



THAÍS OLIVEIRA RAMALHO

**INTERAÇÃO DO *Coffee ringspot virus* (CoRSV)
COM A CÉLULA HOSPEDEIRA EMPREGANDO
PROTEÍNAS FLUORESCENTES**

LAVRAS - MG

2014

THAIS OLIVEIRA RAMALHO

**INTERAÇÃO DO *Coffee ringspot virus* (CoRSV) COM A CÉLULA
HOSPEDEIRA EMPREGANDO PROTEÍNAS FLUORESCENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Antonia dos Reis Figueira

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Ramalho, Thais Oliveira.

Interação do Coffee ringspot virus (CoRSV) com a célula
hospedeira empregando proteínas fluorescentes / Thais Oliveira
Ramalho. – Lavras : UFLA, 2014.

90 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Antonia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. Dichorhabdovirus. 2. Rhabdovirus. 3. Localização de
proteínas. 4. Bimolecular fluorescence complementation. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.7398

THAIS OLIVEIRA RAMALHO

**INTERAÇÃO DO *Coffee ringspot virus* (CoRSV) COM A CÉLULA
HOSPEDEIRA EMPREGANDO PROTEÍNAS FLUORESCENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 15 de setembro de 2014.

Dr. Michael M. Goodin University of Kentucky

Dra. Elaine Aparecida de Souza UFLA

Dr. Mário Lucio Vilela Resende UFLA

Dr. Ricardo Magela de Souza UFLA

Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

LAVRAS - MG

2014

A Deus,
Pelas bênçãos concedidas

OFEREÇO

*Aos meus pais, Miguel e Icleuza, pelos ensinamentos, paciência, conselhos,
compreensão e amor. Ao Matthew pelo companheirismo. À Clara pela amizade
incondicional e à vó Elvira pelo carinho.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, por todos esses anos de amparo. Ao CNPq e CAPES, pela concessão de bolsas de estudo.

À University of Kentucky (UK) e a todos os membros do Plant Pathology Department pelo carinho e acolhimento no ano de 2013/2014.

À Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira, pela orientação, amizade, compreensão, ensinamentos, paciência e pela confiança.

Ao prof. Dr Michael Goodin, pelo acolhimento, pela oportunidade, pela confiança, amizade e por todo o apoio e motivação.

Aos meus familiares e amigos que de uma forma ou de outra sempre me ajudaram quando foi necessário.

Aos funcionários e professores do DFP/UFLA pela contribuição na construção da base do meu conhecimento. Aos professores Mario Lúcio, Elaine, Ricardo, pela participação na banca e disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Aos amigos do Centro de Indexação de Vírus pela ajuda.

Ao pessoal da Virologia Vegetal, Suellen, Priscila, Dani, Marcelo, Nara, pelo companheirismo.

Ao técnico do laboratório da UK, R Y Wang, por todos os ensinamentos e paciência, e aos colegas de laboratório Chanyong e Gavin pela amizade e ajuda.

Às amigas Ester, Kátia e Juliana, pelo acolhimento e companheirismo.

À Silvia Regina, pela amizade e por toda ajuda nestes anos maravilhosos de convivência.

Chegar até aqui sem vocês seria praticamente impossível.

MUITO OBRIGADA

RESUMO GERAL

O vírus da mancha anular do cafeeiro (*Coffee ringspot virus* - CoRSV) está amplamente disseminado em todas as principais regiões produtoras do Brasil. Esse vírus, além de causar intensa desfolha e queda de frutos, também, deprecia a qualidade da bebida. O seu genoma, recentemente sequenciado, é composto por dois RNAs de polaridade negativa. O RNA 1 codifica cinco proteínas: nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), proteína do movimento (3), proteína matriz (M) e glicoproteína (G). O RNA 2 apenas uma grande proteína, a RNA dependente da RNA polimerase (L). Para o completo entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem os processos da infecção viral e a correta classificação das proteínas codificadas pelo vírus, é indispensável o estudo da interação das proteínas virais com a célula hospedeira e a construção dos mapas de localização dessas proteínas no ambiente celular. Neste trabalho, as cinco proteínas codificadas pelo RNA 1 foram fusionadas às proteínas fluorescentes GFP e RFP, clonadas no plasmídeo pSITE e expressadas via *Agrobacterium tumefaciens* em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana*, contendo genes codificadores de marcadores nucleares e do retículo endoplasmático, fusionados com o GFP, RFP e/ou CFP. Informações complementares sobre a interação entre as proteínas do CoRSV e a localização dessa interação no ambiente celular foram, também, obtidas por meio da técnica BiFC (Bimolecular fluorescence complementation). Em análise ao microscópio confocal, verificou-se que a proteína N se localiza no núcleo e no citoplasma das plantas infiltradas, a proteína P apenas no núcleo, a proteína 3 na periferia das células, a proteína M no núcleo e no citoplasma, enquanto a proteína G foi detectada no envelope nuclear e nas membranas perinucleares das células de *N. benthamiana*. Quando coexpressas, as proteínas N e P se interagiram e a proteína N foi capaz de redirecionar a proteína P do núcleo para o citoplasma. Os experimentos de interação entre as proteínas do CoRSV foram positivos para P/P, P/M e N/P no núcleo e N/M e G/G na periferia nuclear. Não foram detectadas interações entre as demais proteínas estudadas. Pelos resultados desse experimento confirmaram-se aqueles obtidos na análise computacional realizada com as sequências genômicas do CoRSV.

Palavras-chaves: Dichorhabdovirus. Rhabdovirus. Localização de proteínas. *Bimolecular fluorescence complementation*.

GENERAL ABSTRACT

The *Coffee ringspot virus* (CoRSV) is widespread in all of the major coffee producing regions of Brazil. This virus, besides causing severe defoliation and fruit drop, also depreciates the quality of the drink. The genome consists of two recently sequenced RNAs with negative polarity, the RNA1 encodes five proteins: nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), viral cell-to-cell movement protein (3), matrix protein (M) and glycoprotein (G). The RNA 2 only one major protein, the RNA dependent RNA polymerase (L). For a complete understanding of the molecular mechanisms involved in the processes of viral infection and the correct classification of proteins encoded by the virus, it is essential to study the interaction of viral proteins with host cells and construct maps with the location of these proteins in the cellular environment. The five proteins encoded by RNA 1 were fused to fluorescent proteins GFP and RFP. Then the proteins were cloned into plasmid pSITE, expressed via *Agrobacterium tumefaciens* in transgenic *Nicotiana benthamiana* containing gene coding for nuclear markers and endoplasmic reticulum, fused with GFP, RFP and/or CFP. Additional information about the CoRSV proteins interactions and location in the cellular environment were also obtained by the technique BiFC-Bimolecular fluorescence complementation. In analysis with the confocal microscope the N protein was detected in the nucleus and cytoplasm of infiltrated plants, P protein is located only in the nucleus, protein 3 is expressed at the cell periphery, M protein accumulates in the nucleus and cytoplasm, G protein is present in perinuclear and nuclear envelope in the cell membranes of *N. benthamiana*. When co-expressed the N and P proteins interact, and N protein is able to relocate the P to cytoplasm, despite the observation of it being entirely nuclear-localized when expressed alone. The experiments for the interaction between proteins and the CoRSV were positive for P/P, P/M and N/ P in the nucleus and N/M and G/G in the nuclear periphery. Interactions between other proteins studied were not detected. The results of this experiment confirmed those obtained in the computational analysis with the genomic sequences of CoRSV.

Keywords: Dichorhabdovirus. Rhabdovirus. Protein localization. Bimolecular fluorescence complementation.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Importância econômica do café	14
2.2	<i>Coffee ringspot virus</i> (CoRSV).....	16
2.3	A família <i>Rhabdoviridae</i>	18
2.4	Mapas de localização e interação entre as proteínas do vírus e a célula hospedeira: Métodos e Técnicas	23
2.4.1	Genes que codificam proteínas fluorescentes como marcadores moleculares.....	25
2.4.2	Plasmídeos Vetores para expressão dos genes de interesse.....	26
2.4.3	Determinação da interação e localização das proteínas no ambiente celular por (BiFC).....	28
2.5	Plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> transgênicas que expressam marcadores subcelulares.....	31
	REFERÊNCIAS	34
	CAPITULO 2 Localização subcelular das proteínas do <i>Coffee ringspot virus</i>	46
1	INTRODUÇÃO	48
2	MATERIAIS E MÉTODOS	50
2.1	Condução dos experimentos	50
2.2	Manutenção do vírus e plantas.....	50
2.3	Extração do RNA total e RT-PCR	50
2.4	Reação de recombinação da Bp clonase	53
2.4.1	Reação de recombinação da LR clonase.....	53
2.5	Procedimentos para agrotransformação	54
2.6	Procedimentos para agroinfiltração	54
2.7	Microscopia confocal de varredura a laser	55
3	RESULTADOS	57
3.1	Construção do mapa de localização para as proteínas do <i>Coffee ringspot virus</i>	57
3.2	Estudo da realocização das proteínas N e P do <i>Coffee ringspot virus</i>	59
4	DISCUSSÃO	60
5	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	CAPITULO 3 Elaboração do mapa de interação entre as proteínas do <i>Coffee ringspot virus</i>	69
1	INTRODUÇÃO	71

2	MATERIAIS E MÉTODOS	74
2.1	Condução dos experimentos	74
2.2	Multiplicação do inóculo e plantas utilizadas	74
2.3	Extração do RNA total e RT-PCR	74
2.4	Técnica BiFC (<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>): Reação de recombinação da Bp clonase	75
2.4.1	Técnica BiFC: Reação de recombinação da LR clonase	76
2.5	Procedimentos para agrotransformação e infiltração	77
2.6	Microscopia confocal de varredura a laser	79
3	RESULTADOS	80
3.1	Análise dos resultados de interação entre as proteínas do CoRSV obtidas por BiFC	80
4	DISCUSSÃO	85
5	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	88

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de café (*Coffee arábica*), sendo responsável por 35% da produção mundial, o que significam 50 milhões de sacas de 60 kg. O Estado de Minas Gerais é responsável por mais de 50% dessa produção, concentrada, principalmente, na região Sul (COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO - CONAB, 2014). Apesar do seu volume de produção, a qualidade da bebida nem sempre atende as exigências do mercado internacional, em razão da falta de metodologia para processamento dos frutos e das condições climáticas que favorecem a ocorrência de pragas e doenças, que são consideradas as principais causas da depreciação da qualidade da bebida (CAIXETA, 1998; CARVALHO; CHAGAS; CHALFOUN, 1997; CARVALHO; CHALFOUN, 1985; FAVARIN et al., 2004).

Perdas significativas na produção do cafeeiro têm sido relatadas em decorrência da presença de diversas doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus. O *Coffee ringspot virus* (CoRSV) é causador da doença popularmente conhecida como mancha anular do cafeeiro, que foi descrita em 1938 por Bittancourt, na região de Caçapava - SP. Chagas (1973, 1978, 1980) foi o primeiro a descobrir que esse vírus pode ser transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes considerando, naquela época, que o CoRSV poderia vir a se tornar um problema em virtude da grande expansão da cultura do café para áreas não convencionais, como as de cerrado. Duas décadas depois, essa previsão se concretizou, quando o vírus começou a ser detectado em altas incidências na Região do Alto Paranaíba e Triângulo Mineiro, passando, assim, a ser detectado em, praticamente, todo o Estado de Minas Gerais onde o café é cultivado (FIGUEIRA, 2008; JULIATTI et al., 1995). Recentemente, o CoRSV

foi encontrado, também, em alta incidência em cafezais da Bahia (dados não publicados).

Os sintomas provocados pela mancha anular se caracterizam por manchas cloróticas ou necróticas nas folhas, geralmente, em forma de anéis concêntricos e, nos frutos, induzem manchas irregulares e deprimidas ou em forma de anéis (CHAGAS, 1973, 1978, 1980; FIGUEIRA, 2008). Dependendo da severidade na planta, o CoRSV pode provocar queda severa de folhas, pois todas as folhas infectadas caem. Se o clima for favorável, os frutos infectados se tornam mais suscetíveis ao ataque secundário por fungos diversos, causando, também, a seca e a queda precoce (FIGUEIRA; PASETO; CARVALHO, 1998).

Kitajima e Costa (1972) observando, ao microscópio eletrônico, folhas de café com o sintoma da mancha anular, encontraram partículas baciliformes nos cortes ultrafinos. Essas partículas mediam de 35-40 x 100-110 nm, apresentavam aparência tubular e eram encontradas no nucleoplasma e, menos comumente, no retículo endoplasmático das células de tecidos foliares. A morfologia destas partículas se assemelhava aos vírus da família *Rhabdoviridae*, gênero *Nucleorhabdovirus*, em função de seu formato e de sua localização no ambiente celular.

Os Rhabdovírus constituem uma importante família de vírus capaz de infectar vertebrados, invertebrados e plantas e possuem as maiores partículas entre os vírus de plantas, fazendo parte das poucas famílias de fitovírus em que as partículas são envolvidas por uma membrana lipoproteica.

Baseado no sítio de maturação e acúmulo dentro das células hospedeiras, os Rhabdovírus que infectam plantas podem ser divididos em Nucleorhabdovírus, cujas partículas se acumulam no espaço perinuclear e a morfogênese ocorre na membrana e *Cytorhabdovirus*, que se acumulam no citoplasma, em cavidades do retículo endoplasmático, em cujas membranas ocorre sua morfogênese (KING et al., 2011). Ambos os gêneros são importantes

por causarem doenças em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo culturas de interesse econômico como batata, arroz, milho, café e alface, dentre outras (JACKSON et al., 2005). Recentemente um novo gênero, *Dhikorhabdovirus* foi proposto para incluir os Rhabdovirus que possuem o genoma bipartido e que são transmitidos por *Brevipalpus sp.*, como é o caso do CoRSV, *Orchid Fleck Virus* (OFV), *Citrus leprosis vírus tipo nuclear* (CiLV-N) e *Clerodendrum chlorotic spot vírus* (CICSV) (DIETZGEN et al., 2014).

Conhecer como esses vírus interagem com as plantas tem sido um grande desafio para os fitovirologistas. Resultados recentemente obtidos para a interação e localização de proteínas do *Sonchus yellow net virus* (SYNV) e da interação destas proteínas com os fatores do hospedeiro forneceram subsídio para a compreensão do movimento célula a célula deste vírus, assim como interações entre as proteínas sintetizadas pelo próprio vírus entre si e com os fatores do hospedeiro, e a localização destas na célula, quando interagindo com outra proteína (BYOUNG-EUN et al., 2010). Com base nas informações obtidas, foi inferida a importância de cada proteína na formação e função do complexo de transporte célula a célula. Dentre as proteínas envolvidas, a proteína sc4 do vírus SYNV possui um papel fundamental e está associada à etapa final de transporte, interagindo com os microtúbulos e sendo relacionada ao transporte das partículas virais para a célula seguinte. Foi verificado por outros autores que as proteínas P3 do *Rice yellow stunt virus* (RYSV) e Y do *Potato yellow dwarf virus* (PYDV) possuem uma série de características análogas àquelas da sc4 (BANDYOPADHYAY et al., 2010; HUANG et al., 2005), entretanto não há estudos comprovando se o padrão de interação destas proteínas e os fatores do hospedeiro são semelhantes e nem se sua atuação no transporte célula a célula ocorre de forma similar à proteína sc4. Assim como para os exemplos citados acima, objetivou-se o estudo das proteínas do CoRSV e seu papel na biologia viral.

O CoRSV teve seu genoma recentemente sequenciado e com isso foi possível o estudo do papel de cada um dos seus genes, a localização e a interação entre as proteínas virais, o que permitiu uma maior compreensão dos mecanismos de infecção viral.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica do café

O café é tido como originário da Etiópia, de onde migrou para a Arábia em data não estabelecida corretamente. Admite-se, contudo, que já no século XV os árabes tomavam café. Durante muitos séculos, a Arábia se manteve como única região produtora de café, exportando o produto para regiões próximas como Cairo, Meca e Damasco. No século XVII o café foi levado para a Europa e os holandeses foram os primeiros a comercializá-lo em grande escala, por meio da Companhia das Índias Orientais, de sua propriedade (FERNÃO, 2004).

Atualmente, segundo a Organização Internacional do Café, aproximadamente, 72 países são produtores do grão no mundo. Essa multiplicidade de países produtores se deve à extensa área apta à produção do cafeeiro, graças à sua versatilidade.

A planta de café pertence ao gênero *Coffea*, família *Rubiaceae*. O gênero *Coffea* é composto por 66 espécies de plantas e as mais importantes comercialmente são o *Coffea arabica* L. (café arábica) e a *Coffea canephora* Rerre ex Pierre (café conilon/robusta). Estima-se que existam cerca de 100 espécies de café e o *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são as responsáveis por quase todo o café produzido e comercializado no mundo. O café arábica representa mais de 60% da produção mundial, podendo ser cultivado em diversas regiões edafoclimáticas e produz uma bebida com melhor aroma e sabor, quando comparado com a bebida derivada do café Conilon (CONAB, 2014).

A cultura do café no Brasil iniciou-se no século XVIII, restringindo-se a pequenas plantações em volta da cidade do Rio de Janeiro. A partir de 1960, a cafeicultura brasileira sofreu uma transformação com a introdução de novas

variedades e consequente aumento do potencial de produção, além do incentivo do uso intensivo de adubos químicos e a incorporação de novas tecnologias de cultivo (SILVIA; CORTEZ, 1998). A produção mundial de café, para o ano de 2014, é estimada em torno de 146 milhões de sacas de 60 kg. O Brasil deverá colher um volume de 44,57 milhões de sacas. Isso representa 35% da produção mundial, o que coloca o país como o maior produtor e exportador e o segundo consumidor no ranking mundial (CONAB, 2014).

O consumo global do café é determinado pela qualidade da bebida, de modo que a quantidade e a sustentabilidade do consumo de café dependem da conveniência da bebida e do prazer derivado de seu consumo (CHARRIER; BERTHAUD, 1985). Portanto, a qualidade da bebida é um dos fatores de maior relevância no consumo do café, podendo esta ser afetada por diversos patógenos que infectam os grãos. Dentre eles, pode-se citar a mancha-de-olho-pardo (*Cercospora coffeicola* Berk & Cooke), a mancha de Phoma (*Phoma* spp.), a antracnose-dos-frutos verdes ou *Coffea Berry Disease* e a mancha anular do cafeeiro (*Coffee ringspot virus*). Esses patógenos podem causar perdas na produção em virtude do chochamento, mumificação e lesões nos frutos, além de depreciar a qualidade da bebida (BOARI et al., 2006; VENTURA et al., 2007).

Para manter a boa qualidade da bebida e a alta produtividade nas lavouras de café, o estudo desses patógenos e a busca por cultivares resistentes são indispensáveis, estando entre as principais abordagens da maioria das pesquisas realizadas.

2.2 *Coffee ringspot virus (CoRSV)*

O *Coffee ringspot virus* (CoRSV), que causa a doença popularmente conhecida como mancha anular do cafeeiro, foi detectado pela primeira vez infectando plantas de café arábica, na cidade de Caçapava, em São Paulo (BITANCOURT, 1938). Naquela época já se suspeitava que a doença fosse de etiologia viral por causa da similaridade dos sintomas nas folhas de café com os sintomas induzidos pelo *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e pelo vírus da sorose B (*Cirus psorosis virus* - CPsV) (BITANCOURT, 1939, 1958). Kitajima e Costa (1972), observando ao microscópio eletrônico células de folhas de café com sintomas da mancha anular, encontraram partículas virais, em forma de bastonete, medindo de 35 a 40 nm de diâmetro por 100 a 110 nm de comprimento. Em razão das partículas virais em forma de bastonete, o CoRSV foi considerado um membro em potencial da família *Rhabdoviridae* (KITAJIMA; COSTA, 1972). Atualmente consta na descrição do ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) como um membro provisório do gênero *Nucleorhabdovirus*, família *Rhabdoviridae* ordem *Mononegavirales* (KING et al., 2011).

O genoma do CoRSV é composto por duas partículas de RNA de polaridade negativa, medindo 6.552nt e 5.945nt, respectivamente (Genbank KF812525.1 e KF812526.1). A sequência antigenômica do RNA 1 codifica cinco “open reading frames”- ORFs (P1-P5), enquanto o RNA 2 codifica apenas uma grande proteína (P6). A proteína P1 ou nucleocapsídeo (N) possui o peso molecular de 49kDa e, apesar de todos os testes computacionais falharem em detectar possíveis sinais para localização nuclear (NLS), esta proteína possui duas regiões com potencial para atuar como sinal para exportação nuclear (NES). A P2 codifica uma fosfoproteína (P), com um peso molecular de 27kDa.

Esta proteína apresenta duas regiões previstas para NLS e uma para NES. A 3 ou proteína do movimento viral pesa 36kDa e possui e uma região prevista para NES. A P4, ou proteína matriz (M), é capaz de codificar uma proteína básica de 20kDa (pI 9,27) e possui duas regiões preditas para NLS. A P5 ou glicoproteína (G) possui o peso molecular de 66kDa e uma região prevista para NLS. O RNA 2 codifica uma grande proteína, a P6 ou RNA-dependente RNA polimerase (L), com peso molecular previsto de 212 kDa e esta proteína possui uma região predita para NES e uma para NLS (acesso no Genbank KF812525 e KF812526).

Chagas (1973, 1978, 1980, 2012), considerando o estudo do CoRSV importante, em virtude da expansão da cultura do café para áreas de cerrado, realizou diversos estudos com esse vírus e observou que ele causava lesões locais em plantas de *Chenopodium quinoa* e era transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Gejskes) e não era transmitido via sementes. Em plantas de café, o CoRSV pode induzir sintomas nas folhas, nos frutos e até mesmo nos ramos novos. Nas folhas, os sintomas se caracterizam por manchas cloróticas ou necróticas, geralmente em forma de anéis concêntricos. Nos frutos, os sintomas mais comuns são em forma de anéis ou irregulares, geralmente descoloridos e nos ramos jovens são visualizados manchas cloróticas (BOARI et al., 2006; FIGUEIRA, 2008). Kitajima, Chagas e Rodrigues (2011), estudando 9 espécies de café cultivadas, observaram que todas apresentaram os sintomas da mancha anular, em diferentes intensidades.

No mundo, a mancha anular do cafeeiro foi relatada no Brasil e na Costa Rica (RODRIGUES et al., 2002). No Brasil, o CoRSV foi detectado nos estados de São Paulo (BITANCOURT, 1938), Minas Gerais (FIGUEIRA et al., 1996; JULIATTI et al., 1995), Paraná (RODRIGUES; NOGUEIRA, 2001), Bahia (KITAJIMA; CHAGAS, 2009), Espírito Santo (BOARI; POZZA; FIGUEIRA, 2011) e no Distrito Federal (BRANQUINHO et al., 1988). No estado de Minas Gerais, que é o principal produtor de café do Brasil, o CoRSV tem sido

detectado em altas incidências nas regiões do Sudeste com temperaturas mais altas, como Três Corações, Boa Esperança, Lavras e Ijaci. Em razão dos sintomas do CoRSV serem similares com os sintomas induzidos por outros patógenos e de difícil visualização no campo, acredita-se que essa virose seja de maior ocorrência do que o relatado. Além disso, na maioria dos locais onde ocorre, a mancha anular tem sido atribuída a danos causados pelo ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis*. Desta forma, as perdas diretamente ocasionadas pelo vírus não têm sido corretamente determinadas e, certamente, estão sendo subestimadas. Além das perdas na produtividade em função da queda prematura das folhas e frutos, os frutos infectados pelo CoRSV apresentam pior qualidade de bebida quando comparados aos frutos sadios (BOARI et al., 2006; REIS; SOUSA, 2001).

As doenças viróticas no cafeeiro são, particularmente, importantes, pois o cafeeiro é uma planta perene e as doenças viróticas não possuem controle curativo. Desta forma, o controle deve ser feito de forma preventiva, por meio do controle do ácaro vetor, já que não foram encontrados, até o momento, genes de resistência para esta virose.

2.3 A família *Rhabdoviridae*

Os Rhabdovírus são classificados como pertencentes à ordem *Mononegavirales*, cujos membros consistem de vírus que possuem grandes partículas envelopadas com o genoma composto por um RNA de fita simples, não segmentado e com polaridade negativa (KING et al., 2011). A ordem *Mononegavirales* contém quatro famílias (*Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bornaviridae* e *Rhabdoviridae*) classificadas de acordo com a morfologia das partículas, organização genômica e mecanismos de expressão gênica. Em conjunto, os membros de cada família causam doenças de importante impacto na

saúde pública e vida selvagem e, também, representam uma ameaça para a agricultura e indústria pesqueira (JACKSON et al., 2005).

As características mais marcantes dos Rhabdovirus são os vírions envelopados com formato baciliforme e as partículas medindo de 45 a 100nm de diâmetro e 130 a 350 nm de comprimento (KING et al., 2011). Os Rhabdovirus são separados em seis gêneros, de acordo com o número de proteínas codificadas e, também, por causa das propriedades biológicas. Membros de quatro gêneros, *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus* e *Novirhabdovirus*, infectam vertebrados e dois, *Nucleorhabdovirus* e *Cytorhabdovirus*, infectam plantas. Os Rhabdovirus foram adaptados a uma enorme variedade de hospedeiros, pois alguns membros dos *Vesicularhabdovirus*, *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus*, também, são capazes de infectar artrópodes (JACKSON et al., 2005; WALKER et al., 2011).

Rhabdovirus que infectam plantas são separados, taxonomicamente, nos gêneros *Nucleorhabdovirus* e *Cytorhabdovirus* e no recente gênero proposto *Dichorhabdovirus*, com base em seus sítios de replicação e morfogêneses (DIETZGEN et al., 2011, 2014). Os *Nucleorhabdovirus* possuem como espécie tipo o *Potato yellow dwarf virus* (PYDV), replicam-se no núcleo e acumulam seus vírions nos espaços perinucleares das células infectadas. Outras nove espécies de vírus são reconhecidas dentro deste gênero. Os *Cytorhabdovirus* se replicam no citoplasma das células infectadas. O gênero tem como espécie tipo o *Lettuce necrotic yellow virus* (LYNV) e inclui oito espécies adicionais reconhecidas (DIETZGEN et al., 2011; JACKSON et al., 2005; WALKER et al., 2011). O gênero *Dichorhabdovirus* foi recentemente proposto para incluir os vírus transmitidos pelo ácaro do gênero *Brevipalpus*, são encontrados no núcleo e possuem o genoma bipartido. A espécie tipo é o *Orchid fleck virus* (OFV) e o CoRSV possui todas as características necessárias para ser membro desse gênero (DIETZGEN et al., 2014).

Diversos Rhabdovirus que infectam plantas causam perdas em culturas de importância econômica, como por exemplo, o *Maize mosaic virus* (MMV), que chegou a causar até 100% de perdas em plantações de milho suscetíveis (BREWBAKER et al., 1981). Dentre as culturas atacadas, pode-se citar a batata, alface, milho, café, beterraba, abobrinha, mamão, citrus e uma ampla gama de gramíneas, dentre outras (JACKSON et al., 2005).

Os hospedeiros naturais dos Rhabdovirus são, primeiramente, determinados pela especificidade do vetor e preferência alimentar, desta forma, o vetor tem um efeito dinâmico na distribuição geográfica destas viroses. Embora alguns Rhabdovirus não possuam vetores conhecidos, a maior parte destes vírus é transmitida de maneira persistente e propagativa por afídeos (*Aphidae*), cigarrinhas (*Cicadellidae*) ácaros (*Brevipalpus*) ou, ainda, por outros vetores da família *Delphacidae* (JACKSON et al., 2005).

Os Rhabdovirus são constituídos de 65 a 75 % de proteína, 1 a 2% de RNA, 15 a 25% de lipídios e, aproximadamente, 3% de glicoproteínas (TORDO et al., 2005). O genoma dos Rhabdovirus que infectam plantas varia de 12 a 14.5Kb e possui de 5 a 9 ORFs, separadas por pequenas sequências entre os genes, denominadas de junções intergênicas. As cinco principais ORFs dos Rhabdovirus são dispostas em uma mesma ordem (3' N-P-M-G-L 5') e podem estar intercaladas com uma ou duas ORFs adicionais, assim como ocorre nos vírus *Sonchus yellow net virus* (SYNV), PYDV, *Rice yellow stunt virus* (RYSV), CoRSV, LYNV e MMV. As ORFs N,P,M,G e L codificam para as proteínas do nucleocapsídeo, fosfoproteína, proteína matriz, glicoproteína e RNA polimerase, respectivamente, (BANDYOPADHYAY et al., 2010; HUANG et al., 2005; JACKSON et al., 2005).

A proteína do nucleocapsídeo tem a função de encapsidar o RNA genômico e, também, é um componente do viroplasma, que é o local de multiplicação do vírus na célula hospedeira (WAGNER; CHOI; JACKSON,

1996). Possíveis sinais de localização nuclear-NLS (Nuclear Localization Signal) foram identificados em uma região similar na proteína N para os *Nucleorhabdovirus* RYSV, *Maize fine streak virus* (MFSV) e *Taro vein chlorosis virus* (TaVCV), mas não nos *Cytorhabdovirus* (JACKSON et al., 2005). Estudos de localização celular têm demonstrado que a proteína N do SYNIV, PYDV, MFSV e OFV se localizam no núcleo (BANDYOPADHYAY et al., 2010; GOODIN et al., 2001; KONDO et al., 2013) e, ainda, que a proteína N do SYNIV possui um NLS que é requerido para facilitar a entrada no núcleo (GOODIN et al., 2001, 2007a, 2007b). As sequências genômicas das proteínas N dos *Nucleorhabdovirus* e dos *Cytorhabdovirus*, têm demonstrado uma baixa relação com as sequências da mesma proteína codificada por outros gêneros dos Rhabdovirus, sugerindo certo grau de especificidade desta ORF para Rhabdovirus de plantas (JACKSON et al., 2005).

A fosfoproteína (P) nos Rhabdovirus participa da montagem de um complexo proteico, envolvendo as proteínas L e N e possui suposta função na transcrição e replicação viral (GOODIN et al., 2007a, 2007b). No PYDV e no OFV essa proteína apresentou localização nuclear, além de interagir com a proteína N na formação do viroplasma (GOODIN et al., 2007a, 2007b; KONDO et al., 2013).

A proteína M ou matriz está, provavelmente, envolvida em um processo de condensação do nucleocapsídeo e, também, associa-se com a proteína G durante a morfogênese viral (JACKSON et al., 2005). Possivelmente uma região hidrofóbica de 67 aminoácidos da proteína M seja responsável pela interação da membrana lipídica com as proteínas G (HILLMAN et al., 1990; JACKSON et al., 2005). A proteína M do MFSV e do SYNIV, também, apresenta um sinal de localização nuclear (NLS) (JACKSON et al., 2005; TSAI et al., 2005). Estudos de localização proteica demonstram que a proteína M do LNYV está presente no núcleo e, também, na periferia da célula hospedeira (MARTIN et al., 2012).

Bandyopadhyay et al. (2010) demonstraram que a proteína M do PYDV é capaz de induzir acumulação intranuclear da membrana nuclear da planta hospedeira, na ausência de qualquer outra proteína viral.

Nos vírions dos Rhabdovirus a proteína G ou glicoproteína forma a estrutura denominada de “pontas ou espículas glicoproteicas”. Esta proteína possui no terminal carboxílico, um sinal de marcação nuclear que, possivelmente, está envolvido no trânsito de fatores virais para a membrana nuclear interna, nas etapas iniciais da morfogênese (JACKSON et al., 2005; LUO; FANG, 1998). No LNYV esta proteína se localiza na periferia e na membrana nuclear das células infectadas, no PYDV ela está presente no envelope nuclear e no SYNIV nas membranas celulares (BANDYOPADHYAY et al., 2010; MARTIN et al., 2012; MIN et al., 2010).

A poliproteína, ou proteína L, é a maior proteína dos Rhabdovirus, variando de 223kDa no RYSV a 241kDa no MFSV. Choi et al. (1992), estudando a proteína L da ordem *Mononegavirales*, revelaram a presença de 12 domínios proteicos, que aparecem sequencialmente. Análises filogenéticas da proteína L dos Rhabdovirus sugerem uma origem monofilética para o grupo (JACKSON et al., 2005; TORDO et al., 2005). Árvore filogenética gerada com base na proteína L dos Rhabdovirus que infectam plantas apresentou dois clados distintos, que correspondem aos *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus* (JACKSON et al., 2005). Quando comparados os dois gêneros dos Rhabdovirus que infectam plantas, a proteína L apresenta diferente forma de atuação. Nos *Cytorhabdovirus* a proteína L está, possivelmente, presente de forma ativa nos vírions e, também, é capaz de iniciar a transcrição tão logo quanto o vírus perca a sua capa proteica. Por outro lado, as partículas dos *Nucleorhabdovirus* parecem conter uma polimerase inativa, que requer ativação por fatores da hospedeira nos estágios iniciais da infecção (REDINBAUGH; HOGENHOUT, 2005; REVILL et al., 2005).

Os Rhabdovírus que infectam plantas codificam uma proteína adicional, comumente localizada entre as proteínas P e M, que, possivelmente, é responsável pelo movimento célula a célula dos vírus (JACKSON et al., 2005). Os vírus PYDV, MMV LNYV, RYSV e SYNV codificam as proteínas Y, 4b, Mv, P3 e sc4, respectivamente, entre as proteínas P e M (BANDYOPADHYAY et al., 2010; BYOUNG-EUN et al., 2010; JACKSON et al., 2005; MARTIN et al., 2012; MIN et al., 2010; WETZEL; DIETZGEN; DALE, 1994).

Os estudos das proteínas dos Rhabdovírus têm fornecido importantes informações de como e onde essas proteínas se interagem com os fatores da hospedeira. Essas informações são essenciais para o melhor entendimento da relação vírus-hospedeiro, que auxilia na formação e compreensão de modelos relativos aos aspectos biológicos do processo de infecção viral (BANDYOPADHYAY et al., 2010; BYOUNG-EUN et al., 2010; GOODIN et al., 2001).

2.4 Mapas de localização e interação entre as proteínas do vírus e a célula hospedeira: Métodos e Técnicas

O mapa de localização e interação entre as proteínas virais (PILMs: protein interaction and localization maps) constitui uma importante ferramenta para a compreensão dos passos envolvidos nos processos de infecção e translocação do vírus na planta hospedeira (ANDERSON et al., 2012; BANDYOPADHYAY et al., 2010; DIETZGEN et al., 2012; MARTIN et al., 2012; MIN et al., 2010). Os PILMs representam a interação entre as proteínas codificadas pelos vírus e as proteínas e/ou organelas da planta hospedeira, fornecendo informações sobre a sua provável localização no ambiente celular. Os dados de localização para esses mapas são gerados por meio da expressão

das proteínas codificadas pelos vírus, fusionadas a proteínas fluorescentes, como a GFP, RFP, YFP e CFP, geralmente via *Agrobacterium tumefaciens*.

Após expressas, as proteínas virais podem ser observadas ao microscópio confocal, permitindo determinar a sua localização, que pode ser em um ou vários locos subcelulares, por exemplo, no núcleo (n), na periferia da célula (p), no plasmodesma (pd), no retículo endoplasmático (ER) ou outro local. Além de interagir com a célula, as proteínas virais podem, também, interagir entre si. Essa interação, que deve, também, compor os dados dos PILMs, é observada por meio da técnica denominada BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) (CITOVSKY; GAFNI; TZFIRA, 2008).

Normalmente, as proteínas codificadas pelos vírus têm sido testadas em todas as interações em pares, com exceção das polimerases (L) que são muito grandes para serem expressas em plantas ou células bacterianas, utilizando os vetores e linhas celulares atualmente disponíveis (CITOVSKY; GAFNI; TZFIRA, 2008; GOODIN et al., 2007; TZVI et al., 2005). Uma vez que os dados de localização e interação tenham sido obtidos, uma matriz PILM é gerada. As proteínas são alocadas usando designações de uma única letra (N para nucleocapsídeo, P para fosfoproteína, etc) e linhas sólidas, representando interações, são traçadas entre eles. Proteínas não ligadas por linhas não interagem. Como o padrão de localização subcelular pode mudar, quando uma proteína é expressa numa dada célula ao mesmo tempo com outras proteínas, frequentemente, é necessário indicar múltiplos sítios de localização para a proteína, como P^{c,n}, que indica que a proteína viral P pode ser observada no citoplasma e no núcleo (BANDYOPADHYAY et al., 2010; HUANG et al., 2005).

2.4.1 Genes que codificam proteínas fluorescentes como marcadores moleculares

O gene que codifica a proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein-GFP*), isolado da água-viva *Aequorea victoriae* por Chalfie et al. (1994), tem sido um dos mais empregados como marcador molecular (BUCHER et al., 2003; COHEN; MANION; MORRISON, 2000; CUBITT et al., 1995; DUNOYER et al., 2002; STEPHAN et al., 2011). Outras variantes da GFP, obtidas por mutação, com a finalidade de aumentar a sua eficiência, como a EGFP (CORMACK; VALDIVIA; FALKOW, 1996; CRAMERI et al., 1996; HEIM; CUBITT; TSIEN, 1995; SCHOLZ et al., 2000) ou obter cores diferentes como amarelo (*Yellow fluorescent protein-YFP*) e azul (*Cyan fluorescent protein-CFP*) (HEIM; TSIEN, 1996; MIYAWAKI et al., 1997; NAGAI et al., 2002; ZHANG et al., 2002). Em razão de suas propriedades favoráveis, como resistir a altas temperaturas (65°C), atuar em ampla faixa de pH (6 – 12) e suportar a fixação com formaldeído, podendo, portanto, ser detectada *in vivo* e em tecidos fixados (EBERL; DUYK; PERRIMON, 1997), a GFP continua sendo largamente empregada nos estudos de interação e localização celular (ANDERSON et al., 2012; GUO; DRIVER; OHLSTEIN, 2013; KARRAN; SANFAÇON, 2014; MARTIN et al., 2012; MONTERO-ASTÚA et al., 2014; RUIZ et al., 2013).

A necessidade de observar mais de uma proteína, expressando na célula ao mesmo tempo, levou os pesquisadores a investigar novas possibilidades de cores contrastantes, que permitissem uma melhor visualização no ambiente celular. Uma das primeiras opções foi a proteína fluorescente vermelha, proveniente de *Discosoma* sp, que se revelou uma atraente opção para ser empregada ao mesmo tempo com a GFP (MÁS et al., 2000; MATZ et al., 1999). Após a sua descoberta, muitos outros mutantes foram, também, obtidos, visando

melhorar a sua eficiência (BAIRD; ZACHARIAS; TSIEN, 2000; YARBROUGH et al., 2001). Atualmente, mais de 35 proteínas autofluorescentes (AFPs), que abrangem uma gama de emissões do azul ao vermelho, do espectro visível (460-595nm), foram descritas (STEWART JUNIOR, 2006). O desenvolvimento de AFPs com diferentes espectros de excitação e de emissão permite a utilização simultânea de detecção de dois ou mais eventos na mesma célula (TZVI et al., 2005), como, por exemplo, interação proteína-proteína ou marcadores fluorescentes na mesma célula.

2.4.2 Plasmídeos Vetores para expressão dos genes de interesse

Existem diversos plasmídeos comerciais que possibilitam a clonagem das proteínas de interesse, fusionadas com as proteínas fluorescentes escolhidas, para expressão na célula, destacando-se os vetores de clonagem Gateway, utilizados para fusões de GFP na região N ou C terminal da proteína (CURTIS; GROSSNIKLAUS, 2003). Outro sistema, o pSAT (*modular satellite plasmid*) permite fusões nas regiões C ou N terminais de cinco diferentes AFPs (TZVI et al., 2005). Derivado do pSAT, o pSITE (*stable integration and transient expression plasmid*), é uma nova série de vetores binários, empregados para transformação da *Agrobacterium tumefaciens*, adequados à integração estável ou expressão transiente de diversas proteínas autofluorescentes em células de plantas (CHAKRABARTY et al., 2007; GOODIN et al., 2008). Nos plasmídeos pSITE-CA, a AFP deve ser fusionada à região C terminal da proteína de interesse (DEST-Figura 1), e nos PSITE-NA a AFP deverá ser fusionada à região N terminal da proteína de interesse (DEST-Figura 1)

Vetores binários compatíveis com o Gateway, como, por exemplo, o pSITE, melhoraram a eficiência da clonagem de proteínas de interesse fusionadas à AFP (CURTIS; GROSSNIKLAUS, 2003; EARLEY et al., 2006).

A clonagem Gateway utiliza um sítio específico de recombinação (*attR1* e *attR2*-Figura 1), mediado por um alfa-fago, que transfere os fragmentos de DNA entre os plasmídeos, contendo locais compatíveis de recombinação, por meio de duas enzimas, Bp e LR clonase (WALHOUT et al., 2000). Esta estratégia é tão interessante, pois após os clones com o DNA de interesse serem capturados em um vetor de entrada (pDONR), pode ser utilizado para uma infinidade de vetores que permitem a expressão em bactérias, insetos, leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), animais e plantas. Isso evita a situação frustrante comumente encontrada com a clonagem mediada por ligase, ou seja, muitas vezes, o vetor não possui sítios de restrição compatíveis para permitir a fácil mobilização para o próximo vetor (GOODIN et al., 2007a). Após as construções pDONR serem geradas e validadas, todos os sistemas de expressão podem ser utilizados, o que aumenta a eficiência dos estudos (HILSON et al., 2004; HILSON; SMALL; KUIPER, 2003).

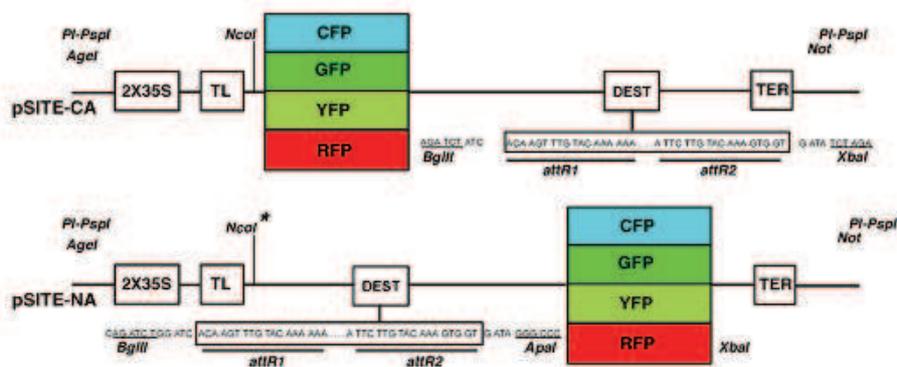


Figura 1 Representação esquemática dos vetores pSITE. **pSITE-CA.** vetor Gateway para a expressão de proteínas fusionadas ao carboxi terminal das AFPs (CFP, GFP, YFP, RFP). **pSITE-NA.** Vetor Gateway para a expressão de proteínas fusionadas ao amino terminal das AFPs. **DEST.** Proteína alvo do estudo. **attR1** e **attR2** sítios específicos de recombinação

Adaptado: Chakrabarty et al. (2007) e Goodin et al. (2007a)

2.4.3 Determinação da interação e localização das proteínas no ambiente celular por (BiFC)

A criação de novos pSITEs e o avanço da tecnologia Gateway tornou possível o estudo de interação de proteínas *in vivo* utilizando a Complementação Bimolecular Fluorescente (BiFC). Esta técnica consiste na fusão de duas proteínas candidatas à interação a dois fragmentos de uma proteína fluorescente (por exemplo, a YFP), sendo uma delas ao N-terminal e a outra ao C-terminal. Caso haja a interação entre as proteínas virais, haverá, também, uma união entre os fragmentos da molécula fluorescente, que passará, então, a emitir a fluorescência que poderá ser captada ao microscópio confocal (Figura 2) (CITOVSKY; GAFNI; TZFIRA, 2008). Essa fluorescência emitida pela molécula é, na maioria das vezes, se não todas irreversíveis (KODAMA; HU, 2012; MORELL et al., 2007; ROBIDA; KERPPOLA, 2009).

Um requisito essencial para as proteínas fusionadas ao n-YFP ou c-YFP serem utilizadas, eficientemente, na análise BiFC é que os dois fragmentos de proteína fluorescente não se associem um com o outro, na ausência de uma interação entre as proteínas fusionadas, desta forma, os controles devem ser empregados de forma precisa a fim de evitar falso positivo (KODAMA; HU, 2012).

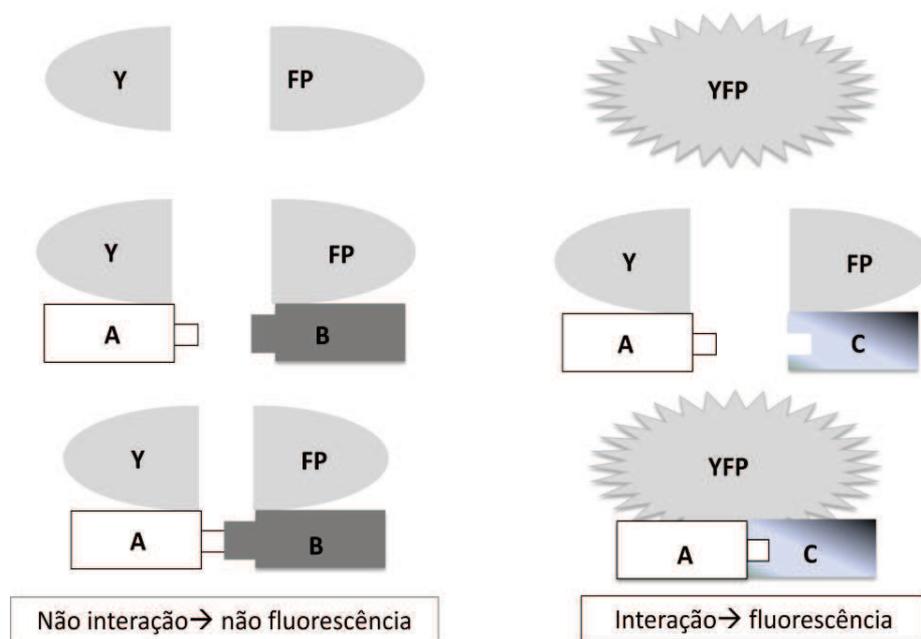


Figura 2 Esquema da interação entre as proteínas na técnica BiFC: à esquerda, a proteína YFP fragmentada e fusionada a duas proteínas que não interagem entre si (A e B), inviabilizando a reestruturação da molécula e, conseqüentemente, a emissão de fluorescência; à direita, quando os fragmentos são fusionados às proteínas que interagem entre si (A e C), a molécula YFP é reestruturada resultando na emissão de fluorescência.

Para a obtenção dos fragmentos das proteínas fluorescentes, emprega-se a técnica de permutação circular de proteínas, que permite alterar a ordem dos aminoácidos numa sequência proteica (YU; LUTZ, 2011). Enquanto numa proteína original a região N terminal fica ligada à região C terminal, na permutação circular, novas regiões N e C terminais são geradas em outras regiões estruturais (KODAMA; HU, 2012).

Uma das aplicações da permutação circular é determinar a posição onde a inserção pode ser introduzida, sem afetar a estrutura e dobramento global da proteína. A proteína YFP pode ser dividida entre as posições 8^a e 9^a da estrutura

em β -folha da proteína, gerando os fragmentos YN173 / YC173, que equivalem ao n-YFP e ao c-YFP, respectivamente (HU; CHINENOV; KERPPOLA, 2002).

Citovsky et al. (2006) construíram um série de vetores pSAT-BiFC, com os fragmentos N e C da proteína YFP, com a finalidade de estudar as interações proteicas e padrões de localização das mesmas em planta. Dentre eles, o vetor pSAT-BiFC-N1 foi construído para ser fusionado à região N-terminal da proteína estudada, e o pSAT-BiFC-C1 à região C terminal da proteína de interesse. Os mesmos foram validados, para demonstrar a interação e localização de proteínas, empregando como modelo a proteína VirD2 de *Agrobacterium* que está presente no núcleo das células de plantas, leveduras e animais. Essa proteína interage com a proteína AtImp4, que é um mediador de importação nuclear, presente em células de *Arabidopsis*. A proteína VirD2 foi fusionada ao pSAT-BiFC-N1 e a proteína AtImp4 ao pSAT-BiFC-C1 e a interação foi detectada no núcleo de plantas de *Nicotiana tabacco*, demonstrando o sucesso desta técnica.

Em 2009, Martin et al. construíram o vetor Gateway pSITE-BiFC, que não possui restrições quanto a modificações das regiões terminais, podendo ser fusionado tanto ao C quanto ao N terminal das proteínas estudadas. Para validar os vetores, os autores utilizaram a fosfoproteína (P) e a proteína do nucleocapsídeo (N) do *Sunchus yellow net virus* (SYNV), que se interagem (GOODIN et al., 2001). A proteína P foi fusionada ao pSITE-BiFC-C e a proteína N ao pSITE-BiFC-N e expressas, via *Agrobacterium*, em plantas de *Nicotiana benthamiana*. A interação entre as proteínas N e P foi visualizada no núcleo das plantas agroinfiltradas, demonstrando a aplicabilidade dos vetores. Desde então, o uso do BiFC tem sido uma das técnicas mais utilizadas para o estudo de localização e interação das proteínas.

2.5 Plantas de *Nicotiana benthamiana* transgênicas que expressam marcadores subcelulares

Nicotiana benthamiana é uma planta nativa da Austrália (STOKES, 1846) e, atualmente, é uma das mais utilizadas em experimentos de virologia vegetal, por ser hospedeira de uma grande variedade de vírus que infectam plantas (CHRISTIE; CRAWFORD, 1978). Adicionalmente, *N. benthamiana* é suscetível a uma ampla gama de agentes patogênicos, como bactérias, oomicetos e fungos, tornando-se uma ferramenta valiosa no estudo da relação patógeno-hospedeiro.

Apesar de *N. benthamiana* ser muito utilizada por virologistas, estudos voltados à biologia molecular só se iniciaram em função do avanço de três técnicas. Primeiramente, foi a capacidade de se expressar genes estrangeiros em plantas, com base em vetores virais. Essa tecnologia não só forneceu um meio para acompanhar o movimento dos vírus nas células das plantas, mas também revelou novos conhecimentos sobre aspectos fundamentais da biologia da planta, como, por exemplo, plasmodesmas, obstrução e movimento de macromoléculas entre as células (CHAPMAN; KAVANAGH; BAULCOMBE, 1992; CRUZ et al., 1996; ESCOBAR et al., 2003; LUCAS, 2006). Em seguida, foi a invenção da tecnologia conhecida como silenciamento gênico induzido por vírus (virus-induced gene silencing- VIGS) (KUMAGAI et al., 1995; THOMAS et al., 2001). Durante muitos anos, os vetores virais usados para VIGS foram, particularmente, bem adaptados para uso em *N. benthamiana* e tinham pouca utilidade em *Arabidopsis thaliana*, a principal planta utilizada em genética molecular (BURCH-SMITH et al., 2006). A terceira tecnologia serviu para popularizar *N. benthamiana* como planta modelo para pesquisas com agroinfiltração, que permite que as proteínas de interesse fusionadas a proteínas fluorescentes possam ser expressas, transitoriamente, em células vegetais

(GOODIN et al., 2002; SCHOB; KUNZ; MEINS JUNIOR, 1997; VOINNET et al., 2003). Curiosamente, assim como para VIGS, agroinfiltração funciona, excepcionalmente, bem em *N. benthamiana*, mas não tão bem em outras plantas, como, por exemplo, *A. thaliana*. Desta forma, os três grandes avanços na manipulação de proteínas e expressão dos genes em células vegetais são mais adequados para *N. benthamiana*. Além disso, esta planta pode ser geneticamente transformada e regenerada com boa eficácia (GOODIN et al., 2008).

Nicotiana benthamiana é uma das plantas mais maleáveis para a condução de estudos de localização das proteínas. É fácil de ser agroinfiltrada, além de possuir a característica antimancha quando utilizados corantes para o núcleo, membranas e outras estruturas relevantes dentro da célula (GOODIN et al., 2005, 2007a). Além disso, contribui para a aquisição de micrografias de alta qualidade e quando utilizada a técnica de agroinfiltração permite um grande número de células infectadas simultaneamente (GOODIN et al., 2008). Além de ser uma ferramenta fundamental para o estudo de localização de proteínas nas células de plantas, *N. benthamiana* tem sido essencial para estudos de interação proteína-proteína. Segundo Ohad, Shichrur e Yalovsky (2007), *N. benthamiana* é a planta mais utilizada em experimentos de complementação de fluorescência biomolecular (BiFC).

A linhagem transgênica de *N. benthamiana* mais utilizada é a 16C, que é homozigota para o gene mGFP-ER (SIEMERING et al., 1996), expressando proteína fluorescente verde (GFP) no retículo endoplasmático (ER) (BRIGNETI et al., 1998; RUIZ; VOINNET; BAULCOMBE, 1998). Os peptídeos sinais Histidina-Aspartame-Glutamate-Leucina (HDEL)-ER, retém o sinal presente no gene mGFP-ER no retículo endoplasmático das células das plantas (HASELOFF et al., 1997). Chakrabarty et al. (2007) substituíram o GFP no gene mGFP-ER por RFP (*Red fluorescet protein*), por meio de PCR, criando linhagens de *N. benthamiana* que expressam proteína vermelha fluorescente no retículo

endoplasmático (RFP-ER). Os mesmos autores fusionaram o RFP à histona 2B das plantas de *N. benthamiana* originando plantas que expressam RFP no núcleo (RFP:NbH2B). Utilizando as mesmas técnicas, a proteína fluorescente ciano (CFP-cyan *fluorescet protein*) foi fusionada à histona 2B, originando plantas de *N. benthamiana* que possuem um marcador de núcleo azul (MARTIN et al., 2009).

Essas linhagens de *N. benthamiana* que expressam marcadores subcelulares são de grande importância para o estudo de localização das proteínas virais e para a construção de mapas de interação e localização das proteínas, pois fornece um marcador fixo nas organelas das células das plantas utilizadas.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, G. et al. The nucleocapsid protein of Potato yellow dwarf virus: protein interactions and nuclear import mediated by a non-canonical nuclear localization signal. **Frontiers in Plant Science**, Washington, v. 3, p. 14, Feb. 2012.
- BAIRD, G. S.; ZACHARIAS, D. A.; TSIEN, R. Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 20, p. 11241-11246, Sept. 2000.
- BANDYOPADHYAY, A. et al. An integrated protein localization and interaction map for *Potato yellow dwarf virus*, type species of the genus Nucleorhabdovirus. **Virology**, London, v. 402, n. 1, p. 61-71, June 2010.
- BITANCOURT, A. A. Lesões nas frutas da mancha anular do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 5, p. 33-34, 1939.
- BITANCOURT, A. A. A mancha anular, uma nova doença do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 4, p. 404-405, 1938.
- BITANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 24, p. 191-201, 1958.
- BOARI, A. J. et al. Coffee ringspot virus (CoRSV): influence on the beverage quality and yield of coffee beans. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 2, p. 192-194, abr./jun. 2006.
- BOARI, A. J.; POZZA, E. A.; FIGUEIRA, A. R. Ocorrência e análise de *Coffee ringspot virus* em frutos de cafeeiro baseada na distância de incidência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 27., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001, p. 262.
- BRANQUINHO, W. G. et al. Doenças que afetam plantios de café e de mandioca no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 140-142, 1988.

BREWBAKER, J. L. Resistance to maize mosaic virus. In: GORDON, D. T.; KNOKE, J. K.; SCOTT, G. E. (Ed.). **Virus and virus-like diseases of maize in the United States**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1981. p. 145-151. (Southern Cooperative Series Bulletin, 247).

BRIGNETI, G. et al. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **European Molecular Biology Organization**, Heidelberg, v. 17, n. 22, p. 6739-6746, Nov. 1998.

BUCHER, E. et al. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 2, p. 1329-1336, Jan. 2003.

BURCH-SMITH, T. M. et al. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 142, n. 1, p. 21-27, Sept. 2006.

BYOUNG-EUN, M. et al. A host-factor interaction and localization map for a plant-adapted rhabdovirus implicates cytoplasm-tethered transcription activators in cell-to-cell movement. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 23, n. 11, p. 1420-1432, Nov. 2010.

CAIXETA, G. Z. T. Comportamento atual do mercado de café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 9-13, 1998.

CARVALHO, V. D. de; CHAGAS, S. J. de R.; CHALFOUN, S. M. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.

CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, p. 79-92, 1985.

CHAGAS, C. M. Associação do ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes à mancha anular do cafeeiro. **O Biólogo**, São Paulo, v. 39, p. 229-232, 1973.

CHAGAS, C. M. **Coffee ringspot (?) Nucleorhabdovirus**. Disponível em: <<http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr237.htm>>. Acesso em: 10 set. 2012.

CHAGAS, C. M. Evidências da etiologia viral da mancha anular do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 218-219, 1980.

CHAGAS, C. M. **Mancha anular do cafeeiro**: transmissibilidade, identificação do vetor e aspectos anátomo-patológicos da espécie *Coffea arabica*. 1978. 132 p. Tese (Doutorado em Biociência) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

CHAKRABARTY, R. et al. PSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: probing *Nicotiana benthamiana*-virus interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 7, p. 740-750, July 2007.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, New York, v. 263, n. 5148, p. 802-805, Feb. 1994.

CHAPMAN, S.; KAVANAGH, T.; BAULCOMBE, D. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 549-557, July 1992.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M. N.; WILSON, K. C. (Ed.). **Coffee**: botany, biochemistry and productions of beans and beverage. Westport: AVI, 1985. p. 13-47.

CHOI, T. J. et al. Structure of the L (polymerase) protein gene of *Sonchus yellow net virus*. **Virology**, Washington, v. 189, n. 1, p. 31-39, July 1992.

CHRISTIE, S. R.; CRAWFORD, W. E. Plant virus range of *Nicotiana benthamiana*. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 62, n. 1, p. 20-22, 1978.

CITOVSKY, V. et al. Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta. **Journal of Molecular Biology**, Washington, v. 362, n. 5, p. 1120-1131, Oct. 2006.

CITOVSKY, V.; GAFNI, Y.; TZFIRA, T. Localizing protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation in planta. **Methods**, San Diego, v. 45, n. 3, p. 196-206, July 2008.

COHEN, L.; MANION, L.; MORRISON, K. **Research methods in education**. 5th ed. London: Routledge Falmer, 2000. 656 p.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**: safra de café 2013/2014: segundo levantamento: maio de 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_05_20_08_49_17_boletim_maio-2014.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2014.

CORMACK, B. P.; VALDIVIA, R. H.; FALKOW, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene**, Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 33-38, 1996.

CUBITT, A. B. et al. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Trends in Biochemical Science**, Amsterdam, v. 20, n. 11, p. 448-455, Nov. 1995.

CURTIS, M. D.; GROSSNIKLAUS, U. A gateway cloning vector set for highthroughput functional analysis of genes in planta. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 2, p. 462-469, Oct. 2003.

CRAMERI, A. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. **Nature Biotechnology**, London, v. 14, n. 3, p. 315-319, Mar. 1996.

CRUZ, S. S. et al. Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 13, p. 6286-6290, June 1996.

DIETZGEN, R. G. et al. Dichorhavirus: a proposed new genus for Brevipalpusmite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. **Archives of Virology**, New York, v. 159, n. 3, p. 607-619, Mar. 2014.

DIETZGEN, R. G. et al. In planta localization and interactions of Impatiens necrotic spot tospovirus proteins. **The Journal of General Virology**, London, v. 93, n. 11, p. 2490-2495, Nov. 2012.

DIETZGEN, R. G. et al. Virus taxonomy. In: INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 19., 2011, San Diego. **Proceedings...** San Diego: Elsevier, 2011. p. 654-681.

DUNOYER, P. et al. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. **Plant Journal**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 555-567, Mar. 2002.

EARLEY, K. W. et al. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. **Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 616-629, Feb. 2006.

EBERL, D. F.; DUYK, G. M.; PERRIMON, N. A genetic screen for mutations that disrupt an auditory response in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 26, p. 4837-14842, 1997.

ESCOBAR, N. M. et al. HIGH-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 7, p. 1507-1523, July 2003.

FAVARIN, J. L. et al. Quality of coffee drink from fruits submitted to different post-harvest management practices. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 187-192, fev. 2004.

FERNÃO A. M. A. **Arquitetura do café**. Campinas: UNICAMP; São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2004. 296 p.

FIGUEIRA, A. R. A mancha anelar do cafeeiro causada pelo *Coffee ringspot virus* (CoRSV) em Minas Gerais. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA. **Manejo fitossanitário da cultura do cafeeiro**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. p. 127-139.

FIGUEIRA, A. R. et al. Coffee ringspot virus is becoming a real problem to Brazilian coffee growers. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF VIROLOGY, 10., 1996, Jerusalem. **Proceedings...** Jerusalem: ICV, 1996. p. 203.

FIGUEIRA, A. R. et al. Vírus da mancha anular do cafeeiro tem causado prejuízos relevantes aos cafeicultores da região do Alto Paranaíba. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 299, 1995. Resumo.

FIGUEIRA, A. R.; PASETO, L. A.; CARVALHO, C. M. A disseminação do vírus da mancha anular do cafeeiro tem aumentado acima das expectativas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 317, 1998. Resumo.

GOODIN, M. M. et al. Interactions and nuclear import of the N and P proteins of sonchus yellow net virus, a plant nucleo rhabdo virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 1, p. 9393-9406, June 2001.

GOODIN, M. M. et al. Live-cell imaging of rhabdovirus-induced morphological changes in plant nuclear membranes. **Molecular Plant-Microbe Interact**, Saint Paul, v. 18, n. 7, p. 703-709, July 2005.

GOODIN, M. M. et al. Membrane and protein dynamics in live plant nuclei infected with *Sonchus* yellow net virus, a plant-adapted rhabdovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 88, n. 6, p. 1810-1820, June 2007a.

GOODIN, M. M. et al. New gateways to discovery. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 145, p. 1100-1109, Dec. 2007b.

GOODIN, M. M. et al. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions: review. **Molecular Plant-Microbe Interact**, Saint Paul, v. 21, n. 8, p. 1015-1026, 2008.

GOODIN, M. M. et al. pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 375-383, Aug. 2002.

GUO, Z.; DRIVER, I.; OHLSTEIN, B. Injury-induced BMP signaling negatively regulates *Drosophila* midgut homeostasis. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 201, n. 6, p. 945-961, 2013.

HASELOFF, J. et al. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 6, p. 2122-2127, Mar. 1997.

HEIM, R.; CUBITT, A. B.; TSIEN, R. Y. Improved green fluorescence. **Nature**, London, v. 373, p. 663-664, Feb. 1995.

HEIM, R.; TSIEN, R. Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. **Current Biology**, London, v. 6, n. 2, p. 178-182, Feb. 1996.

HILLMAN, B. I. et al. Structure of the gene encoding the M1 protein of *sonchus* yellow net virus. **Virology**, London, v. 179, n. 1, p. 201-207, Nov. 1990.

HILSON, P. et al. Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 14, n. 10B, p. 2176-2189, Oct. 2004.

HILSON, P.; SMALL, I.; KUIPER, M. T. European consortia building integrated resources for Arabidopsis functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 426-429, Oct. 2003.

HU, C. D.; CHINENOV, Y.; KERPPOLA, T. K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 9, n. 4, p. 789-798, Apr. 2002.

HUANG, Y. W. et al. Identification of a movement protein of rice yellow stunt rhabdovirus. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 4, p. 2108-2114, Feb. 2005.

JACKSON, A. O. et al. Biology of plant rhabdoviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 623-660, 2005.

JULIATTI, F. C. et al. Mancha anular do cafeeiro: etiologia viral e danos em lavouras da região de araguari-MG. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 337, 1995. Resumo. Suplemento.

KARRAN, R.; SANFAÇON, H. Tomato ringspot virus coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 27, n. 9, p. 933-943, Sept. 2014.

KING, A. M. Q. et al. **Virus taxonomy**: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. New York: Elsevier, 2011. 1338 p.

KITAJIMA, E. E.; COSTA, A. S. Partículas baciliformes associadas à mancha anular do cafeeiro. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 24, p. 542-545, 1972.

KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. M. Viral diseases of coffee. In: WINTGENS, J. N. (Ed.). **Coffee**: growing, processing, sustainable production. 2nd ed. Wienheim: Wiley-VCH, 2009. p. 550-556.

KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. M.; RODRIGUES, J. C. Brevipalpus-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1/3, p. 135-160, 2003.

KODAMA, Y.; HU, C. D. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. **BioTechniques**, Natick, v. 53, n. 5, p. 285-298, Nov. 2012.

KONDO, H. et al. Orchid fleck virus structural proteins N and P form intranuclear viroplasm-like structures in the absence of viral infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, n. 13, p. 7423-7434, July 2013.

KUMAGAI, M. H. et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 5, p. 1679-1683, 1995.

LUCAS, W. J. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. **Virology**, London, v. 344, n. 1, p. 169-184, Jan. 2006.

LUO, Z. L.; FANG, R. X. Structure analysis of the rice yellow stunt rhabdovirus glycoprotein gene and its mRNA. **Archives of Virology**, New York, v. 143, n. 12, p. 2453-2459, 1998.

MARTIN, K. et al. Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 150-162, July 2009.

MARTIN, K. M. et al. Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus protein localization and interaction map and comparison with nucleorhabdoviruses. **The Journal of General Virology**, London, v. 93, n. 4, p. 906-914, Apr. 2012.

MÁS, P. et al. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. **Nature**, London, v. 408, n. 6809, p. 207-211, Nov. 2000.

MATZ, M. V. et al. Fluorescent proteins from non bioluminescent Anthozoa species. **Nature Biotechnology**, London, v. 17, n. 10, p. 969-973, Oct. 1999.

MIN, B. E. et al. A host-factor interaction and localization map for a plant-adapted rhabdovirus implicates cytoplasm-tethered transcription activators in cell-to-cell movement. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 23, n. 11, p. 1420-1432, Nov. 2010.

MIYAWAKI, A. et al. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. **Nature**, London, v. 388, n. 6645, p. 882-887, 1997.

MONTERO-ASTÚA, M. et al. Disruption of vector transmission by a plant-expressed viral glycoprotein. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 27, n. 3, p. 296-304, Mar. 2014.

MORELL, M. et al. Detection of transient protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation: the Abl-SH3 case. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, n. 7, p. 1023-1036, Apr. 2007.

NAGAI, T. et al. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. **Nature Biotechnology**, London, v. 20, n. 1, p. 87-90, Jan. 2002.

OHAD, N.; SHICHRUR, K.; YALOVSKY, S. The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 145, n. 4, p. 1090-1099, Dec. 2007.

REDINBAUGH, M. G.; HOGENHOUT, S. A. Plant rhabdoviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, n. 292, p. 143-163, 2005.

REIS, P. R.; SOUSA, E. O. Seletividade de chlorfenapyr e fenbutatin-oxide sobre duas espécies de ácaros predadores (Acarica: Phytoseiidae) em citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 584-588, 2001.

REVILL, P. et al. Taro vein chlorosis virus: characterization and variability of a new nucleorhabdovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 86, n. 2, p. 491-99, Feb. 2005.

ROBIDA, A. M.; KERPPOLA, T. K. Bimolecular fluorescence complementation analysis of inducible protein interactions: effects of factors affecting protein folding on fluorescent protein fragment association. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 394, n. 3, p. 391-409, Dec. 2009.

RODRIGUES, J. C. V. et al. Occurrence of coffee ringspot virus, a *Brevipalpus* mite-borne virus in coffee in Costa Rica, Central América. **Plant Disease**, Quebec, v. 86, n. 5, p. 564-570, 2002.

RODRIGUES, J. C. V.; NOGUEIRA, N. L. Ocorrência de mancha anular do cafeeiro no Estado do Paraná e sobrevivência a geadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 513, 2001. Suplemento.

RUIZ, M. F. et al. Biochemical and functional analysis of *Drosophila-sciara* chimeric sex-lethal proteins. **Plos One**, San Francisco, June 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0065171>>. Acesso em: 10 maio 2014.

RUIZ, M. T.; VOINET, O.; BAULCOMBE, D. C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 6, p. 937-946, June 1998.

SCHOB, H.; KUNZ, C.; MEINS JUNIOR, F. Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 256, n. 5, p. 581-585, Nov. 1997.

SCHOLZ, H. et al. Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. **Neuron**, Maryland, v. 28, n. 1, p. 261-271, 2000.

SIEMERING, K. R. et al. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. **Current Biology**, London, v. 6, n. 12, p. 1653-1663, Dec. 1996.

SILVIA, C. F.; CORTEZ, J. G. A qualidade do café no Brasil: Histórico e perspectivas. **Caderno de Ciências e Tecnologia da Embrapa**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 63-98, 1998.

STEPHAN, R. et al. Membrane-targeted WAVE mediates photoreceptor axon targeting in the absence of the WAVE complex in *Drosophila*. **Molecular Biology of the Cell**, San Francisco, v. 22, n. 21, p. 4079-4092, 2011.

STEWART JUNIOR, C. N. Go with the glow: fluorescent proteins to light transgenic organisms. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 155-162, Apr. 2006.

STOKES, J. L. **Discoveries in Australia:** with an account of the coasts and rivers explored and surveyed during the voyage of H. M. S. *Beagle*, in the years 1837-38-39-40-41-42-43. London: W. Boone, 1846. 2 v.

THOMAS, C. L. et al. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *N. benthamiana* using a *Potato virus X* vector. **Plant Journal**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 417-425, Feb. 2001.

TORDO, N. et al. Family *Rhabdoviridae*. In: FAUQUET, C. M. et al. (Ed.). **Virus taxonomy**. London: Elsevier; Academic, 2005. p. 623-644.

TSAI, C. H. et al. Complete genome sequence and in planta subcellular localization of maize fine streak virus proteins. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 9, p. 5304-5314, May 2005.

TZVI, T. et al. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, n. 4, p. 503-516, Mar. 2005.

VENTURA, J. A. et al. Diagnóstico e manejo das doenças do cafeeiro Conilon (*Coffea canephora*). In: FERRÃO, R. G. et al. (Ed.). **Café Conilon**. Vitória: INCAPER, 2007. p. 453-497.

VOINNET, O. et al. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of *Tomato bushy stunt virus*. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 949-956, Mar. 2003.

WAGNER, J. D.; CHOI, T. J.; JACKSON, A. O. Extraction of nuclei from sonchus yellow net rhabdovirus-infected plants yields a polymerase that synthesizes viral mRNAs and polyadenylated plus-strand leader RNA. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 468-477, Jan. 1996.

WALHOUT, A. J. M. et al. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 328, n. 11, p. 575-592, 2000.

WALKER, P. J. et al. Rhabdovirus accessory genes. **Virus Research**, Amsterdam, v. 162, n. 1/2, p. 110-125, Dec. 2011.

WETZEL, T.; DIETZGEN, R. G.; DALE, J. L. Genomic organization of lettuce necrotic yellows rhabdovirus. **Virology**, London, v. 200, n. 2, p. 401-412, May 1994.

YARBROUGH, D. et al. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0 Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 2, p. 462-467, Jan. 2001.

YU, Y.; LUTZ, S. Circular permutation: a different way to engineer enzyme structure and function. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 18-25, Jan. 2011.

ZHANG, J. et al. Creating new fluorescent probes for cell biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 3, n. 12, p. 906-918, Dec. 2002.

CAPITULO 2 Localização subcelular das proteínas do *Coffea ringspot virus*

RESUMO

Embora cultivado comercialmente na maioria dos países tropicais e subtropicais, a oferta mundial de café (*Coffea arabica*) é dominada pelo Brasil, que produz 35% das exportações mundiais. Desta forma, a emergência do *Coffea ringspot virus* (CoRSV), transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*, torna-se uma preocupação relevante. O CoRSV foi descrito pela primeira vez no estado de São Paulo, em 1938 e está, provisoriamente, classificado como membro da família *Rhabdoviridae*, gênero *Nucleorhabdovirus*. O genoma do CoRSV é bipartido e de polaridade negativa, visto que o RNA 1 é composto por cinco ORFs (open read frames): ORF1, nucleocapsídeo (N); ORF2, fosfoproteína (P); ORF3, proteína do movimento (3); ORF 4, proteína matriz (M) e ORF 5, glicoproteína (G). O RNA 2 codifica uma única proteína, RNA dependente da RNA polimerase (L). A localização subcelular de proteínas virais é, frequentemente, difícil de determinar com base em métodos *in silico*. Portanto, no presente estudo, foi utilizada uma estratégia para a localização de proteínas, empregando-se a expressão transitória mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, de proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes (GFP ou RFP) em plantas de *Nicotiana benthamiana* que possuem marcadores subcelulares. As cinco proteínas codificadas pelo RNA1 do CoRSV foram fusionadas às proteínas GFP ou RFP e expressas em *N. benthamiana* transgênicas que possuem um marcador nuclear vermelho. Análises de microscopia confocal demonstraram que a fusão GFP-N foi expressa no citoplasma e no núcleo. Em contraste, GFP-P foi expressa, exclusivamente, no núcleo. Consistente com a função prevista da proteína 3, que é o movimento célula a célula, a fusão GFP-3 acumulou-se, predominantemente, na periferia das células. GFP-M acumulou-se no núcleo e, também, pode ser detectada em regiões agregadas no citoplasma. GFP-G se localizou no envelope nuclear e em menor concentração nas membranas perinucleares. Quando as proteínas N e P foram expressas, simultaneamente, a proteína N foi capaz de re-localizar a proteína P do núcleo para o citoplasma. O caráter nucleofílico das proteínas N, P, M e G são consistentes com as suas funções previstas de formação do viroplasma e morfogênese viral. Este estudo fornece importantes informações para as funções preditas e localização das proteínas do CoRSV.

Palavras-chave: *Rhabdovirus*. *Nucleorhabdovirus*. Proteínas fluorescentes. Agroinfiltração. Agrotransformação

ABSTRACT

Grown commercially in most tropical and subtropical countries, the world supply of coffee (*Coffea arabica*) is dominated by Brazil, which produces 35% of the global exports. As such, the emergence of *Coffee ringspot* virus (CoRSV), which is transmitted by the false spider mite *Brevipalpusphoenicis*, is of critical concern. CoRSV was first described in Sao Paulo state in 1938 and is tentatively classified as a member of *Rhabdoviridae* family, genus *Nucleorhabdovirus*. The CoRSV genome consists of bipartite RNAs with negative-sense polarity. The RNA1 is composed by five Open Reading Frames: ORF1, nucleocapsid protein (N); ORF 2, phosphoprotein (P); ORF 3, viral cell-to-cell movement protein (3); ORF 4 matrix protein (M) and ORF 5, glycoprotein (G). The RNA2 encodes a single protein, RNA dependent RNA polymerase (L). Subcellular localization of viral proteins is frequently difficult to determine strictly from *in silico* methods. Therefore, in this study an established strategy for protein localization was employed, using an Agrobacterium-mediated transient expression of fluorescent protein fusions in transgenic *Nicotiana benthamiana* lines that express subcellular markers. The five proteins encoded by the ORFs of RNA 1 were expressed as carboxy-terminal fusions to GFP in transgenic plants expressing a red nuclear marker. An analysis with a confocal microscope showed that GFP-N fusion was detected at a steady state in both the nucleus and the cytoplasm. In marked contrast, the GFP-P fusion was localized exclusively in the nucleus. Consistent with a predicted cell-to-cell movement protein function, the GFP-3 fusion accumulated predominantly at the cell periphery. GFP-M accumulated into the nucleus but could also be found as cytoplasmic aggregates. GFP-G was targeted to the nuclear envelope and to a lesser extent, the perinuclear membranes. Taken together, the nucleophilic character of the proteins encoded by proteins N, P, M and G are consistent with their predicted roles in viroplasm formation and viral morphogenesis. This study gives important information and provides resources to a function prediction and localization of CoRSV proteins.

Keywords: *Rhabdovirus*. *Nucleorhabdovirus*. Fluorescent proteins. Agroinfiltration. Agrotransformation.

1 INTRODUÇÃO

O café (*Coffe arábica*) é a segunda maior commodity mundial, sendo superado em valor apenas pelo petróleo. Seu cultivo, processamento, comercialização, transporte e mercado proporcionam milhões de empregos em todo o mundo. O Brasil é o principal país produtor e exportador de café, contribuindo com 35% da produção mundial. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor do Brasil, seguido pelos estados do Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná e Rondônia (COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

Fatores como as doenças podem reduzir a produtividade e a qualidade da bebida, tornando o produto com baixo valor comercial. Três vírus já foram encontrados infectando plantas de café: *Coffee ringspot vírus* (CoRSV), *Coffee chlorotic ringspot calimovirus* (CoCRSV) e o Emaravírus, uma virose recentemente reportada em cafezais no Hawái (BITANCOURT, 1938; OCAMPO; MARTINEZ; LEGUIZAMON, 2003). O CoRSV é causador da doença conhecida popularmente como mancha anular do cafeeiro e a virose foi descrita pela primeira vez em 1938, na cidade de Caçapava, São Paulo (BITANCOURT, 1938). Atualmente o vírus é encontrado nos principais estados produtores do Brasil (FIGUEIRA et al., 1995; KITAJIMA; CHAGAS, 2009; NOGUEIRA et al., 2000) e, também, foi relatado na Costa Rica em 2002 (RODRIGUES et al., 2002).

O CoRSV é transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* e é classificado como pertencente à família *Rhabdoviridae*, gênero *Nucleorhabdovirus*, baseado no sítio de replicação e morfogênese da partícula. O vírus da mancha anular do cafeeiro pode induzir sintomas nas folhas, nos frutos e até nos ramos novos das plantas de café. Esses sintomas em geral são caracterizados por manchas cloróticas, geralmente em forma de anéis

concêntricos ou irregulares, que podem apresentar lesões deprimidas. O genoma do CoRSV é bipartido e de polaridade negativa. O RNA 1 possui 6.552 nt e codifica cinco proteínas: Nucleocapsídio (N), fosfoproteína (P), proteína do movimento (3), proteína matriz (M) e glicoproteína (G). O RNA 2 possui 5.945 nt e codifica a proteína RNA dependente da RNA polimerase (L) (GenBank KF812525.1 e KF 812526.1). O CoRSV teve o genoma completamente sequenciado recentemente, mas pouco se sabe a respeito da localização e função dessas proteínas.

Mapas de localização de proteínas virais (PILMs) já foram realizados para *Rhabdovirus*, como, por exemplo, *Potato yellow dwarf virus* (PYDV) (BANDYOPADHYAY et al., 2010), *Sonchus yellow net virus* (SYNV) (GOODIN et al., 2001) e, parcialmente, para o *Orchid fleck virus* (OFV) (KONDO et al., 2013). Eles dão suporte para a caracterização das proteínas virais, além de permitir um estudo da interação das proteínas com os fatores da hospedeira. Assim sendo, a construção de um PILM para o CoRSV é considerado fundamental para uma maior compreensão do seu genoma.

Neste estudo, as proteínas do CoRSV foram clonadas no vetor pDONR221 (Invitrogen), combinadas com o vetor binário pSITE-2NB, fusionado à *Green Fluorescent Protein* (GFP), ou pSITE-4CA, fusionado à *Red fluorescent Protein* (RFP) e expressas via *Agrobacterium tumefaciens* em plantas de *Nicotiana benthamiana* que possuem um marcador nuclear (GOODIN et al., 2007; MARTIN et al., 2009), com posterior análise ao microscópio confocal. Os resultados obtidos foram empregados para determinar a localização, no ambiente celular, das cinco proteínas que compõe o RNA1 do CoRSV.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Virologia Vegetal, no departamento de Fitopatologia da University of Kentucky (USA) e no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras.

2.2 Manutenção do vírus e plantas

Todas as plantas, incluindo as linhagens de plantas transgênicas, foram mantidas em casa de vegetação em ambiente controlado na Universidade de Kentucky. CoRSV-Lavras (APHIS permit P526P-12-04085) foi mantido por inoculações mecânicas consecutivas em *Chenopodium quinoa*, mantidas em câmara de crescimento à temperatura controlada de 28°C por 10 dias e, posteriormente, reconduzidas para a casa de vegetação.

Para a determinação da localização das proteínas virais fusionadas à GFP, foram utilizadas plantas de *N. benthamiana* transgênicas, que expressam RFP fusionada à histona 2b, fazendo com que essa fosse direcionada para o núcleo, tornando-o fluorescente. Isso permitiu o monitoramento da posição da proteína viral em relação ao núcleo, aumentando, assim, a precisão da análise da localização das proteínas virais nas células.

2.3 Extração do RNA total e RT-PCR

O RNA total foi extraído de plantas de *Chenopodium quinoa* infectadas com o CoRSV, utilizando Qiagen RNeasy Plant minikit, segundo as instruções

do fabricante (Quiagen). A síntese do cDNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas utilizando a enzima transcriptase reverse Superscript III (Invitrogen) e a enzima DNA polimerase Phusion high fidelity (Finnzymes). Para cada proteína do CoRSV estudada, foi desenhado um par de *primers* específico (Tabela 1) para amplificar exatamente o gene referente a cada proteína. As proteínas estudadas foram: nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), proteína do movimento (3), proteína matriz (M) e glicoproteína (G).

Tabela 1 Sequência de *primers* desenhados para amplificar as proteínas do CoRSV ligado à sequência att (em negrito e letra maiúscula) que são os adaptadores específicos para o “entry clone” do sistema Gateway

Nome do primer	Sequencia de nucleotídeos att e dos <i>primers</i>
att L1 – N - forward	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGGCTTCatggctaggtatcggatggtgat
att L2 – N - reverse	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTCTcttftgaaccatgctgctctagtgcca
att L1 – P - forward	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGGCTTCatggccaacataggtaccctctgcc
att L2 – P - reverse	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTCTgtccaaacatctctcttcttcttgt
att L1 - 3 - forward	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGGCTTCatgtccacattgccacctcagt
att L2 – 3 - reverse	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTCCacatatgtfgggctcttagcccc
att L1 – M - forward	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGGCTTCatgrcatccagctccgggaagttc
att L2 – M - reverse	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTCCaccactggatcggggggttgggg
att L1 – G - forward	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGGCTTCatgagaggtatcgtcgttgatatac
att L2 – G - reverse	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTCTcttctgtggcccatgccaactag

2.4 Reação de recombinação da Bp clonase

A reação de recombinação da Bp clonase constituiu-se de: 5µl do produto linearizado (att-PCR), 2 µl do vetor pDONR221, 4 µl do tampão de reação 5x Te Buffer da BP clonase e 2µl da enzima Bp Clonase. Após ser mantida por 1 hora à temperatura ambiente, foram adicionados 2 µl de Proteinase K (2 µg/µl), e a reação foi, novamente, incubada a 37°C por 10 minutos antes da transformação em célula competente *E. coli Omnimax* (Invitrogen). Essa transformação foi efetuada pelo método de choque térmico: inicialmente 5µl da reação da Bp clonase foram adicionadas a 50µl das células de *Omnimax* e estas foram incubadas em gelo durante 30 min. Em seguida essas foram colocadas a 42°C por 45 segundos e, novamente, transferidas para o gelo por 5 minutos. Finalmente foram adicionados 1000 µL de meio LB líquido, e as células foram incubadas a 37°C durante 1 h com agitação a 150 – 200 rpm. As células foram, então, espalhadas em placas com meio LB sólido suplementado com Kanamicina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C durante 12 - 16 h.

As colônias bacterianas transformadas foram submetidas à reação de RT-PCR, utilizando a enzima AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems) e, posteriormente, sequenciadas, para confirmação da presença do fragmento desejado. As colônias que continham o fragmento genômico desejado foram multiplicadas em meio LB líquido a 37°C overnight. A extração do DNA plasmidial foi feita utilizando-se o kit GeneJet Plasmid (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante.

2.4.1 Reação de recombinação da LR clonase

Em um tubo de 1,5 ml foram adicionados 5µl de água ultrapura, 1,5 µl do entry clone (derivado da reação da PB clonase), 1,5µl do pSITE-2NB (GFP)

ou pSITE-4CA (RFP) (GOODIN et al., 2007) e por fim 1,5 µl da enzima LR clonase (Invitrogen). As proteínas N, P, M, 3 e G foram fusionadas ao GFP e a proteína P, também, foi fusionada ao RFP, para o estudo de coexpressão com a proteína N. Após manutenção à temperatura ambiente por 1 hora, foram adicionados 2 µl de Proteinase K (2 µg/µl), seguido por incubação a 37°C por 10 minutos e transformação em célula competente *E. coli Omnimax* (Invitrogen), conforme já descrito posteriormente. Os antibióticos utilizados para seleção das bactérias transformadas foram: estreptomicina (100 µg/ml) e espectromicina (100 µg/ml).

2.5 Procedimentos para agrotransformação

Os vetores binários recombinantes foram, então, utilizados para transformar a *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404, utilizando o método de “congelamento e descongelamento”: 5 µl de plasmídeo (derivado da reação da LR clonase) foram incubadas com 100 µl de suspensão de *Agrobacterium*, em 10 mM de CaCl₂. Esta mistura foi, então, congelada em nitrogênio líquido por cinco segundos e submetida a choque térmico a 37° C, durante cinco minutos e, em seguida, incubadas a 28 ° C, durante 2 horas, seguida da adição de 1 ml de meio LB líquido. As bactérias foram, então, precipitadas por centrifugação e plaqueadas em meio LB ágar, contendo antibióticos de seleção, estreptomicina (100 µg/ml), espectromicina (100 µg/ml) e rifampicina (100 µg/ml).

2.6 Procedimentos para agroinfiltração

Plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana*, que expressam RFP no núcleo (CHAKRABARTY et al., 2007), foram mantidas à temperatura média de

22° C com ciclo de 16 horas luz e 8 horas de escuro. Para cada proteína do CoRSV expressa, foram utilizadas três plantas e duas folhas de cada planta, foram infiltradas com colônias frescas (2-3 dias de idade) de *A. tumefaciens* transformadas conforme descrito acima. Antes da infiltração, a concentração dessas colônias foi ajustada para um OD600 de 0,6 em tampão MES (10 mM de MgCl₂, 10 mM de MES, pH 5,6) contendo acetosyringone (150 mM), e a suspensão bacteriana foi mantida à temperatura ambiente durante 2-3 h. As infiltrações foram realizadas no meio da folha, por suave pressão com uma seringa descartável de 1 ml na superfície inferior das folhas expandidas, com cerca de 2,5 cm de largura. Uma quantidade suficiente da suspensão bacteriana foi utilizada para infiltrar completamente as folhas, até se observar uma aparência de encharcamento. Geralmente, 1-4 pontos por folha foram infiltrados, para o seu completo encharcamento. Essas infiltrações foram feitas com uma proteína de cada vez e, também, com as proteínas N e P juntas, para verificar se haveria mudança no padrão de localização. Depois da agroinfiltração, as plantas foram mantidas em laboratório sob luz fluorescente contínua, durante pelo menos 24-48 h, por até cinco dias. As folhas foram examinadas em microscópio de fluorescência cerca de 40 a 90 h pós-infiltração.

2.7 Microscopia confocal de varredura a laser

A microscopia confocal foi realizada utilizando o microscópio confocal de varredura a laser Olympus FV1000 com lasers de hélio/neon, multilinha de argônio e diodo sólido, localizado no departamento de Fitopatologia da Universidade de Kentucky. A proteína GFP foi excitada a 488 nm e a TagRFP a 543 nm. Este microscópio é capaz de detectar os três canais de comprimento de onda utilizando controles múltiplos e definições dos lasers. Pelo menos três imagens com boa resolução para cada proteína expressada foram geradas e

capturadas em sequência utilizando o software Olympus FluoView. Antes da observação ao microscópio, secções de tecido de folha com 0,5 x 0,5 cm foram cortadas, colocadas em uma lâmina de vidro, sobre uma gota de água destilada e cobertas com uma lamínula. As Micrografias foram obtidas usando lentes 40X/0.9NA com objetiva de imersão em água.

3 RESULTADOS

3.1 Construção do mapa de localização para as proteínas do *Coffee ringspot* vírus

A localização das proteínas do CoRSV fusionadas ao GFP, em plantas de *N. benthamiana* que expressam o núcleo com RFP, está discriminada na figura 1. Nos experimentos realizados, as três plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com cada proteína apresentaram o mesmo padrão de localização, quando analisadas em microscopia eletrônica.

A fusão GFP com a proteína do nucleocapsídeo ou N-GFP (~77kDa) foi detectada no núcleo e no citoplasma, em padrão indistinguível do GFP sozinho, apesar do fato desta fusão ser maior do que o tamanho limite para o complexo do poro nuclear nas plantas (Figura 3- painéis 1A-F vs 7A-F). Em contraste, a fusão fosfoproteína-GFP (P-GFP) localizou-se, exclusivamente, no núcleo (Figura 3, painel 2 A-F). Corroborando a função predita para a proteína de movimento, que atua na translocação célula a célula, a fusão proteína 3-GFP acumulou-se, predominantemente, em toda a periferia da célula (Figura 3, painel 3 A-F). Por outro lado, a M-GFP acumulou-se, não apenas no núcleo, mas também em regiões agregadas no citoplasma (Figura 3, painel 5 A-F). Finalmente, a Glicoproteína-GFP (G-GFP) foi encontrada no envelope nuclear, e com menor frequência, nas membranas perinucleares (Figura 3, painel 6 A-F).

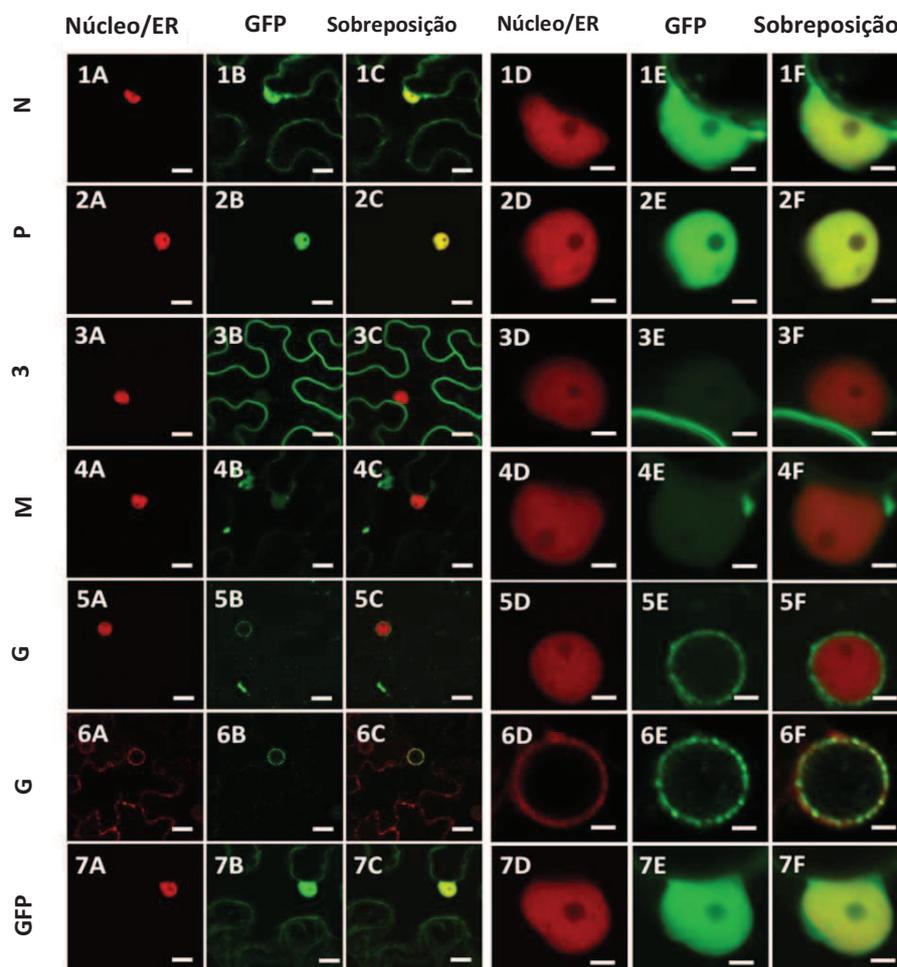


Figura 3 Imagens obtidas por microscopia confocal das proteínas do CoRSV fusionadas ao GFP, expressas por agroinfiltração em folhas de *N. benthamiana* transgênicas que expressam RFP fusionadas à histona 2B (marcador nuclear)

Legenda: Imagem celular (painéis A-C, escala = 10 µm) ou nuclear (painéis D-F, escala = 2 µm). Imagens de fluorescência do RFP, do GFP e sobreposição, também, foram observadas. **1A-F.** CoRSV N-GFP. **2A-F** CoRSV P-GFP. **3A-F** CoRSV 3-GFP. **4A-F.** CoRSV M-GFP. **5A-F** CoRSV G-GFP. **6A-F** CoRSV G-GFP agroinfiltrada em plantas que expressam RFP no retículo endoplasmático. **7A-F.** GFP. As imagens foram adquiridas dois dias após a agroinfiltração. Escala = 10 µm (painéis A-C) ou 2 µm (painéis D-F).

3.2 Estudo da realocização das proteínas N e P do *Coffee ringspot vírus*

Os experimentos realizados, para investigar o padrão diferencial da localização da proteína N e P, fazendo a sua expressão independente ou em conjunto, mostraram que a coexpressão destas duas proteínas resultou na relocalização da proteína P para o citoplasma, apesar de ser observada apenas no núcleo, quando expressa sozinha (Figura 4, painéis 1,2 e 3A-C).

Os controles experimentais confirmam que essa realocização foi inteiramente dependente da presença da proteína N, pois nem o GFP ou RFP influenciaram na localização da proteína P (Figura 4, painéis 4-6 A-C).

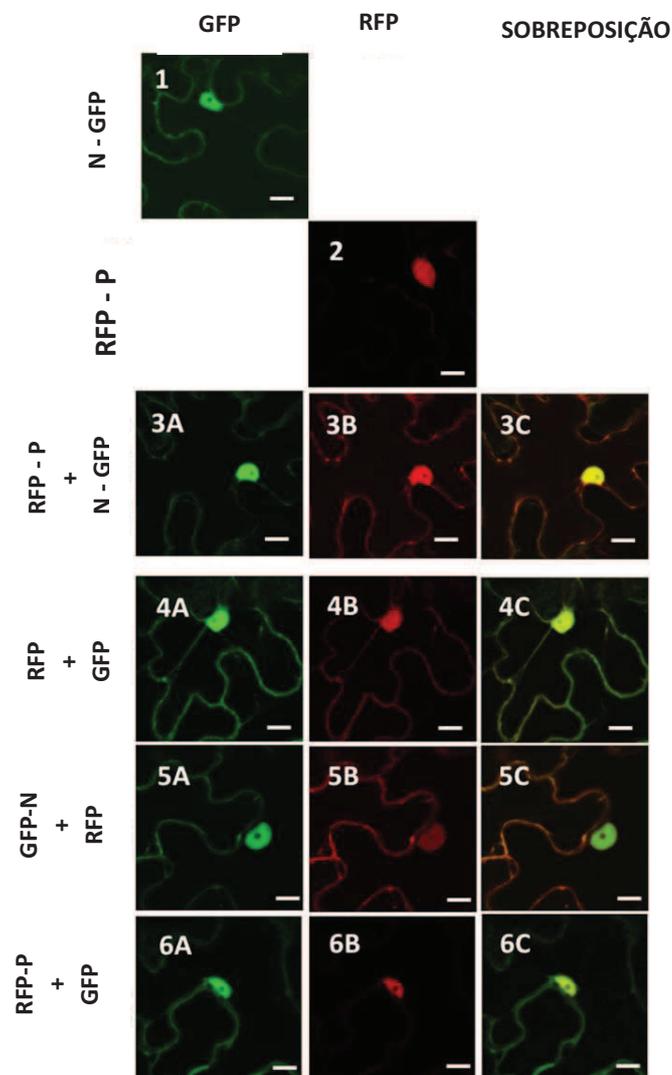


Figura 4 Imagens obtidas ao microscópio confocal das proteínas do CoRSV fusionadas a GFP ou RFP, expressas por agroinfiltração nas células epidérmicas de *N. benthamiana* (tipo selvagem)

Legenda: Imagem das células infiltradas com proteínas fusionadas ao GFP (A), RFP (B) e sobreposição das imagens (C), respectivamente. **1A.** CoRSV N-GFP. **2A.** CoRSV RFP-P. **3A-C.** CoRSV N-GFP e CoRSV RFP-P. **4A-C.** GFP e RFP. **5A-C.** CoRSV N-GFP e RFP. **6A-C.** GFP e CoRSV RFP-P. As imagens foram obtidas 2 dias após a agroinfiltração. Escala 10 μ m.

4 DISCUSSÃO

A localização subcelular de proteínas virais que possuem o RNA de sentido negativo é, frequentemente, difícil de ser determinado por métodos *in silico* (BANDYOPADHYAY et al., 2010). Portanto, no presente trabalho, foi utilizada a estratégia de localização de proteínas, mediada por *Agrobacterium*, por meio da expressão de proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes em linhagens transgênicas de *Nicotiana benthamiana*, que expressam marcadores subcelulares. Como o primeiro passo do estudo das proteínas sintetizadas pelo RNA 1 (3' N-P-3-M-G 5') do *Coffee ringspot vírus*, as proteínas foram fusionadas ao GFP e expressas em plantas que possuem o núcleo marcado com RFP.

Dessa forma, foram geradas informações básicas que dão suporte ao estudo e caracterização das proteínas do *Coffee ringspot vírus* (CoRSV), além de contribuir para o conhecimento específico desta virose emergente, que tem sido uma ameaça à produção e qualidade do café.

A proteína do nucleocapsídeo (N) tem a função de encapsidação do RNA genômico, além de ser um dos componentes de formação do viroplasma e atuar em conjunto com a polimerase (L). A proteína N do CoRSV, apesar de não apresentar as regiões previstas para sinalização de localização nuclear (NLS) (nº acesso no GenBank KF812525.1), localizou-se no núcleo e, também, no citoplasma. Por outro lado, esta proteína possui duas regiões previstas para sinalização de exportação nuclear (NES), que, possivelmente, atua no transporte desta proteína para fora do núcleo. Diferentemente da proteína N do CoRSV, a mesma proteína do *Orchid fleck vírus* (OFV), que apresentou a maior identidade com esse vírus, está localizada apenas no citoplasma (KONDO et al., 2013). Porém, as proteínas N do *Potato yellow dwarf vírus* (PYDV) e do *Sunchus yellow net vírus* (SYNV) estão presentes apenas no núcleo (BANDYOPADHYAY et al., 2010; JACKSON et al., 2005).

A fosfoproteína nos *Rhabdovirus* age como fator transcricional, quando associada com a proteína da polimerase (L) e, também, atua em conjunto com a proteína N para formação do viroplasma. A proteína P do CoRSV concentrou-se no núcleo celular, assim como a proteína P do OFV e do PYDV (BANDYOPADHYAY et al., 2010; KONDO et al., 2013). Tal proteína apresentou duas regiões preditas para NLS (nº acesso no GenBank KF812525.1).

A proteína 3 se localizou na membrana celular, consistentemente com a sua função, que é ligada ao movimento do vírus célula a célula. Tal padrão de localização, também, foi identificado para as proteínas PVDV-Y, MFSV-3p e SYN-4, que, também, são consideradas mediadoras da movimentação do vírus célula a célula (BANDYOPADHYAY et al., 2010).

Em *Rhabdovirus* a proteína matriz (M) tem a função de condensar a proteína N e, também, está associada com a glicoproteína (G). Em PYDV a proteína M se acumula no interior do núcleo e, também, é descrita como capaz de induzir acumulação intranuclear da membrana nuclear nas células das plantas infectadas (BANDYOPADHYAY et al., 2010). A proteína M do PYDV é detectada apenas na região nuclear, e a proteína M do CoRSV foi encontrada no núcleo e, também, em regiões agregadas no citoplasma. Tal fato se deve, possivelmente, às regiões de NLS e NES que foram preditas para a proteína matriz do CoRSV e que não foram caracterizadas para o PYDV (nº acesso no GenBank KF812525.1 (BANDYOPADHYAY et al., 2010).

Em concordância com a proteína G do PYDV, a glicoproteína do CoRSV foi detectada na membrana, em particular no envoltório nuclear (BANDYOPADHYAY et al., 2010).

A associação das proteínas do nucleocapsídeo (N) e da fosfoproteína (P) de vírus de RNA de polaridade negativa são os elementos-chaves na formação do viroplasma, que é o local de replicação viral. Como exemplo, várias

interações N/P têm sido mapeadas ou caracterizadas em diferentes intensidades (DENG et al., 2007; GOODIN et al., 2001; KONDO et al., 2013). Em adição à formação do viroplasma, os vírus que se localizam no núcleo enfrentam um desafio adicional que é a exportação do nucleocapsídeo do núcleo, com o intuito de infectar a próxima célula (CROS; PALESE, 2003; ELTON et al., 2002; MIN et al., 2010; O'NEILL; TALON; PALESE, 1998).

Neste estudo, também, foi observada a interação entre as proteínas N/P do CoRSV, indicando que todas as espécies de Rhabdovirus adaptados a plantas, estudadas até o momento, também, apresentam tal interação. A coexpressão de proteínas fusionadas a GFP e RFP permitiu a identificação de interações fracas e fortes e indicou, ainda, que a fosfoproteína, pode se realocar no citoplasma, na presença da nucleoproteína.

Trabalhos prévios demonstraram que a coexpressão de proteínas codificadas por vírus que possuem o genoma composto por RNA de sentido negativo podem alterar o padrão relativo de localização, em comparação com quando são expressas sozinhas (GOODIN et al., 2007; TSAI et al., 2005). Esta realocação tem sido, frequentemente, interpretada como envolvida no estabelecimento do viroplasma, que é o local de replicação e condensação do nucleocapsídeo (DENG et al., 2007; GHOSH et al., 2008; KONDO et al., 2013; MARTIN et al., 2012). Isso sugere um interessante modelo para o transporte do nucleocapsídeo para fora do núcleo, comprovando que as regiões preditas para NES nas proteínas P e N, são, de fato, funcionais e podem mediar o transporte do nucleocapsídeo para fora do núcleo (CROS; PALESE, 2003; MIN et al., 2010; O'NEILL et al., 1998). A associação entre N/P, também, foi caracterizada para o membro tipo da família *Rhabdoviridae*, o *Vesicular stomatitis vírus* (VSV), possivelmente, atuando no processo de replicação e transcrição viral (JACKSON et al., 2005).

O genoma completo do CoRSV foi sequenciado recentemente e as funções das proteínas foram preditas por programas computacionais. Este trabalho proporcionou o estudo de localização das proteínas do CoRSV *in planta*, tornando-se um importante suporte no auxílio de caracterização e função das proteínas, além de ser essencial para o estudo de pesquisas que visam ao controle do patógeno no campo.

5 CONCLUSÕES

- a) A proteína N (nucleocapsídeo) do CoRSV está presente no núcleo (n) e no citoplasma (c) das células das plantas agroinfiltradas.
- b) A fosfoproteína (P) do CoRSV se localiza, exclusivamente, no núcleo quando expressa sozinha.
- c) A proteína 3 do CoRSV é expressa na periferia das células (pc) de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas.
- d) A proteína M do CoRSV se acumula no núcleo e, também, no citoplasma das células.
- e) A proteína G do CoRSV está presente no envelope nuclear (en) e, também, nas membranas perinucleares (mp).
- f) Existe uma interação entre a proteína N/P, capaz de relocalizar a proteína P, do núcleo para o citoplasma.
- g) O mapa de localização das proteínas do CoRSV é:
 $N^{n,c}P^{n,pc},M^{n,c}G^{en,mp}$

REFERÊNCIAS

- BANDYOPADHYAY, A. et al. An integrated protein localization and interaction map for *Potato yellow dwarf virus*, type species of the genus Nucleorhabdovirus. **Virology**, London, v. 402, n. 1, p. 61-71, June 2010.
- BITANCOURT, A. A. A mancha anular, uma nova doença do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 4, p. 404-405, 1938.
- CHAKRABARTY, R. et al. PSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: probing *Nicotiana benthamiana*-virus interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, p. 740-750, 2007.
- COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: safra de café 2013/2014: segundo levantamento: maio de 2014.** Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_05_20_08_49_17_boletim_maio-2014.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2014.
- CROS, J. F.; PALESE, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Bornadisease viruses. **Virus Research**, Amsterdam, v. 95, n. 1/2, p. 3-12, Sept. 2003.
- DENG, M. et al. Role of the sonchus yellow net virus N protein in formation of nuclear viroplasms. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, n. 10, p. 5362-5374, May 2007.
- ELTON, D. et al. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 1, p. 408-419, Jan. 2001.
- FIGUEIRA, A. R. et al. Vírus da mancha anular do cafeeiro tem causado prejuízos relevantes aos cafeicultores da região do Alto Paranaíba. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 299, 1995. Resumo.
- GHOSH, D. et al. Cloning and sub cellular localization of the phosphoprotein and nucleocapsid proteins of *Potato yellow dwarf virus*, type species of the genus Nucleorhabdovirus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 135, n. 1, p. 26-35, July 2008.

GOODIN, M. M. et al. Interactions and nuclear import of the N and P proteins of sonchus yellow net virus, a plant nucleorhabdovirus. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 1, p. 9393-9406, June 2001.

GOODIN, M. M. et al. New gateways to discovery. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 145, p. 1100-1109, Dec. 2007.

JACKSON, A. O. et al. Biology of plant rhabdoviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 623-660, 2005.

KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. M. Viral diseases of coffee. In: WINTGENS, J. N. (Ed.). **Coffee: growing, processing, sustainable production**. 2nd ed. Wienheim: Wiley-VCH, 2009. p. 550-556.

KONDO, H. et al. Orchid fleck virus structural proteins N and P form intranuclear viroplasm-like structures in the absence of viral infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, n. 13, p. 7423-7434, July 2013.

MARTIN, K. et al. Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 150-162, July 2009.

MARTIN, K. M. et al. Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus protein localization and interaction map and comparison with nucleorhabdoviruses. **The Journal of General Virology**, London, v. 93, n. 4, p. 906-914, Apr. 2012.

MIN, B. E. et al. A host-factor interaction and localization map for a plant-adapted rhabdovirus implicates cytoplasm-tethered transcription activators in cell-to-cell movement. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 23, n. 11, p. 1420-1432, Nov. 2010.

NOGUEIRA, N. L. et al. Comprovação de infecção do *Chenopodium quinoa* por vírus da mancha anular do cafeeiro (CoRSV) através de microscopia eletrônica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 446-447, 2000. Suplemento.

OCAMPO, M. E.; MARTINEZ, G.; LEGUIZAMON, J. **Virus en café II: observaciones preliminares: los anillos cloróticos del café sobre la importancia económica**. Manizales: Universidad de Caldas, 2003. 2 p. (Fitotecnia, 81).

O'NEILL, R. E.; TALON, J.; PALESE, P. The influenza virus NP (NS2protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleo proteins. **European Molecular Biology Organization**, Heidelberg, v. 17, n. 1, p. 288-296, Jan. 1998.

RODRIGUES, J. C. V. et al. Occurence of coffee ringspot virus, a Brevipalpus mite-borne virus in coffee in Costa Rica, Central América. **Plant Disease**, Quebec, v. 86, n. 5, p. 564-570, 2002.

TSAI, C. H. et al. Complete genome sequence and in planta subcellular localization of maize fine streak virus proteins. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 9, p. 5304-5314, May 2005.

CAPITULO 3 Elaboração do mapa de interação entre as proteínas do *Coffee ringspot vírus*

RESUMO

O *Coffee ringspot virus* (CoRSV), transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*, infecta plantas de café, causando queda de folhas e de frutos e depreciando a qualidade da bebida. Considerado por muito tempo como uma doença sem importância, tem se espalhado por todos os campos produtores de café do Brasil, constituindo um problema adicional para os cafeicultores. Foi classificado como pertencente à família *Rhabdoviridae*, gênero *Nucleorhabdovirus*, com base no seu local de replicação e morfogênese. O genoma do CoRSV é organizado em 2 RNAs de sentido negativo. O RNA1 (6522 nt) codifica as proteínas do nucleocapsídeo viral (N), fosfoproteína (P), proteína do movimento célula a célula (3), proteína matriz (M) e a glicoproteína (G). O RNA2 (5945 nt) codifica uma única proteína a RNA polimerase (L). Neste estudo investigaram-se as interações entre as proteínas do CoRSV, por meio da técnica BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation), com expressão das proteínas fusionadas ao YFP em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana*, que possuem núcleo marcado com CFP. As interações foram positivas para P/P e P/M no núcleo, G/G e N/M no espaço perinuclear e N/P no nucleoplasma, formando uma inclusão com características do viroplasma. Este estudo gera importantes informações para compreensão do mecanismo de interação entre o CoRSV e a planta hospedeira.

Palavras-chave: Vírus emergente. BiFC. Interação proteica. Mapa de localização.

ABSTRACT

The *Coffee ringspot virus* (CoRSV), transmitted by the false spider mite *Brevipalpus phoenicis* infects coffee plants causing leaf and fruit drop and depreciating the quality of the drink. Long regarded as an unimportant disease, has spread all producing fields of coffee from Brazil, which is an additional problem for farmers. It is tentatively classified as belonging to the family *Rhabdoviridae*, genus *Nucleorhabdovirus*, based on their local replication and morphogenesis. The CoRSV genome is organized into two negative sense RNAs. The RNA1 (6522 nt) encodes the viral nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), movement cell-to-cell protein (3), matrix protein (M) and glycoprotein (G). The RNA2 (5945 nt) encodes a single RNA polymerase protein (L). In this study we investigated the interactions between proteins CoRSV through technical BiFC (Bimolecular Fluorescence complementation), with expression of proteins fused to YFP in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana* that have the nucleus marked with CFP. The interactions were positive for P / P and P / M in the nucleus, G/G and N/M in the perinuclear space and P / N in the nucleoplasm space, forming an enclosure with viroplasma characteristics. This study provides important information for understanding the mechanism of interaction between the CoRSV and host plant.

Keywords: Emerging virus. Bimolecular fluorescent complementation. Protein interaction.

1 INTRODUÇÃO

O *Coffee ringspot virus* (CoRSV), transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijs (CHAGAS, 1973, 1978, 1980, 2012), está associado à doença popularmente conhecida como mancha anular do cafeeiro. O vírus foi primeiramente descrito em plantas de *Coffea arabica*, no estado de São Paulo em 1938, por Bitancourt, que observou manchas cloróticas ou necróticas, usualmente formando anéis concêntricos nas folhas e nos frutos (BITANCOURT, 1938). Plantas severamente afetadas, também, mostram sintomas de anéis nos ramos jovens (FIGUEIRA, 2008).

Além do café, o CoRSV pode infectar, experimentalmente, diversas outras plantas, como, por exemplo, o *Chenopodium ambrosioides*, popularmente conhecido como Erva de Santa Maria, que é uma planta daninha, frequentemente, encontrada em cafezais. O CoRSV é classificado, provisoriamente, como pertencente ao gênero *Nucleorhabdovirus*, família *Rhabdoviridae*, em razão de características morfológicas e do local de replicação na célula do hospedeiro (ITO; SUZAKI; NAKANO, 2013; KITAJIMA; CHAGAS; RODRIGUES, 2003). Recentemente um novo gênero, o *Dicorhabdovirus*, foi proposto para agrupar os membros da família *Rhabdoviridae* que possuem o genoma bipartido (DIETZGEN et al., 2014). O genoma do CoRSV é composto por 2 partículas de RNA de sentido negativo, que codificam um total de seis proteínas (RNA 1: 3' N-P-3-M-G 5' e RNA 2 – 3' L 5') com nº acesso no GenBank KF812525 e kf812526). As funções presumidas para as proteínas do RNA1 seriam: nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), proteína de movimento célula a célula (3), proteína matriz (M) e glicoproteína (G), enquanto o RNA 2 codifica a RNA polimerase dependente do RNA (L).

Como acontece em todas as infecções virais, a interação do CoRSV com as células hospedeiras deve envolver um sistema complexo de associações proteicas, não apenas entre as proteínas virais em si, mas também entre essas e as proteínas da hospedeira. A técnica BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) permite a visualização de interações entre proteínas em células vivas, oferecendo vantagens únicas para o estudo de complexos proteicos (HU; CHINENOV; KERPPOLA, 2002; WALTER et al., 2004). Ela se baseia na fusão de duas proteínas, candidatas à interação com dois fragmentos complementares de uma proteína fluorescente, sendo um na posição N-terminal e outro na C-terminal, de uma proteína fluorescente (ex: GFP, YFP). Separados, estes fragmentos não fluorescem, mas quando são reunidos, por ocasião da interação entre as proteínas candidatas a eles fusionadas, os dois fragmentos se complementam, recuperando a fluorescência original (CITOVSKY; GAFNI; TZFIRA, 2008; KERPPOLA, 2008; WALTER et al., 2004).

O complexo tolera interações estáveis com a associação entre os fragmentos da proteína fluorescente, sem alteração na função ou efeitos deletérios para a célula. Em adição, a BiFC é, particularmente, valiosa para determinar a localização subcelular de interações proteicas, fornecendo informações sobre funções biológicas de complexos de proteínas ainda pouco estudados. Por meio desta técnica, foi possível a identificação de interação entre as proteínas dos PYDV, SYNV, PYDV, entre outros (BANDYOPADHYAY et al., 2010; BYOUNG-EUN et al., 2010; HUANG et al., 2005).

Para investigar a interação entre as proteínas do CoRSV e a localização dessa interação dentro da célula, as proteínas codificadas pelo RNA 1 desse vírus (N, P, 3, M e G), foram fusionadas separadamente às regiões C e/ou N da proteína YFP (*Yellow fluorescent protein*) e expressas em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana* que possuem um marcador nuclear (GOODIN et al., 2008). As interações entre as proteínas do CoRSV permitiram a construção de

um mapa representativo das interações e localizações proteicas (PILM) para esse vírus. Esse foi o primeiro mapa elaborado para um dos membros do proposto gênero *Dicorhabdovirus*, tornando-se um modelo para estudos de outros membros desse gênero.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condução dos experimentos

Este estudo foi realizado em uma parceria entre a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a University of Kentucky (UK) de modo que os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Virologia Vegetal da UFLA e no Laboratório de Virologia Vegetal da UK.

2.2 Multiplicação do inóculo e plantas utilizadas

O *Coffee ringspot virus*, oriundo de plantas de *Chenopodium quinoa* infectadas, foi dessecado com sílica gel, no Laboratório de Virologia Vegetal da UFLA, e enviado para o Laboratório de Virologia Vegetal da UK (APHIS permit P526P-12-04085), onde foi multiplicado por inoculação mecânica em plantas de *C. quinoa*, sob condições de casa de vegetação e câmaras de crescimento protegidas de insetos. Após a inoculação, inicialmente as plantas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura controlada, de 28°C, por 10 dias e, posteriormente, transferidas para a casa de vegetação.

As proteínas virais foram expressas em plantas de *N. benthamiana* transgênicas, com marcador nuclear (CFP fusionada à histona 2b) (MARTIN et al., 2009).

2.3 Extração do RNA total e RT-PCR

Folhas de *Chenopodium quinoa* infectadas mecanicamente com CoRSV foram utilizadas para extração de RNA total de acordo com as recomendações do fabricante usando o Qiagen RNeasy Plant minikit (Quiagen). Os cDNAs para

os genes N, P, 3, M e G foram sintetizados (*primers*, att -N-reverse, att -P-reverse, att -3- reverse, att -M-reverse, att-G -reverse - Tabela 1), utilizando a enzima transcriptase reversa Superscript III(Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os genes do nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), proteína do movimento (3), proteína matriz (M) e glicoproteína (G), foram amplificados, por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR), empregando-se a *Phusion high fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes), com a utilização dos pares de *primers* específicos listados na Tabela 1. Não foi possível o estudo de localização e interação da poliproteína (L), codificada pelo RNA 2, em função de seu tamanho. Essa proteína é muito grande para ser expressa em planta ou célula bacteriana utilizando os vetores atualmente disponíveis e linhagens bacterianas.

2.4 Técnica BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*): Reação de recombinação da Bp clonase

Para a construção do vetor “entry clone” foram utilizados 5µl do produto linearizado (att-PCR), 2 µl do vetor pDONR221, 4 µl do tampão de reação 5x Te Buffer da BP clonase e 2µl da enzima Bp Clonase (Invitrogen). Essa reação foi mantida à temperatura ambiente, por 1 hora e, em seguida, adicionados 2 µl de Proteinase K (2 µg/µl), e a reação foi, novamente, incubada a 37°C por 10 minutos antes da transformação em célula competente *E. coli Omnimax* (Invitrogen). O método de choque térmico foi utilizado para a transformação: 5µl da reação da Bp clonase foram adicionadas a 50ul das células de *Omnimax* e estas foram incubadas em gelo durante 30 min. Em seguida, essas foram colocadas a 42°C por 45 segundos e, novamente, transferidas para o gelo por 5 minutos. Finalmente foram adicionados 1000 µL de meio LB líquido, e as

células foram incubadas a 37°C durante 1 h com agitação a 150 – 200 rpm. As células foram, então, espalhadas em placas com meio LB sólido suplementado com Kanamicina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C durante 12 - 16 h.

Para confirmação da presença do fragmento desejado, as colônias bacterianas transformadas foram submetidas à reação de RT-PCR utilizando a enzima AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems) e, posteriormente, sequenciadas. As colônias que continham o fragmento genômico desejado foram multiplicadas em meio LB líquido a 37°C overnight. A extração do DNA plasmidial foi feita utilizando-se o kit GeneJet Plasmid (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante.

2.4.1 Técnica BiFC: Reação de recombinação da LR clonase

Em um tubo de 1,5 ml foram adicionados 5µl de água ultrapura, 1,5 µl do entry clone (derivado da reação da PB clonase), 1,5µl do pSITE-BiFC-nYFP (porção N terminal da proteína fluorescente amarela) ou pSITE-BiFC-cYFP (porção C terminal da proteína fluorescente amarela) (MARTIN et al., 2009) e por fim 1,5 µl da enzima LR clonase (Invitrogen). As proteínas N, P, M, 3 e G foram fusionadas ao nYFP e, também, ao cYFP para os ensaios de BiFC, segundo descrito por Chakrabarty et al. (2007) e Martin et al. (2009). Após manutenção à temperatura ambiente por 1 hora, foram adicionados 2 µl de Proteinase K (2 µg/µl), seguido por incubação a 37°C por 10 minutos e transformação em célula competente *E. coli Omnimax* (Invitrogen), conforme já descrito posteriormente. Os antibióticos utilizados para seleção das bactérias transformadas foram: estreptomicina (100 µg/ml) e espectromicina (100 µg/ml). Dez reações da LR clonase foram realizadas conforme descritos na tabela 1.

Tabela 1 Número da construção, proteína fusionada ao pSITE-BiFC na posição N (n) ou C (c) terminal e combinações testadas por agroinfiltração para verificação da possível interação entre elas

Numero da construção	Proteína	pSITE	Agroinfiltração
1	N	BiFC-nYFP	1+2; 1+4; 1+6; 1+8;
2	N	BiFC-cYFP	2+3; 2+5; 2+7; 2+9
3	P	BiFC-nYFP	3+4; 3+6; 3+8; 3+10
4	P	BiFC-cYFP	4+5; 4+7; 4+9
5	3	BiFC-nYFP	5+6; 5+8; 5+10
6	3	BiFC-cYFP	6+7; 6+9
7	M	BiFC-nYFP	7+8; 7+10
8	M	BiFC-cYFP	8+9
9	G	BiFC-nYFP	9+10
10	G	BiFC-cYFP	1+10

2.5 Procedimentos para agrotransformação e infiltração

Os dez vetores binários recombinantes (Tabela 1) foram empregados separadamente para transformar a *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404, utilizando o método de “congelamento e descongelamento”: inicialmente 5 µl de plasmídeo (derivado da reação da LR clonase) foram incubados em gelo, com 100 µl de suspensão de *Agrobacterium*, em 10 mM de CaCl₂, por 20 minutos. Logo após a suspensão, foi congelada em nitrogênio líquido por 5 segundos, submetida a choque térmico a 37°C por 5 minutos e incubada a 28°C durante 2 horas. Finalmente adicionou-se 1 ml de meio LB líquido e as bactérias foram precipitadas por centrifugação, plaqueadas em meio LB ágar contendo como antibióticos de seleção a estreptomicina (100 µg/ml), espectromicina (100 µg/ml) e rifampicina (100 µg/ml), e incubadas por 2 a 3 dias a 32°C.

Para a infiltração foi feita uma suspensão de *A.tumefaciens* em tampão MES (10 mM de MgCl₂, 10 mM de MES, pH 5,6), contendo acetosyringone (150 mM), ajustando-se a concentração para uma OD de 0,6 a 600 nm. Em seguida, a suspensão bacteriana foi deixada 2 a 3 horas à temperatura ambiente, antes da infiltração.

No momento da infiltração, as suspensões foram misturadas aos pares, conforme discriminado na Tabela 1. Foram infiltradas plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana*, com o núcleo marcado com a proteína CFP (*Cyan fluorescent protein*), mantidas a uma temperatura média de 22°C com ciclo de 16 horas luz e 8 horas de escuro. Para cada combinação de proteínas, foram utilizadas três plantas, tendo sido infiltradas duas folhas expandidas, com cerca de 2,5cm, por planta. Após a infiltração as plantas foram mantidas em laboratório sob luz fluorescente contínua, durante pelo menos 24-48 h, por até cinco dias. As folhas foram examinadas ao microscópio confocal cerca de 2 a 3 dias após a agroinfiltração.

Para verificar se os fragmentos da proteína fluorescente YFC não se associaram uns com os outros, na ausência de interação entre as proteínas fusionadas, foram empregados controles positivos e negativos em cada passo da realização da técnica BiFC. Como controles positivos, foram utilizadas as proteínas N e M do *Potato yellow dwarf virus* (PYDV), que interagem entre si e se expressam no núcleo das plantas teste utilizadas (BANDYOPADHYAY et al., 2010). Como controle negativo, foi utilizada a glutathione-s-transferase (GST) em combinação dos pares com todas as dez construções agroinfiltradas (ANDERSON et al., 2012; BANDYOPADHYAY et al., 2010; MIN et al., 2010).

2.6 Microscopia confocal de varredura a laser

As análises das plantas agroinfiltradas foram feitas ao microscópio confocal de varredura a laser, Olympus FV1000, com lasers de hélio/neon, multilinha de argônio e diodo sólido. As proteínas YFP e CFP foram excitadas a 514 nm e 440 nm, respectivamente. Pelo menos três imagens com boa resolução para cada proteína expressa foram geradas e capturadas em sequência utilizando o software Olympus FluoView. As Micrografias foram obtidas usando lentes 40X/0.9NA, com objetiva de imersão em água.

3 RESULTADOS

3.1 Análise dos resultados de interação entre as proteínas do CoRSV obtidas por BiFC

Os resultados das interações entre as proteínas do *Coffee ringspot vírus* (CoRSV) estão apresentados na tabela 2. Quando foi testada a combinação da mesma proteína viral fusionada nos terminais C e N da YFC, houve interação positiva entre PxP e GxG. Quando cada proteína foi testada, aos pares, com as demais do RNA1, foram encontradas interações positivas entre NxP, NxM e PxM. Nenhuma interação foi observada com o controle negativo empregado, enquanto que o controle positivo mostrou a interação esperada.

Tabela 2 Ocorrência de interações entre as proteínas do CoRSV e localização subcelular em que foram visualizadas as interações positivas em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana* que expressam um marcador nuclear

<i>Proteínas</i>	<i>Interações</i>	<i>Localização das interações</i>
N/N	-	-
P/P	+	Núcleo
3/3	-	-
M/M	-	-
G/G	+	Espaço perinuclear
N/P	+	Nucleoplasma
N/3	-	-
N/M	+	Espaço perinuclear
N/G	-	-
P/3	-	-
P/M	+	Núcleo
P/G	-	-
3/M	-	-
3/G	-	-
M/G	-	-

A interação PxP, a exemplo do que foi observado, quando se testou a localização celular da proteína P fusionada ao GFP, foi observada, exclusivamente, no núcleo (Figura 1, painéis 2A-F). Outra interação positiva observada, exclusivamente, no espaço nuclear ocorreu entre as proteínas P e M (Figura 1, painéis 5A-F). Por outro lado, na interação NxP, observou-se uma distribuição uniforme por meio do nucleoplasma, formando uma inclusão com as mesmas características do viroplasma (Figura 1, painéis 1A-F). Tanto a

interação entre as proteínas N x M quanto a interação entre a proteína G com ela mesma (G x G) foram observadas no espaço perinuclear (Figura 1, painéis 3A-F; painéis 4A-F, respectivamente). Nenhuma interação foi observada entre as demais combinações testadas (Figura 1, painéis 6A-F).

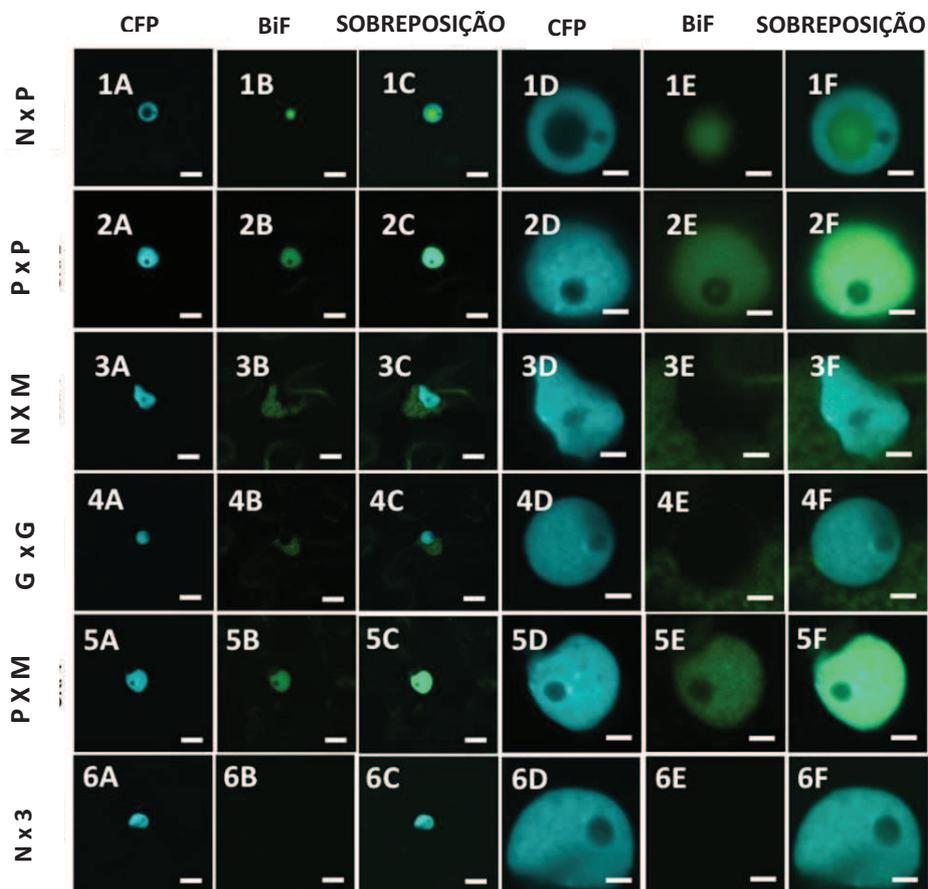


Figura 1 Microscopia confocal apresentando a localização das proteínas do CoRSV quando coexpressas, pela técnica BiFC. Os experimentos de coexpressão foram conduzidos nas células epidérmicas de folhas de *Nicotiana benthamiana* transgênicas, que possuem o CFP como marcador nuclear

Legenda: Imagem celular (painéis A-C, escala = 10 μm) ou nuclear (painéis D-F, escala = 2 μm). **1A-F.** CoRSV N/P. **2A-F.** CoRSV P/P. **3A-F.** CoRSV N/M. **4A-F.** CoRSV G/G. **5A-F.** CoRSV P/M. **6A-F.** CoRSV N/M. Escala = 10 μm (painéis A-C) ou 2 μm (painéis D-F).

O mapa de localização e interação das proteínas do CoRSV é apresentado na figura 2. As setas representam a interação entre as proteínas e as letras minúsculas o local da interação na célula do hospedeiro. A ausência de seta representa a não interação das proteínas.

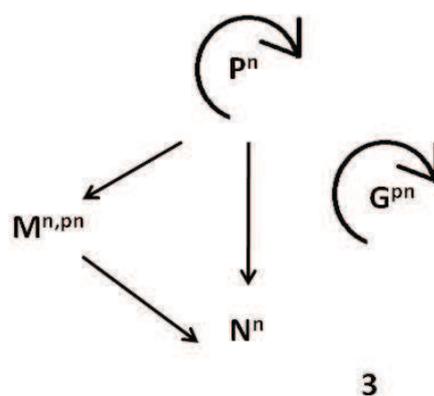


Figura 2 Mapa de interação e localização (PILM) para as proteínas do CoRSV. As letras maiúsculas representam as proteínas do CoRSV

Legenda: P = fosfoproteína, N = nucleoproteína, 3 = proteína do movimento, M = proteína matriz e G = glicoproteína. Interações entre as próprias proteínas são indicadas pelas setas curvadas, as linhas indicam interação heteróloga e as letras minúsculas indicam o local da interação: n = núcleo e pn = periferia nuclear.

4 DISCUSSÃO

Mapas de interação de proteínas, particularmente quando apoiados por mapas de localização, são cruciais para o entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem os processos de infecção e transmissão viral (UETZ et al., 2005). Além disso, os mapas de interação e localização proteicas (PILMs) permitem inferir diferentes mecanismos pelos quais os vírus podem influenciar determinados processos fisiológicos.

Segundo Kerppola (2008), a técnica de BiFC tende a fornecer informações sobre a localização do complexo de proteínas mais estáveis ou abundantes. Como observado para outra interação das proteínas N/P dos *Rhabdovirus* que infectam plantas, já estudados, as proteínas N (nucleocapsídeo) e P (fosfoproteína) do *Coffee ringspot vírus* (CoRSV), também, apresentaram essa interação na região do nucleoplasma. A interação N/P do *Orchid fleck vírus* (OFV) mostrou a mesma formação característica de viroplasma (KONDO et al., 2013), bem como a inclusão nuclear observada para o CoRSV (Figura 3, painéis 1A-F), sugerindo que o complexo mais estável entre P/N está localizado no nucleoplasma.

Estudos realizados com a proteína M do *Potato yellow dwarf vírus* (PYDV) e *Sonchus yellow net vírus* (SYNV) mostraram que a associação entre as proteínas P e M ocorreram na região perinuclear, sugerindo que, provavelmente, a proteína M tem uma afinidade por membranas (BANDYOPADHYAY et al., 2010; JACKSON et al., 2005). Essa associação P/M, bem como a mesma localização subcelular foi observada neste trabalho para o CoRSV. Da mesma forma, a interação entre duas moléculas de glicoproteína (G/G) e a sua localização no espaço perinuclear observadas anteriormente para o PYDV e SYNV (BANDYOPADHYAY et al., 2010; MIN et al., 2010), ocorreu com o CoRSV.

Comparações entre as interações proteicas que ocorrem nos *Nucleorhabdovirus* sugerem que eles têm pelo menos duas estratégias diferentes para o movimento célula a célula. Por exemplo, as proteínas responsáveis pelo movimento do *Rice yellow stunt virus* (RYSV), PYDV e SYNV são as proteínas P3, Y e sc4, respectivamente, enquanto a proteína P3 do RYSV, possivelmente, liga-se diretamente ao nucleocapsídeo (N). Por outro lado, não foram encontrados interações entre as proteínas Y-N ou sc4-N (BANDYOPADHYAY et al., 2010; MIN et al., 2005). Para PYDV, Y interage com as proteínas matriz (M) e glicoproteína (G) (BANDYOPADHYAY et al., 2010). A proteína 3, do CoRSV, possivelmente responsável pelo movimento célula a célula, não apresentou interações com nenhuma outra proteína.

Para obter uma compreensão mais profunda de processo da infecção viral, mapas de interação das proteínas virais devem ser expandidos para incluir proteínas do hospedeiro (SHAPIRA et al., 2009; UETZ et al., 2005). Segundo Bamunusinghe, Seo e Rao (2011), os vírus movem-se de uma célula para outra, geralmente, por meio do retículo endoplasmático das células das plantas hospedeiras.

Os dados de interação de proteína e mapas de localização são um importante apoio para estudos da diversidade genética e, também, geração de perfis de transcrição para os vírus (DARDICK, 2007; SENTHIL et al., 2005; WHITHAM et al., 2003). Assim sendo, este trabalho apresenta dados fundamentais para a compreensão de parte dos processos envolvidos na interação vírus planta.

5 CONCLUSÕES

- a) As interações BiFC para as proteínas do CoRSV foram positivas para NxP, PxP, MxP, MxN e GxG;
- b) As interações PxP e MxP se localizaram no núcleo;
- c) As interações GxG e MxN se localizaram na periferia nuclear;
- d) A interação NxP foi observada no nucleoplasma, formando uma estrutura característica de viroplasma;
- e) Não houve interação positiva nas combinações: 3x3, 3xN, 3xP, 3xM, 3xG, PxG, MxG, GxN, NxN, MxM.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, G. et al. The nucleocapsid protein of Potato yellow dwarf virus: protein interactions and nuclear import mediated by a non-canonical nuclear localization signal. **Frontiers in Plant Science**, Washington, v. 3, p. 14, Feb. 2012.
- BAMUNUSINGHE, D.; SEO, J. K.; RAO, A. L. N. Subcellular localization and rearrangement of endoplasmic reticulum by brome mosaic virus capsid protein. **Journal of Virology**, Washington, v. 85, n. 6, p. 2953-2963, 2011.
- BANDYOPADHYAY, A. et al. An integrated protein localization and interaction map for *Potato yellow dwarf virus*, type species of the genus Nucleorhabdovirus. **Virology**, London, v. 402, n. 1, p. 61-71, June 2010.
- BITANCOURT, A. A. A mancha anular, uma nova doença do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 4, p. 404-405, 1938.
- BYOUNG-EUN, M. et al. A host-factor interaction and localization map for a plant-adapted rhabdovirus implicates cytoplasm-tethered transcription activators in cell-to-cell movement. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 23, n. 11, p. 1420-1432, Nov. 2010.
- CHAGAS, C. M. Associação do ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes à mancha anular do cafeeiro. **O Biólogo**, São Paulo, v. 39, p. 229-232, 1973.
- CHAGAS, C. M. **Coffee ringspot (?) Nucleorhabdovirus**. Disponível em: <<http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr237.htm>>. Acesso em: 10 set. 2012.
- CHAGAS, C. M. Evidências da etiologia viral da mancha anular do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 218-219, 1980.
- CHAGAS, C. M. **Mancha anular do cafeeiro: transmissibilidade, identificação do vetor e aspectos anatomo-patológicos da espécie *Coffea arabica***. 1978. 132 p. Tese (Doutorado em Biociência) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.
- CHAKRABARTY, R. et al. PSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: probing Nicotiana benthamiana-virus interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 7, p. 740-750, July 2007.

CITOVSKY, V.; GAFNI, Y.; TZFIRA, T. Localizing protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation in planta. **Methods**, San Diego, v. 45, n. 3, p. 196-206, July 2008.

DARDICK, C. D. Comparative expression profiling of *N. benthamiana* leaves systemically infected with three fruit tree viruses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 8, p. 1004-1017, Aug. 2007.

DIETZGEN, R. G. et al. Dichorhavirus: a proposed new genus for Brevipalpusmite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. **Archives of Virology**, New York, v. 159, n. 3, p. 607-619, Mar. 2014.

FIGUEIRA, A. R. A mancha anelar do cafeeiro causada pelo *Coffee ringspot virus* (CoRSV) em Minas Gerais. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA. **Manejo fitossanitário da cultura do cafeeiro**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. p. 127-139.

GOODIN, M. M. et al. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions: review. **Molecular Plant-Microbe Interact**, Saint Paul, v. 21, n. 8, p. 1015-1026, 2008.

HU, C. D.; CHINENOV, Y.; KERPPOLA, T. K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 9, n. 4, p. 789-798, Apr. 2002.

HUANG, Y. W. et al. Identification of a movement protein of rice yellow stunt rhabdovirus. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 4, p. 2108-2114, Feb. 2005.

ITO, T.; SUZAKI, K.; NAKANO, M. Genetic characterization of novel putative rhabdovirus and dsRNA virus from Japanese persimmon. **Journal of General Virology**, London, v. 94, n. 8, p. 1917-1921, Aug. 2013.

JACKSON, A. O. et al. Biology of plant rhabdoviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 623-660, 2005.

KERPPOLA, T. K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. **Annual Review of Biophysics**, Palo Alto, v. 37, p. 465-487, 2008.

KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. M.; RODRIGUES, J. C. Brevipalpus-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1/3, p. 135-160, 2003.

KONDO, H. et al. Orchid fleck virus structural proteins N and P form intranuclear viroplasm-like structures in the absence of viral infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, n. 13, p. 7423-7434, July 2013.

MARTIN, K. et al. Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 150-162, July 2009.

MIN, B. E. et al. A host-factor interaction and localization map for a plant-adapted rhabdovirus implicates cytoplasm-tethered transcription activators in cell-to-cell movement. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 23, n. 11, p. 1420-1432, Nov. 2010.

SENTHIL, G. et al. Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped virus. **Journal of General Virology**, London, v. 86, n. 9, p. 2615-265, Sept. 2005.

SHAPIRA, S. D. et al. A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. **Cell**, Cambridge, v. 139, n. 7, p. 1255-1267, Dec. 2009.

UETZ, P. et al. Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. **Science**, New York, v. 311, n. 5758, p. 239-342, Jan. 2005.

WALTER, M. et al. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. **Plant Journal**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 428-438, 2004.

WHITHAM, T. G. et al. Community and ecosystem genetics: a consequence of the extended phenotype. **Ecology**, Durham, v. 84, n. 3, p. 559-573, Mar. 2003.