard Kormelink, líder de pesquisas do principal grupo científico de tospovirologia da Europa, proferida durante sessão de discussão no Simpósio Internacional de Tripes e Tospovírus – ISTT – na Califórnia em 2015, os protoplastos são células vegetais muito estressadas e que se mantêm por pouco tempo viáveis para uso em ensaios de genética reversa para tospovírus. De fato, em pouco tempo após a liberação dos protoplastos é já iniciada síntese *de novo* de parede celular, diminuindo progressivamente a eficiência de ensaios de transfecção.

A taxa de decaimento da população em meios de cultura como os saís de Aoki, nos quais não estão presentes hormônios vegetais é da ordem de 25 a 50% a cada 24h (Dr. Massimo Turina, comunicação pessoal).

A experiência obtida com a inoculação mecânica de RNAs transcritos também provou-se mal sucedida. O ato de inocular mecanicamente folhas sistemicamente infectadas perturba significativamente a integridade dos tecidos vegetais foliares mesmo quando as folhas tratadas são enxaguadas imediatamente após os tratamentos. Entre 12 a 24h após o tratamento as folhas de *N. benthamiana* apresentavam-se necrosadas e queimadas e renderam muito pouco RNA total, levando-nos a optar pela planta modelo *D. stramonium* para a qual os tecidos foliares foram mais resistentes ao tratamento.

Optou-se portanto em tentar realizar genética reversa de TSWV fora do contexto das células vegetais. Em parceria com o laboratório do Dr. Elliott, estabelecida em meados do ano de 2015, e posta em prática durante 30 dias entre os meses de janeiro e fevereiro de 2016, foram obtidos dados conclusivos que apontam o funcionamento de um sistema de genética reversa para TSWV baseado em atividade de mini-replicon expressando o gene-repórter mGFP4 em células de hamster que expressam constitutivamente o gene da T7 RNA polimerase (linhagem BSR-T7). O feito obtido e descrito na seção 5 deste capítulo (Figs., 45 a 48) é inédito dentro do corpo de conhecimento produzido até o momento para o gênero *Tospovirus*. É importante ressaltar que além do ineditismo da obtenção de resultados positivos para a genética reversa de TSWV trata-se da demonstração de expressão funcional da proteína L (polimerase viral) em um contexto celular de células de mamífero. Como demonstrado na Figura 48, foi-se além da obtenção de resultados de prova conceitual de funcionamento do sistema de genética-reversa: demonstrou-se que a co-transfecção do segmento S em orientação vg interferiu na expressão do gene repórter mGFP4, atrasando-a. Não é possível precisar pelos dados obtidos se este fenômeno de interferência (e.g. atraso na expressão de mGFP4) é devido a competição entre o mini-genoma e o segmento S pela polimerase, ou se trata-se de um efeito da expressão da proteína NSs. Para tanto, a produção de

vetor pTM1 contendo como inserto o gene da proteína NSs de TSWV seria de interesse.

Os resultados apresentados para a atividade de mini-replicon em células BSR-T7 foram avaliados a partir de 48h p.t. Optou-se por fazer as observações e mensurações das atividade de mini-replicon a partir deste ponto temporal pois assumiu-se que por tratar-se da expressão de proteínas de um vírus adaptado ao ambiente celular de plantas e insetos, o contexto de células de mamífero poderia ser desfavorável a observação de atividade biológica das proteínas virais em tempo inferior. Geralmente, para ensaios de mini-replicon de outros bunyavírus adaptados ao contexto de células de mamífero, o tempo de coleta e análise de dados é de no máximo 24h (Benjamin Brennan, comunicação pessoal).

Daniel Duijsings (2001) em sua tese de doutorado na Universidade de Wageningen (WUR, Holanda) intitulada “Transcription Initiation of *Tomato spotted wilt virus*” também realizou pesquisa na tentativa de obtenção de um sistema de genética reversa para TSWV. Em sua tese, no capítulo 4, Duijsings apresenta os resultados obtidos para atividade de luminescência do gene-repórter FLuc em um sistema de co-transfecção de células BHK-21 com um mini-genoma baseado no segmento S RNA de TSWV (modificado para inserção do gene FLuc no lugar do gene NSs) e um vetor de expressão da proteína L. Em seu sistema experimental, as células BHK-21 eram infectadas com *Vaccinia virus* modificado geneticamente para expressão da proteína T7 RNA polimerase. Assim, a T7 RNA polimerase expressa na célula serviria para transcrição do segmento S RNA que por sua vez seria replicado/transcrito em seus mRNAs pela proteína L de TSWV. Tendo em vista que o sistema utilizado por Duijsings era baseado no segmento S RNA, o próprio mini-genoma seria provedor da proteína N de TSWV. Em seus resultados Duijsings apresenta a detecção das proteínas N e L e a detecção de luminescência a partir do gene FLuc. Duijsings relata que o sinal de luminescência era perdido a medida que mais proteína N se acumulava na células hospedeira.

Este último resultado está de acordo com os dados obtidos e aqui apresentados neste capítulo. No entanto, Duijsings estabelece uma relação entre o acúmulo da proteína N e o direcionamento da polimerase de TSWV para uma atividade de replicação das moléculas de S RNA em detrimento a atividade de transcrição dos mRNAs dos genes N e FLuc. Neste capítulo são apresentados nas figuras 49 a 51 dados que demonstram que a co-expressão da proteína N com o mini-genoma na ausência da proteína N é suficientemente para alterar os níveis de atividade de luminescência tanto dos genes-repórter RLuc e hRLuc quanto do controle FLuc, assim indicando que a presença da proteína N sozinha já é capaz de alterar tais ensaios de luminescência.

Os valores obtidos por Duijsings para atividade de luminescência, ainda que não diretamente correlacionáveis aos obtidos no Capítulo 3 desta tese de doutorado, foram muito baixos (cerca de 3.500 RLU), especialmente quando comparados aos valores obtidos para o modelo de mini-replicon de *Bunyamwera virus*. Hoje, à luz do conhecimento já produzido para outros bunyavírus e à luz do funcionamento obtido para o gene RLuc em ensaios de atividade de mini-replicon, os valores obtidos por Duijsings seriam considerados como ruído de fundo (*background expression*).

Apresento nas figuras 45 a 47 que a co-tranfecção do mini-genoma de TSWV contendo mGFP4 e do vetor pTM1 para expressão da polimerase viral L foi suficiente para comprovar atividade de mini-replicon de TSWV. Este resultado foi inesperado, visto que acredita-se que a proteína do capsídeo, N, necessita estar associada ao RNA viral para formação de complexos RNP que sejam transcricionalmente e replicativamente funcionais. É possível que a expressão da proteína L promovida no sistema celular utilizado, dirigido pela atividade de T7 RNA polimerase, produza proteína L em quantidade suficiente para sobrepor a necessidade da proteína N na atividade de transcrição/replicação de moléculas de RNA virais, ou ainda que existam outras proteínas celulares sendo expressas no contexto das células BSR-T7 que possam ter se associado ao RNA do mini-genoma promovendo a atividade de mini-replicon observada.

É importante frisar que os dados obtidos para atividade de mini-replicon de TSWV com o gene-repórter não foram confirmadas com outros dois genes-repórter, RLuc e hRLuc, possivelmente devido a efeitos citotóxicos da expressão das proteínas estruturais N e L de TSWV no contexto das células de hamster e mosquito ou a interferência dessas proteínas virais na atividade catalítica de RLuc e hRLuc. Pode-se observar pelas figuras 49-51 que a expressão da proteína N, especialmente, exerceu efeito negativo sobre a atividade de mini-replicon de TSWV e sobre o controle de transfecção pTM1-FLuc, indicando que o possível efeito negativo da proteína N se dê sobre a atividade catalítica das enzimas FLuc e RLuc. De modo análogo, a tentativa de obtenção de atividade de mini-replicon em células C6/36-T7 para os genes-repórter RLuc e hRLuc não foi bem sucedida. Interessantemente, nas células C6/36-T7 aparentemente é a proteína L e não a proteína N quem exerce o efeito negativo sobre a expressão de luminescência (Figs., 57 e 58). A expressão da proteína L de TSWV também está correlacionada a observação de efeitos citopáticos nos tratamentos 5plm e 3plm do ensaio de resgate de infecção de TSWV em células C6/36-T7.

O passo sucessivo natural a obtenção de um sistema de mini-replicon funcional para um vírus é a obtenção de clones infecciosos ou de resgate de infecção (geralmente analisado por ensaios de formação de placas). Neste capítulo, apresento os resultados de ensaios de resgate de infecção para TSWV realizados em células BSR-T7 e C6/36-T7. Embora os ensaios não tenham sido repetidos e os dados obtidos por western blotting e inoculação mecânica de plantas e infecção in vitro de células BHK-21 e C6/36 não sejam muito promissores, foi possível obter resultados importantes e intrigantes: i) o efeito aditivo (*enhancer*) da co-transfecção do segmento M RNA em orientação vc sobre a atividade de mini-replicon de TSWV (tratamento VLP na figura 53A) e de BUNV (Fig. 54); ii) a formação de prováveis sincícios celulares e forte modificação da morfologia celular da linhagem C6/36-T7 nos tratamentos 5plm e 3plm, indicando que um tratamento formado pela co-transfecção apenas dos três segmentos virais em orientação vc foi capaz de gerar proteínas virais e causar CPE (Figs. 60, 61 e 62) e que isto foi associado ao

amarelecimento do meio de cultura L-15; iii) a detecção da proteína N em amostras de sobrenadante do ensaio de resgate de infecção em células BSR-T7 para os tratamentos minusL e 5plm, indicando a presença da proteína N no meio extracelular, o que somente seria possível por meio de associação às glicoproteínas virais, ou por meio de lise celular ou exocitose (Fig. 55); iv) a detecção da proteína NSs, ainda que praticamente no limite de detecção da metodologia de western blotting aplicada e com tamanho levemente superior ao do controle positivo de acordo com o padrão de migração eletroforético (Fig. 56), apenas para o tratamento 3plm do ensaio de resgate de infecção de TSWV em células BSR-T7, indicando que houve replicação e transcrição do segmento S.

Tomados em conjunto, os resultados mencionados acima, embora ainda não conclusivos, apontam para a expressão das proteínas virais por meio da atividade da proteína L e N formando complexos RNP funcionais. Portanto, dentro dos resultados apresentados aqui, foi demonstrada a comprovação de ensaios de prova conceitual para genética-reversa de TSWV por meio da replicação de um mini-genoma com extremidades 5' e 3' UTR do segmento L (molécula *DI-like*), apresento o efeito de retardo na expressão do gene-repórter mGFP4 associado a co-transfecção do segmento S RNA em orientação vg e resultados de atividade biológica de *enhancer* da co-transfecção do segmento M RNA em orientação vc (i.e., a expressão das glicoproteínas virais Gn e Gc) sobre a atividade de mini-replicon de TSWV e BUNV contendo genes-repórter diferentes (mGFP4 e RLuc, respectivamente).

## **Perspectivas do trabalho**

No que tange as tentativas de obtenção de sistema de genética reversa para tospovírus em plantas, a principal continuidade a ser testada é a expressão e purificação da proteína N (ou obtenção da proteína a partir de material vegetal sistemicamente infectado) em estado nativo e sua incubação com os DI-RNAs para transfecção em protoplastos ou inoculação na presença de um vírus *helper*. Outros esforços já estão sendo feitos pelo Dr. Tatsuya Nagata e a Dr<sup>a</sup> Anelise Orílio (ambos



da Universidade de Brasília, Brasil) no intuito de produzir plantas transgênicas de tabaco expressando a proteína T7 RNA polimerase, gerando assim, um modelo biológico que pode ser bombardeado com diversos tipos de plasmídeos na forma de DNA, sem a necessidade de manipulação de RNA *in vitro*. Com isso, pretende-se estimular a realização de ensaios análogos aqueles realizados junto ao grupo de pesquisas do Dr. Richard Elliot com culturas *in vitro* de células de mamíferos e insetos.

Dentro do sistema de genética reversa para TSWV baseado em atividade de mini-replicon em células BSR-T7, foi feito pedido de autorização de uso ao Dr. Conzelmann, principal pesquisador do laboratório que gerou a linhagem celular BSR-T7. Almeja-se o estabelecimento de um sistema de cultura de células e, conseqüentemente, de novos trabalhos com o sistema de mini-replicon de TSWV que possa ser de domínio do laboratório de virologia vegetal comandado pelo Dr. Renato Resende na UnB. Uma vez estabelecido este sistema de infra-estrutura e manipulação, pretende-se repetir o ensaio de atividade de mini-replicon de TSWV em células BSR-T7 que foi bem sucedido (gene-repórter mGFP4) para realização de ensaio de detecção via western e northern blotting do tempo 0 a 72h p.t. visando demonstrar o crescente acúmulo do mRNA e da proteína mGFP4 fomentado pela atividade de mini-replicon. Pretende-se também realizar mutações nos principais domínios de replicação e transcrição do gene codificante da proteína L de TSWV a fim de estudar seus efeitos sobre a atividade de mini-replicon, assim comprovando de forma irrefutável que é a atividade da proteína L a responsável pela atividade do gene-repórter. Pretende-se ainda, no intuito de apresentar não apenas dados qualitativos, mas também quantitativos a respeito da atividade de mini-replicon, quantificar por meio de ELISA ou citometria de fluxo (FACS) a expressão da proteína mGFP4. Para detecção por ELISA existem kits comerciais que já possuem a proteína GFP purificada para montagem de curva padrão de detecção, como por exemplo kit GFP Quantitation da companhia BioVision. Para FACS, o ideal seria adicionar ao conjunto de DNAs cotransfectados para obtenção da atividade de mini-replicon, o vetor de expressão pTM1 contendo o gene de outra proteína fluorescente, como por

exemplo YFP ou CFP, a fim de separar as células transfectadas das não transfectadas e de quantificar dentro do *pool* das células transfectadas quantas expressam mGFP4 e em qual intensidade.

### **Perspectivas de publicação**

Embora tenha-se especulado durante o simpósio internacional de tripos e tospovírus na Califórnia sobre a confecção de um artigo compartilhando as principais estratégias e dificuldades vividas no objetivo de estabelecer um sistema de genética reversa para o gênero *Tospovirus*, nenhum pesquisador tomou a frente para contactar e reunir as experiências negativas de todos. No entanto, permanece em aberto que se possa publicar as estratégias testadas e os caminhos “a não serem seguidos” no estabelecimento de um sistema de genética reversa para tospovírus em revistas como *Journal of Virological Methods* (Elsevier), de índice de impacto 1,71.

Sabe-se que resultados positivos para sistemas de genética reversa para tospovírus por meio de atividade de mini-replicon podem ser publicados nas principais revistas de referência do campo da virologia (*Journal of Virology*, JVI – ASM; *Journal of General Virology*, JGV – SGM), como ocorrido para o sistema de genética reversa para SYNV. Para tanto, faltam apenas dados quantitativos a respeito do funcionamento do mini-replicon de TSWV. Estes dados quantitativos são de caráter imperativo para publicação, pois a análise destes se dá sobre toda a população de células de cada poço transfectado, não se tratando apenas da representação de uma parte da população visualizada em um campo a partir de microfotografias (Dra. van Knippenberg e Dr. Brennan, comunicação pessoal).

A obtenção de um sistema de expressão de clone infeccioso para tospovírus, no entanto, geraria precedente para publicação em revistas de relevância ainda maior como *Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS USA, HighWire Press) de modo análogo ao realizado por Bridgen & Elliott na publicação do clone

infeccioso de *Bunyamwera virus* (1996), ou o periódico PLoS Pathogens no qual o clone infeccioso de SYNV foi recentemente publicado (Wang et al., 2015).

## 9. Bibliografia

- ACRANI, G. O., TILSTON-LUNEL, N. L., SPIEGEL, M., WEIDMANN, M., DILCHER, M., ANDRADE DA SILVA, D. E., NUNES, M. R. & ELLIOTT, R. M. 2015. Establishment of a minigenome system for Oropouche virus reveals the S genome segment to be significantly longer than reported previously. *J Gen Virol*, 96, 513-23.
- ADKINS, S., QUADT, R., CHOI, T. J., AHLQUIST, P. & GERMAN, T. 1995. An RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions of tomato spotted wilt virus, a plant- and insect-infecting bunyavirus. *Virology*, 207, 308-11.
- ALBARIÑO, C. G., PRICE, B. D., ECKERLE, L. D. & BALL, L. A. 2001. Characterization and template properties of RNA dimers generated during Flock house virus RNA replication. *Virology*, 289, 269-82.
- ALTENBACH, S. B. & HOWELL, S. H. 1981. Identification of a satellite RNA associated with turnip crinkle virus. *Virology*, 112, 25-33.
- AOKI, S. & TAKEBE, I. 1969. Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *Virology*, 39, 439-48.
- ARNHEITER, H., DAVIS, N. L., WERTZ, G., SCHUBERT, M. & LAZZARINI, R. A. 1985. Role of the nucleocapsid protein in regulating vesicular stomatitis virus RNA synthesis. *Cell*, 41, 259-67.
- AXTELL, M. J. 2013. ShortStack: comprehensive annotation and quantification of small RNA genes. *RNA*, 19, 740-51.
- BADILLO-VARGAS, I. E., ROTENBERG, D., HIROMASA, Y., TOMICH, J. M. & WHITFIELD, A. E. 2011. Analysis of the *Frankliniella occidentalis* proteome and differentially expressed proteins in response to Tomato spotted wilt virus infection. *Phytopathology*, 101, S12-S12.
- BADILLO-VARGAS, I. E., ROTENBERG, D., SCHNEWEIS, D. J., HIROMASA, Y., TOMICH, J. M. & WHITFIELD, A. E. 2012. Proteomic analysis of *Frankliniella occidentalis* and differentially expressed proteins in response to tomato spotted wilt virus infection. *J Virol*, 86, 8793-809.
- BAG, S., SCHWARTZ, H. F., CRAMER, C. S., HAVEY, M. J. & PAPPU, H. R. 2015. Iris yellow spot virus (Tospovirus: Bunyaviridae): from obscurity to research priority. *Mol Plant Pathol*, 16, 224-37.
- BALLINGER, M. J., BRUENN, J. A., HAY, J., CZECHOWSKI, D. & TAYLOR, D. J. 2014. Discovery and evolution of bunyavirids in arctic phantom midges and ancient bunyavirid-like sequences in insect genomes. *J Virol*, 88, 8783-94.
- BALTIMORE, D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*, 35, 235-41.
- BERTRAN, A. G. M., OLIVEIRA, A. S., NAGATA, T. & RESENDE, R. O. 2011. Molecular characterization of the RNA-dependent RNA polymerase from groundnut ringspot virus (genus Tospovirus, family Bunyaviridae). *Arch Virol*, 156, 1425-1429.
- BHUSHAN, L., ABRAHAM, A., CHOUDHURY, N. R., RANA, V. S., MUKHERJEE, S. K. & SAVITHRI, H. S. 2015. Demonstration of helicase activity in the nonstructural

- protein, NSs, of the negative-sense RNA virus, groundnut bud necrosis virus. *Arch Virol*, 160, 959-67.
- BILLECOCQ, A., VIALAT, P. & BOULOY, M. 1996. Persistent infection of mammalian cells by Rift Valley fever virus. *J Gen Virol*, 77 ( Pt 12), 3053-62.
- BOITEUX, L. S. & DE AVILA, A. C. 1994. Inheritance of a resistance specific to Tomato spotted wilt tospovirus in Capsicum-chinense PI-159236. *Euphytica*, 75, 139-142.
- BOLGER, A. M., LOHSE, M. & USADEL, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114-20.
- BORGES, F. & MARTIENSSEN, R. A. 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 727-41.
- BOULOY, M. & FLICK, R. 2009. Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. *Antiviral Res*, 84, 101-18.
- BRENNAN, B., LI, P., ZHANG, S., LI, A., LIANG, M., LI, D. & ELLIOTT, R. M. 2015. Reverse genetics system for severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J Virol*, 89, 3026-37.
- BRENNAN, B., WELCH, S. R., MCLEES, A. & ELLIOTT, R. M. 2011. Creation of a Recombinant Rift Valley Fever Virus with a Two-Segmented Genome. *J Virol*, 85, 10310-10318.
- BRIDGEN, A. 2012. *Reverse genetics of RNA viruses applications and perspectives*, Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ, Wiley - Blackwell.
- BRIDGEN, A. & ELLIOTT, R. M. 1996. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 15400-15404.
- BROWN, K. S., EBIHARA, H. & FELDMANN, H. 2012. Development of a minigenome system for Andes virus, a New World hantavirus. *Arch Virol*, 157, 2227-33.
- BUCHHOLZ, U. J., FINKE, S. & CONZELMANN, K. K. 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol*, 73, 251-9.
- CARPENTER, C. D., CASCONI, P. J. & SIMON, A. E. 1991. Formation of multimers of linear satellite RNAs. *Virology*, 183, 586-94.
- CASCONI, P. J., CARPENTER, C. D., LI, X. H. & SIMON, A. E. 1990. Recombination between satellite RNAs of Turnip crinkle virus. *EMBO J*, 9, 1709-15.
- CHAPMAN, E. J., HILSON, P. & GERMAN, T. L. 2003. Association of L protein and in vitro tomato spotted wilt virus RNA-Dependent RNA polymerase activity. *Intervirology*, 46, 177-181.
- CHELLAPPAN, P., VANITHARANI, R., OGBE, F. & FAUQUET, C. M. 2005. Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants. *Plant Physiol*, 138, 1828-41.
- CHU, F. H., CHAO, C. H., PENG, Y. C., LIN, S. S., CHEN, C. C. & YEH, S. D. 2001. Serological and molecular characterization of Peanut chlorotic fan-spot virus, a new species of the genus Tospovirus. *Phytopathology*, 91, 856-863.

- CIUFFO, M., MAUTINO, G. C., BOSCO, L., TURINA, M. & TAVELLA, L. 2010. Identification of Dictyothrips betae as the vector of Polygonum ring spot virus. *Ann Appl Biol*, 157, 299-307.
- CIUFFO, M., TAVELLA, L., PACIFICO, D., MASENGA, V. & TURINA, M. 2008. A member of a new Tospovirus species isolated in Italy from wild buckwheat (*Polygonum convolvulus*). *Arch Virol*, 153, 2059-2068.
- CORTES, I., LIVIERATOS, I. C., DERKS, A., PETERS, D. & KORMELINK, R. 1998. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. *Phytopathology*, 88, 1276-1282.
- DE AVILA, A. C., DE HAAN, P., KORMELINK, R., RESENDE, R. E. O., GOLDBACH, R. W. & PETERS, D. 1993a. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J Gen Virol*, 74 ( Pt 2), 153-9.
- DE AVILA, A. C., DE HAAN, P., SMEETS, M. L., RESENDE RDE, O., KORMELINK, R., KITAJIMA, E. W., GOLDBACH, R. W. & PETERS, D. 1993b. Distinct levels of relationships between tospovirus isolates. *Arch Virol*, 128, 211-27.
- DE HAAN, P., KORMELINK, R., DE OLIVEIRA RESENDE, R., VAN POELWIJK, F., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J Gen Virol*, 72 ( Pt 9), 2207-16.
- DE HAAN, P., WAGEMAKERS, L., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1989. Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNAs of tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol*, 70 ( Pt 12), 3469-73.
- DE HAAN, P., WAGEMAKERS, L., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1990. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J Gen Virol*, 71 ( Pt 5), 1001-7.
- DE OLIVEIRA, A. S., MACHADO BERTRAN, A. G., INOUE-NAGATA, A. K., NAGATA, T., KITAJIMA, E. W. & RESENDE, R. O. 2011. An RNA-dependent RNA polymerase gene of a distinct Brazilian tospovirus. *Virus Genes*, 43, 385-389.
- DE OLIVEIRA, A. S., MELO, F. L., INOUE-NAGATA, A. K., NAGATA, T., KITAJIMA, E. W. & RESENDE, R. O. 2012. Characterization of bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the Genus Tospovirus. *PLoS One*, 7, e38634.
- DE RONDE, D., BUTTERBACH, P., LOHUIS, D., HEDIL, M., VAN LENT, J. W. & KORMELINK, R. 2013. Tsw gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the Tomato spotted wilt virus. *Mol Plant Pathol*, 14, 405-15.
- DIETZGEN, R. G., MARTIN, K. M., ANDERSON, G. & GOODIN, M. M. 2012. In planta localization and interactions of impatiens necrotic spot tospovirus proteins. *J Gen Virol*, 93, 2490-5.
- DONG, J. H., YIN, Y. Y., FANG, Q., MCBEATH, J. H. & ZHANG, Z. K. 2013. A new tospovirus causing chlorotic ringspot on *Hippeastrum* sp. in China. *Virus Genes*, 46, 567-70.
- DUIJSINGS, D. 2001. *Transcription Initiation of Tomato spotted wilt virus*. PhD, Wageningen University, WUR
- ELLIOTT, R. M., BLAKQORI, G., VAN KNIPPENBERG, I. C., KOUDRIAKOVA, E., LI, P., MCLEES, A., SHI, X. & SZEMIEL, A. M. 2013. Establishment of a reverse

- genetics system for Schmallenberg virus, a newly emerged orthobunyavirus in Europe. *J Gen Virol*, 94, 851-9.
- FACEY, P. D., MERIC, G., HITCHINGS, M. D., PACHEBAT, J. A., HEGARTY, M. J., CHEN, X., MORGAN, L., HOEPFNER, J. E., WHITTEN, M., KIRK, W., DYSON, P. J., SHEPPARD, S. K. & DEL SOL, R. 2015. Draft genomes, phylogenetic reconstruction and comparative genomics of two novel cohabiting bacterial symbionts isolated from *Frankliniella occidentalis*. *Genome Biol Evol*.
- FENG, Z., CHEN, X., BAO, Y., DONG, J., ZHANG, Z. & TAO, X. 2013. Nucleocapsid of Tomato spotted wilt tospovirus forms mobile particles that traffic on an actin/endoplasmic reticulum network driven by myosin XI-K. *New Phytol*, 200, 1212-24.
- FENG, Z., XUE, F., XU, M., CHEN, X., ZHAO, W., GARCIA-MURRIA, M. J., MINGARRO, I., LIU, Y., HUANG, Y., JIANG, L., ZHU, M. & TAO, X. 2016. The ER-Membrane Transport System Is Critical for Intercellular Trafficking of the NSm Movement Protein and Tomato Spotted Wilt Tospovirus. *PLoS Pathog*, 12, e1005443.
- FERNANDEZ-POZO, N., MENDA, N., EDWARDS, J. D., SAHA, S., TECLE, I. Y., STRICKLER, S. R., BOMBARELY, A., FISHER-YORK, T., PUJAR, A., FOERSTER, H., YAN, A. & MUELLER, L. A. 2015. The Sol Genomics Network (SGN)--from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Res*, 43, D1036-41.
- FINNEN, R. L. & ROCHON, D. M. 1993. Sequence and Structure of Defective Interfering RNAs Associated with Cucumber necrosis virus-Infections. *J Gen Virol*, 74, 1715-1720.
- FLICK, R., FLICK, K., FELDMANN, H. & ELGH, F. 2003. Reverse genetics for crimean-congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*, 77, 5997-6006.
- FLICK, R. & PETTERSSON, R. F. 2001. Reverse genetics system for Uukuniemi virus (Bunyaviridae): RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs. *J Virol*, 75, 1643-55.
- FLORES, R., GRUBB, D., ELLEUCH, A., NOHALES, M. A., DELGADO, S. & GAGO, S. 2011. Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: variations on a theme. *RNA Biol*, 8, 200-6.
- GANESAN, U., BRAGG, J. N., DENG, M., MARR, S., LEE, M. Y., QIAN, S., SHI, M., KAPPEL, J., PETERS, C., LEE, Y., GOODIN, M. M., DIETZGEN, R. G., LI, Z. & JACKSON, A. O. 2013. Construction of a *Sonchus* Yellow Net Virus minireplicon: a step toward reverse genetic analysis of plant negative-strand RNA viruses. *J Virol*, 87, 10598-611.
- GEERTS-DIMITRIADOU, C., LU, Y. Y., GEERTSEMA, C., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. 2012. Analysis of the Tomato spotted wilt virus ambisense S RNA-encoded hairpin structure in translation. *PLoS One*, 7, e31013.
- GIORGI, C., ACCARDI, L., NICOLETTI, L., GRO, M. C., TAKEHARA, K., HILDITCH, C., MORIKAWA, S. & BISHOP, D. H. 1991. Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virology*, 180, 738-53.
- GODDARD, J. 2008. *Infectious diseases and arthropods*, Totowa, N.J., Humana Press.

- GOODIN, M. M., ZAITLIN, D., NAIDU, R. A. & LOMMEL, S. A. 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact*, 21, 1015-26.
- GRABHERR, M. G., HAAS, B. J., YASSOUR, M., LEVIN, J. Z., THOMPSON, D. A., AMIT, I., ADICONIS, X., FAN, L., RAYCHOWDHURY, R., ZENG, Q., CHEN, Z., MAUCELLI, E., HACOEN, N., GNIRKE, A., RHIND, N., DI PALMA, F., BIRREN, B. W., NUSBAUM, C., LINDBLAD-TOH, K., FRIEDMAN, N. & REGEV, A. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, 29, 644-52.
- GROVES, C., GERMAN, T., DASGUPTA, R., MUELLER, D. & SMITH, D. L. 2016. Seed Transmission of Soybean vein necrosis virus: The First Tospovirus Implicated in Seed Transmission. *PLoS One*, 11, e0147342.
- HAGEN, C., FRIZZI, A., KAO, J., JIA, L., HUANG, M., ZHANG, Y. & HUANG, S. 2011. Using small RNA sequences to diagnose, sequence, and investigate the infectivity characteristics of vegetable-infecting viruses. *Arch Virol*, 156, 1209-1216.
- HALLWASS, M., DE OLIVEIRA, A. S., DE CAMPOS DIANESE, E., LOHUIS, D., BOITEUX, L. S., INOUE-NAGATA, A. K., RESENDE, R. O. & KORMELINK, R. 2014. The Tomato spotted wilt virus cell-to-cell movement protein (NSM ) triggers a hypersensitive response in Sw-5-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional Sw-5b resistance gene copy. *Mol Plant Pathol*, 15, 871-80.
- HASSANI-MEHRABAN, A., SAAIJER, J., PETERS, D., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. 2007. Molecular and biological comparison of two Tomato yellow ring virus (TYRV) isolates: challenging the Tospovirus species concept. *Arch Virol*, 152, 85-96.
- HEWLETT, M. J., PETTERSSON, R. F. & BALTIMORE, D. 1977. Circular forms of Uukuniemi virion RNA: an electron microscopic study. *J Virol*, 21, 1085-93.
- HILLMAN, B. I., FOGLIA, R. & YUAN, W. 2000. Satellite and defective RNAs of *Cryphonectria hypovirus 3-grand haven 2*, a virus species in the family Hypoviridae with a single open reading frame. *Virology*, 276, 181-9.
- HOUCK, M. A., QIN, H. & ROBERTS, H. R. 2001. Hantavirus transmission: potential role of ectoparasites. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 1, 75-9.
- ICTV. 2015. *ICTV Virus Taxonomy 2014* [Online]. Available: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> [Accessed 08/12/2015 2015].
- INOUE-NAGATA, A. K., KORMELINK, R., NAGATA, T., KITAJIMA, E. W., GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1997. Effects of Temperature and Host on the Generation of Tomato spotted wilt virus Defective Interfering RNAs. *Phytopathology*, 87, 1168-73.
- INOUE-NAGATA, A. K., KORMELINK, R., SGRO, J. Y., NAGATA, T., KITAJIMA, E. W., GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1998. Molecular characterization of Tomato spotted wilt virus defective interfering RNAs and detection of truncated L proteins. *Virology*, 248, 342-356.
- JAAG, H. M. & NAGY, P. D. 2010. The combined effect of environmental and host factors on the emergence of viral RNA recombinants. *PLoS Pathog*, 6, e1001156.



- JACOBSON, A. L., JOHNSTON, J. S., ROTENBERG, D., WHITFIELD, A. E., BOOTH, W., VARGO, E. L. & KENNEDY, G. G. 2013. Genome size and ploidy of Thysanoptera. *Insect Mol Biol*, 22, 12-7.
- JANDA, M., FRENCH, R. & AHLQUIST, P. 1987. High efficiency T7 polymerase synthesis of infectious RNA from cloned brome mosaic virus cDNA and effects of 5' extensions on transcript infectivity. *Virology*, 158, 259-62.
- JANG, S. K. & WIMMER, E. 1990. Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Dev*, 4, 1560-72.
- JOHNSON, M., ZARETSKAYA, I., RAYTSELIS, Y., MEREZHUK, Y., MCGINNIS, S. & MADDEN, T. L. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res*, 36, W5-9.
- JUNGLIN, S., KURTH, A., KUEHL, H., QUAN, P. L., ELLERBROK, H., PAULI, G., NITSCHKE, A., NUNN, C., RICH, S. M., LIPKIN, W. I., BRIESE, T. & LEENDERTZ, F. H. 2009. Examining landscape factors influencing relative distribution of mosquito genera and frequency of virus infection. *Ecohealth*, 6, 239-49.
- KIEFER, M. C., DAUBERT, S. D., SCHNEIDER, I. R. & BRUENING, G. 1982. Multimeric forms of satellite of tobacco ringspot virus RNA. *Virology*, 121, 262-73.
- KIKKERT, M., VAN LENT, J., STORMS, M., BODEGOM, P., KORMELINK, R. & GOLDBACH, R. 1999. Tomato spotted wilt virus particle morphogenesis in plant cells. *J Virol*, 73, 2288-2297.
- KIKKERT, M., VAN POELWIJK, F., STORMS, M., KASSIES, W., BLOKSMA, H., VAN LENT, J., KORMELINK, R. & GOLDBACH, R. 1997. A protoplast system for studying tomato spotted wilt virus infection. *J Gen Virol*, 78 ( Pt 7), 1755-63.
- KITAJIMA, E. W. 1965. Electron Microscopy of Vira-Cabeca Virus (Brazilian Tomato Spotted Wilt Virus) within the Host Cell. *Virology*, 26, 89-99.
- KOHL, A., HART, T. J., NOONAN, C., ROYALL, E., ROBERTS, L. O. & ELLIOTT, R. M. 2004. A Bunyamwera virus minireplicon system in mosquito cells. *J Virol*, 78, 5679-5685.
- KOMODA, K., ISHIBASHI, K., KAWAMURA-NAGAYA, K. & ISHIKAWA, M. 2014. Possible involvement of eEF1A in Tomato spotted wilt virus RNA synthesis. *Virology*, 468-470, 81-7.
- KOMODA, K., NARITA, M., TANAKA, I. & YAO, M. 2013. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of the nucleocapsid protein of tomato spotted wilt virus. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 69, 700-3.
- KORMELINK, R., DE HAAN, P., MEURS, C., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1992a. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *J Gen Virol*, 73 ( Pt 11), 2795-804.
- KORMELINK, R., DE HAAN, P., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1992b. Viral RNA synthesis in tomato spotted wilt virus-infected *Nicotiana rustica* plants. *J Gen Virol*, 73 ( Pt 3), 687-93.
- KORMELINK, R., KITAJIMA, E. W., DE HAAN, P., ZUIDEMA, D., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1991. 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*, 181, 459-68.
- KORMELINK, R., STORMS, M., VAN LENT, J., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1994. Expression and subcellular location of the NSM protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology*, 200, 56-65.
- KORMELINK, R., VAN POELWIJK, F., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1992c. Non-viral heterogeneous sequences at the 5' ends of tomato spotted wilt virus mRNAs. *J Gen Virol*, 73 ( Pt 8), 2125-8.
- KUTNJAK, D., RUPAR, M., GUTIERREZ-AGUIRRE, I., CURK, T., KREUZE, J. F. & RAVNIKAR, M. 2015. Deep sequencing of virus-derived small interfering RNAs and RNA from viral particles shows highly similar mutational landscapes of a plant virus population. *J Virol*, 89, 4760-9.
- LANGMEAD, B. & SALZBERG, S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, 9, 357-9.
- LAW, M. D. & MORRIS, T. J. 1994. De-Novo Generation and Accumulation of Tomato bushy stunt virus Defective Interfering RNAs Without Serial Host Passage. *Virology*, 198, 377-380.
- LEASTRO, M. O., PALLAS, V., RESENDE, R. O. & SANCHEZ-NAVARRO, J. A. 2015. The movement proteins (NSm) of distinct tospoviruses peripherally associate with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins. *Virology*, 478, 39-49.
- LEE, H. S., SIMON, J. A. & LIS, J. T. 1988. Structure and expression of ubiquitin genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, 8, 4727-35.
- LI, C. X., SHI, M., TIAN, J. H., LIN, X. D., KANG, Y. J., CHEN, L. J., QIN, X. C., XU, J., HOLMES, E. C. & ZHANG, Y. Z. 2015a. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife*, 4.
- LI, J., FENG, Z., WU, J., HUANG, Y., LU, G., ZHU, M., WANG, B., MAO, X. & TAO, X. 2015b. Structure and function analysis of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt virus interacting with RNA using homology modeling. *J Biol Chem*, 290, 3950-61.
- LIAN, S., LEE, J. S., CHO, W. K., YU, J., KIM, M. K., CHOI, H. S. & KIM, K. H. 2013. Phylogenetic and recombination analysis of tomato spotted wilt virus. *PLoS One*, 8, e63380.
- LINTHORST, H. J. & KAPER, J. M. 1984. Replication of Peanut stunt virus and its associated RNA 5 in cowpea protoplasts. *Virology*, 139, 317-29.
- LOKESH, B., RASHMI, P. R., AMRUTA, B. S., SRISATHIYANARAYANAN, D., MURTHY, M. R. N. & SAVITHRI, H. S. 2010. NSs Encoded by Groundnut Bud Necrosis Virus Is a Bifunctional Enzyme. *Plos One*, 5.
- LOTT, W. B. & DORAN, M. R. 2013. Do RNA viruses require genome cyclisation for replication? *Trends Biochem Sci*, 38, 350-5.
- LOVATO, F. A., INOUE-NAGATA, A. K., NAGATA, T., DE AVILA, A. C., PEREIRA, L. A. & RESENDE, R. O. 2008. The N protein of Tomato spotted wilt virus (TSWV) is associated with the induction of programmed cell death (PCD) in *Capsicum chinense* plants, a hypersensitive host to TSWV infection. *Virus Res*, 137, 245-52.

- LOVATO, F. A., NAGATA, T., AVILA, A. C., RESENDE, R. O. & INOUE-NAGATA, A. K. 2007. The N protein of Tomato spotted wilt virus: the putative elicitor of a hypersensitive response (HR) in *Capsicum chinense*. *J Insect Sci*, 7.
- MARCHI, A., NICOLETTI, L., ACCARDI, L., DI BONITO, P. & GIORGI, C. 1998. Characterization of Toscana virus defective interfering particles generated in vivo. *Virology*, 246, 125-133.
- MARGARIA, P., BOSCO, L., VALLINO, M., CIUFFO, M., MAUTINO, G. C., TAVELLA, L. & TURINA, M. 2014a. The NSs protein of Tomato spotted wilt virus is required for persistent infection and transmission by *Frankliniella occidentalis*. *J Virol*, 88, 5788-802.
- MARGARIA, P., CIUFFO, M., PACIFICO, D. & TURINA, M. 2007. Evidence that the nonstructural protein of Tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the Tsw gene. *Mol Plant Microbe Interact*, 20, 547-558.
- MARGARIA, P., CIUFFO, M., ROSA, C. & TURINA, M. 2015. Evidence of a tomato spotted wilt virus resistance-breaking strain originated through natural reassortment between two evolutionary-distinct isolates. *Virus Res*, 196, 157-61.
- MARGARIA, P., MIOZZI, L., CIUFFO, M., PAPPU, H. & TURINA, M. 2014b. The complete genome sequence of Polygonum ringspot virus. *Arch Virol*, 159, 3149-52.
- MARGARIA, P., MIOZZI, L., CIUFFO, M., ROSA, C., AXTELL, M. J., PAPPU, H. R. & TURINA, M. 2016. Comparison of small RNA profiles in *Nicotiana benthamiana* and *Solanum lycopersicum* infected by Polygonum ringspot tospovirus reveals host-specific responses to viral infection. *Virus Res*, 211, 38-45.
- MARGARIA, P. & TURINA, M. 2007. Molecular characterization of resistance-breaking strains of Tomato spotted wilt virus (Tospovirus, Bunyaviridae) infecting resistant pepper carrying the Tsw gene. *J Insect Sci*, 7.
- MARIS, P. C., JOOSTEN, N. N., GOLDBACH, R. W. & PETERS, D. 2004. Tomato spotted wilt virus infection improves host suitability for its vector *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology*, 94, 706-711.
- MARKLEWITZ, M., HANDRICK, S., GRASSE, W., KURTH, A., LUKASHEV, A., DROSTEN, C., ELLERBROK, H., LEENDERTZ, F. H., PAULI, G. & JUNGLEN, S. 2011. Gouleako virus isolated from West African mosquitoes constitutes a proposed novel genus in the family Bunyaviridae. *J Virol*, 85, 9227-34.
- MARKLEWITZ, M., ZIRKEL, F., KURTH, A., DROSTEN, C. & JUNGLEN, S. 2015. Evolutionary and phenotypic analysis of live virus isolates suggests arthropod origin of a pathogenic RNA virus family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 7536-41.
- MARKLEWITZ, M., ZIRKEL, F., RWEGO, I. B., HEIDEMANN, H., TRIPPNER, P., KURTH, A., KALLIES, R., BRIESE, T., LIPKIN, W. I., DROSTEN, C., GILLESPIE, T. R. & JUNGLEN, S. 2013. Discovery of a unique novel clade of mosquito-associated bunyaviruses. *J Virol*, 87, 12850-65.
- MARRIOTT, A. C. & DIMMOCK, N. J. 2010. Defective interfering viruses and their potential as antiviral agents. *Reviews in Medical Virology*, 20, 51-62.

- MCLAIN, L., ARMSTRONG, S. J. & DIMMOCK, N. J. 1988. One Defective Interfering Particle Per Cell Prevents Influenza Virus-Mediated Cyto-Pathology - An Efficient Assay System. *J Gen Virol*, 69, 1415-1419.
- MELCHER, U. 2000. The '30K' superfamily of viral movement proteins. *J Gen Virol*, 81, 257-66.
- MILNE, R. G. 1970. An electron microscope study of Tomato spotted wilt virus in sections of infected cells and in negative stain preparations. *J Gen Virol*, 6, 267-&.
- MILNE, R. G. & FRANCKI, R. I. B. 1984. Should Tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family Bunyaviridae. *Intervirology*, 22, 72-76.
- MORITZ, G., KUMM, S. & MOUND, L. 2004. Tospovirus transmission depends on thrips ontogeny. *Virus Research*, 100, 143-149.
- MOUND, L. A. 2005. Thysanoptera: diversity and interactions. *Annu Rev Entomol*, 50, 247-69.
- NAGATA, T., INOUE-NAGATA, A. K., PRINS, M., GOLDBACH, R. & PETERS, D. 2000. Impeded thrips transmission of defective Tomato spotted wilt virus isolates. *Phytopathology*, 90, 454-459.
- NAGATA, T., INOUE-NAGATA, A. K., SMID, H. M., GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1999. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt tospovirus. *Journal of General Virology*, 80, 507-515.
- NAGATA, T., STORMS, M. M., GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1997. Multiplication of tomato spotted wilt virus in primary cell cultures derived from two thrips species. *Virus Res*, 49, 59-66.
- NGUYEN, M. & HAENNI, A. L. 2003. Expression strategies of ambisense viruses. *Virus Res*, 93, 141-50.
- NICHOT, S., BEATY, B., ELLIOTT, R., GOLDBACH, R., PLYUSNIN, A., SCHMALJOHN, C. & TESH, R. 2005. Bunyaviridae. In: FAUQUET, C., MAYO, M., MANILOFF, J., DESSELBERGUER, U. & BALL, L. (eds.) *Virus Taxonomy: VIII<sup>th</sup> Report of the ICTV*. San Diego: Elsevier/Academic Press.
- PAPPU, H., JONES, R. & JAIN, R. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, 219-236.
- PATEL, A. H. & ELLIOTT, R. M. 1992. Characterization of Bunyamwera virus Defective Interfering Particles. *J Gen Virol*, 73, 389-396.
- PATHAK, K. B. & NAGY, P. D. 2009. Defective Interfering RNAs: Foes of Viruses and Friends of Virologists. *Viruses*, 1, 895-919.
- PEIRO, A., CANIZARES, M. C., RUBIO, L., LOPEZ, C., MORIONES, E., ARAMBURU, J. & SANCHEZ-NAVARRO, J. 2014. The movement protein (NSm) of Tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the tomato Sw-5 gene-based resistance. *Mol Plant Pathol*, 15, 802-13.
- PLYUSNIN, A., BEATY, B. J., ELLIOTT, R. M., GOLDBACH, R., KORMELINK, R., LUNDKVIST, Å., SCHMALJOHN, C. S. & TESH, R. B. 2011. Bunyaviridae. In: KING, A. M. Q., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B. & LEFKOWITZ, E. J. (eds.) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses - ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier.

- POLISCHUK, V., BUDZANIVSKA, I., SHEVCHENKO, T. & OLIYNIK, S. 2007. Evidence for plant viruses in the region of Argentina Islands, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*, 59, 409-17.
- PRASCH, C. M. & SONNEWALD, U. 2013. Simultaneous application of heat, drought, and virus to Arabidopsis plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiol*, 162, 1849-66.
- QANUNGO, K. R., SHAJI, D., MATHUR, M. & BANERJEE, A. K. 2004. Two RNA polymerase complexes from vesicular stomatitis virus-infected cells that carry out transcription and replication of genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 5952-7.
- QIU, W. P., GESKE, S. M., HICKEY, C. M. & MOYER, J. W. 1998. Tomato spotted wilt Tosspovirus genome reassortment and genome segment-specific adaptation. *Virology*, 244, 186-194.
- REGUERA, J., CUSACK, S. & KOLAKOFSKY, D. 2014. Segmented negative strand RNA virus nucleoprotein structure. *Curr Opin Virol*, 5, 7-15.
- REGUERA, J., WEBER, F. & CUSACK, S. 2010. Bunyaviridae RNA Polymerases (L-Protein) Have an N-Terminal, Influenza-Like Endonuclease Domain, Essential for Viral Cap-Dependent Transcription. *PLoS Pathog*, -.
- RESENDE, R. O., DE HAAN, P., DE AVILA, A. C., KITAJIMA, E. W., KORMELINK, R., GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1991. Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of Tomato spotted wilt virus by mechanical passage. *J Gen Virol*, 72 ( Pt 10), 2375-83.
- RESENDE, R. O., DE HAAN, P., VAN DE VOSSEN, E., DE AVILA, A. C., GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1992. Defective interfering L RNA segments of Tomato spotted wilt virus retain both virus genome termini and have extensive internal deletions. *J Gen Virol*, 73 ( Pt 10), 2509-16.
- RIBEIRO, D., BORST, J. W., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. 2009a. Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. *Virology*, 383, 121-130.
- RIBEIRO, D., FORESTI, O., DENECKE, J., WELLINK, J., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. J. 2008. Tomato spotted wilt virus glycoproteins induce the formation of endoplasmic reticulum- and Golgi-derived pleomorphic membrane structures in plant cells. *J Gen Virol*, 89, 1811-8.
- RIBEIRO, D., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. 2009b. Requirements for ER-Arrest and Sequential Exit to the Golgi of Tomato Spotted Wilt Virus Glycoproteins. *Traffic*, 10, 664-672.
- RIBEIRO, D., JUNG, M., MOLING, S., BORST, J. W., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. 2013. The cytosolic nucleoprotein of the plant-infecting bunyavirus tomato spotted wilt recruits endoplasmic reticulum-resident proteins to endoplasmic reticulum export sites. *Plant Cell*, 25, 3602-14.
- RILEY, D. G. J., S. V.; SRINIVASAN, R.; DIFFIE, S. 2011. Thrips Vectors of Tosspoviruses. *J Integr Pest Manag*, 1, 1-10.
- ROBINSON, J. T., THORVALDSDOTTIR, H., WINCKLER, W., GUTTMAN, M., LANDER, E. S., GETZ, G. & MESIROV, J. P. 2011. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*, 29, 24-6.

- ROSSI, M., VALLINO, M., ABBA, S., CIUFFO, M., BALESTRINI, R., GENRE, A. & TURINA, M. 2015. The Importance of the KR-Rich Region of the Coat Protein of Ourmia melon virus for Host Specificity, Tissue Tropism, and Interference With Antiviral Defense. *Mol Plant Microbe Interact*, 28, 30-41.
- ROUTH, A. & JOHNSON, J. E. 2014. Discovery of functional genomic motifs in viruses with ViReMa-a Virus Recombination Mapper-for analysis of next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 42, e11.
- ROUTH, A., ORDOUKHANIAN, P. & JOHNSON, J. E. 2012. Nucleotide-resolution profiling of RNA recombination in the encapsidated genome of a eukaryotic RNA virus by next-generation sequencing. *J Mol Biol*, 424, 257-69.
- RYBICKI, E. P. 2015. A Top Ten list for economically important plant viruses. *Arch Virol*, 160, 17-20.
- SAMBROOK, J. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell*, Cold Spring Harbor, N.Y. :, Cold Spring Harbor Laboratory.
- SATYANARAYANA, T., REDDY, K. L., RATNA, A. S., DEOM, C. M., GOWDA, S. & REDDY, D. V. R. 1996. Peanut yellow spot virus: A distinct tospovirus species based on serology and nucleic acid hybridisation. *Ann Appl Biol*, 129, 237-245.
- SCALLAN, M. F. & ELLIOTT, R. M. 1992. Defective RNAs in mosquito cells persistently infected with Bunyamwera virus. *J Gen Virol*, 73 ( Pt 1), 53-60.
- SCHNETTLER, E., HEMMES, H., HUISMANN, R., GOLDBACH, R., PRINS, M. & KORMELINK, R. 2010. Diverging Affinity of Tospovirus RNA Silencing Suppressor Proteins, NSs, for Various RNA Duplex Molecules. *J Virol*, 84, 11542-11554.
- SCHOLTHOF, K. B., ADKINS, S., CZOSNEK, H., PALUKAITIS, P., JACQUOT, E., HOHN, T., HOHN, B., SAUNDERS, K., CANDRESSE, T., AHLQUIST, P., HEMENWAY, C. & FOSTER, G. D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 12, 938-54.
- SCHOLTHOF, K. B. G., SCHOLTHOF, H. B. & JACKSON, A. O. 1995. The Effect of Defective Interfering RNAs on the Accumulation of Tomato bushy stunt virus Proteins and Implications for Disease Attenuation. *Virology*, 211, 324-328.
- SIMON, A. E., ENGEL, H., JOHNSON, R. P. & HOWELL, S. H. 1988. Identification of regions affecting virulence, RNA processing and infectivity in the virulent satellite of Turnip crinkle virus. *EMBO J*, 7, 2645-51.
- SIMON, A. E., ROOSSINCK, M. J. & HAVELDA, Z. 2004. Plant virus satellite and defective interfering RNAs: New paradigms for a new century. *Annu Rev Phytopathol*, 42, 415-437.
- SNIPPE, M., BORST, J. W., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. 2007. Tomato spotted wilt virus Gc and N proteins interact in vivo. *Virology*, 357, 115-123.
- STAFFORD, C. A., WALKER, G. P. & ULLMAN, D. E. 2011. Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 9350-9355.
- STAFFORD-BANKS, C. A., ROTENBERG, D., JOHNSON, B. R., WHITFIELD, A. E. & ULLMAN, D. E. 2014. Analysis of the salivary gland transcriptome of *Frankliniella occidentalis*. *PLoS One*, 9, e94447.
- STEINECKE, P., HEINZE, C., OEHMEN, E., ADAM, G. & SCHREIER, P. H. 1998. Early events of Tomato spotted wilt transcription and replication in protoplasts. *Microbiologica*, 21, 263-268.

- STORMS, M. M., KORMELINK, R., PETERS, D., VAN LENT, J. W. & GOLDBACH, R. W. 1995. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology*, 214, 485-93.
- SZITTYA, G., SILHAVY, D., MOLNAR, A., HAVELDA, Z., LOVAS, A., LAKATOS, L., BANFALVI, Z. & BURGYN, J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J*, 22, 633-40.
- SZTUBA-SOLINSKA, J., URBANOWICZ, A., FIGLEROWICZ, M. & BUJARSKI, J. J. 2011. RNA-RNA recombination in plant virus replication and evolution. *Annu Rev Phytopathol*, 49, 415-43.
- TAKEDA, A., SUGIYAMA, K., NAGANO, H., MORI, M., KAIDO, M., MISE, K., TSUDA, S. & OKUNO, T. 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *Febs Letters*, 532, 75-79.
- TENTCHEV, D., VERDIN, E., MARCHAL, C., JACQUET, M., AGUILAR, J. M. & MOURY, B. 2011. Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *J Gen Virol*, 92, 961-973.
- THOMPSON, K. A. S. & YIN, J. 2010. Population dynamics of an RNA virus and its defective interfering particles in passage cultures. *Virology*, 7.
- THORVALDSDOTTIR, H., ROBINSON, J. T. & MESIROV, J. P. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*, 14, 178-92.
- TILSTON-LUNEL, N. L., ACRANI, G. O., RANDALL, R. E. & ELLIOTT, R. M. 2015. Generation of Recombinant Oropouche Viruses Lacking the Nonstructural Protein NSm or NSs. *J Virol*, 90, 2616-27.
- TOMASSOLI, L., TIBERINI, A., MASENGA, V., VICCHI, V. & TURINA, M. 2009. Characterization of Iris yellow spot virus Isolates from Onion Crops in Northern Italy. *J Plant Pathol*, 91, 733-739.
- UHRIG, J. F., SOELLYCK, T. R., MINKE, C. J., PHILIPP, C., KELLMANN, J. W. & SCHREIER, P. H. 1999. Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt tospovirus: Identification and characterization of two interacting domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 55-60.
- VAN KNIPPENBERG, I., FRAGKLOUDIS, R. & ELLIOTT, R. M. 2013. The transient nature of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein expression: effects of increased stability of NSs protein on virus replication. *PLoS One*, 8, e64137.
- VAN KNIPPENBERG, I., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. 2002. Purified Tomato spotted wilt virus particles support both genome replication and transcription in vitro. *Virology*, 303, 278-286.
- VAN KNIPPENBERG, I., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. 2004. In vitro transcription of Tomato spotted wilt virus is independent of translation. *J Gen Virol*, 85, 1335-1338.
- VAN KNIPPENBERG, I., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. 2005a. Tomato spotted wilt virus S-segment mRNAs have overlapping 3'-ends containing a predicted stem-loop structure and conserved sequence motif. *Virus Res*, 110, 125-131.
- VAN KNIPPENBERG, I., LAMINE, M., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. 2005b. Tomato spotted wilt virus transcriptase in vitro displays a preference for cap

- donors with multiple base complementarity to the viral template. *Virology*, 335, 122-130.
- WANG, Q., MA, X., QIAN, S., ZHOU, X., SUN, K., CHEN, X., ZHOU, X., JACKSON, A. O. & LI, Z. 2015. Rescue of a Plant Negative-Strand RNA Virus from Cloned cDNA: Insights into Enveloped Plant Virus Movement and Morphogenesis. *PLoS Pathog*, 11, e1005223.
- WEBSTER, C. G., REITZ, S. R., FRANTZ, G., MELLINGER, H., PERRY, K. L. & ADKINS, S. 2011a. A novel M RNA reassortant of Groundnut ringspot virus and Tomato chlorotic spot virus infecting vegetables in Florida. *Phytopathology*, 101, S189-S189.
- WEBSTER, C. G., REITZ, S. R., PERRY, K. L. & ADKINS, S. 2011b. A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. *Virology*, 413, 216-225.
- WHITFIELD, A. E., ULLMAN, D. E. & GERMAN, T. L. 2005. Tospovirus-thrips interactions. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 459-89.
- XU, Y., LOU, S. G., LI, Q. F., HU, Q., SUN, L. P., LI, Z. Y., LI, Y. Z. & LIU, Y. T. 2014. Molecular characterization of the Hippeastrum chlorotic ringspot virus L segment and its protein. *Arch Virol*, 159, 2805-7.
- XU, Y., LOU, S. G., LI, X. L., ZHENG, Y. X., WANG, W. C. & LIU, Y. T. 2013. The complete S RNA and M RNA nucleotide sequences of a Hippeastrum chlorotic ringspot virus (HCRV) isolate from *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb in China. *Arch Virol*, 158, 2597-601.
- YAN, D., TANG, Y., XUE, X., WANG, M., LIU, F. & FAN, J. 2012. The complete mitochondrial genome sequence of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) contains triplicate putative control regions. *Gene*, 506, 117-24.
- YANG, S. J., CARTER, S. A., COLE, A. B., CHENG, N. H. & NELSON, R. S. 2004. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 6297-302.
- YU, X. J. & TESH, R. B. 2014. The role of mites in the transmission and maintenance of Hantaan virus (Hantavirus: Bunyaviridae). *J Infect Dis*, 210, 1693-9.
- ZHANG, X. & NUSS, D. L. 2008. A host dicer is required for defective viral RNA production and recombinant virus vector RNA instability for a positive sense RNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 16749-54.
- ZHANG, Z., ZHANG, P., LI, W., ZHANG, J., HUANG, F., YANG, J., BEI, Y. & LU, Y. 2013. De novo transcriptome sequencing in *Frankliniella occidentalis* to identify genes involved in plant virus transmission and insecticide resistance. *Genomics*, 101, 296-305.
- ZHOU, J., KANTARTZI, S. K., WEN, R. H., NEWMAN, M., HAJIMORAD, M. R., RUPE, J. C. & TZANETAKIS, I. E. 2011. Molecular characterization of a new tospovirus infecting soybean. *Virus Genes*, 43, 289-295.
- ZHOU, J. & TZANETAKIS, I. E. 2013. Epidemiology of soybean vein necrosis-associated virus. *Phytopathology*, 103, 966-71.



ZHUANG, Y., BUTLER, B., HAWKINS, E., PAGUIO, A., ORR, L., WOOD, M. & WOOD, K.  
2001. New Synthetic Renilla Gene and Assay System Increase Expression,  
Reliability and Sensitivity. *Promega Notes*, 79.