



ANDRÉS MAURICIO PINZÓN NÚÑEZ

**EXPRESSION, SUBCELLULAR LOCALIZATION AND
ESTUDIES ON SILENCING SUPPRESSION OF A NEW
MEMBER OF THE *Potyviridae* FAMILY IN BRAZIL**

**LAVRAS - MG
2019**

ANDRÉS MAURICIO PINZÓN NÚÑEZ

**EXPRESSION, SUBCELLULAR LOCALIZATION AND ESTUDIES ON SILENCING
SUPPRESSION OF A NEW MEMBER OF THE *Potyviridae* FAMILY IN BRAZIL**

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

Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

**LAVRAS - MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Núñez, Andrés Mauricio Pinzón.

Expression, subcellular localization and studies on silencing
suppression of a new member of the *Potyviridae* family in Brazil /
Andrés Mauricio Pinzón Núñez. - 2019.

90 p. : il.

Orientador(a): Antonia dos Reis Figueira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.
Bibliografia.

1. Plant- Pathogen interaction. 2. Molecular Virology. 3.
Expression. I. Figueira, Antonia dos Reis. II. Título.

ANDRÉS MAURICIO PINZÓN NÚÑEZ

**EXPRESSION, SUBCELLULAR LOCALIZATION AND ESTUDIES ON
SILENCING SUPPRESSION OF A NEW MEMBER OF THE *Potyviridae* FAMILY IN
BRAZIL**

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

APROVADA em, Lavras MG, Junho 19, 2019.

Dra. Thaís Oliveira Ramalho	Agronomia - FAZU
Dr. Fabiano Jose Perina	EMBRAPA
Dr. Ricardo Magela de Souza	DFP - UFLA
Dr. Eduardo Alves	DFP - UFLA

Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

*A DEUS, primeiramente por todas as benções concedidas.
Aos meus amados pais, Alcira Nuñez Bermudez e Luis Danilo Pinzón Camacho, pela
paciencia, conselhos e compreensão. Ao meu querido irmão, Danilo e a minha hermosa
afilhada Mía.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, primeiramente, por fazer possível cumprir um de meus sonhos e por cada conquista durante meu passar pela vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de cursar o mestrado e o Doctorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Centro Nacional de Biotecnologia de Madrid (CNB-CSIC) e a todos os membros do laboratório de Interação Planta - Patógeno em infecções virais, pelo carinho, acolhimento e ensinamentos.

À minha mãe, Alcira Núñez, por ser uma conselheira e sempre me indicar o caminho certo. A meu pai e irmão por sempre me mandar mensagem para não desistir e a minha hermosa sobrinha e afilhada Mía que chegou a encher nossas vidas de amor.

À Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira, pela orientação, amizade, compreensão, ensinamentos, conselhos e confiança em acreditar em mim.

Ao Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras especialmente a Priscilla e o Sérgio pela amizade e pela vontade de me ajudar no desenvolvimento de meu trabalho.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a concretização desse sonho.

GRACIAS!

RESUMO GERAL

O vírus do amarelo do broto da soja (*Soybean yellow shoot virus*-SoyYSV) tem alto potencial de causar danos severos às lavouras, representando uma ameaça à produção de soja no Brasil. Recentemente, o SoyYSV foi sequenciado e os análises moleculares indicaram que se trata de uma nova espécie pertencente à família *Potyviridae*. Assim sendo, para o entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem os processos de infecção viral é importante conhecer a localização subcelular das proteínas virais na célula hospedeira e a sua possível actividade de supressão de silenciamento gênico. Para atender a essas demandas, os genes que codificam as proteínas virais do SoyYSV denominadas P1, HCPro, P3, PIPO, 6K1, NIa, NIB e CP, foram clonadas no plasmídeo “entry clone” do sistema Gateway (PDONR221). Após a clonagem, foi subclonado no vetor de expressão pSITE fusionado à proteína fluorescente GFP e expressadas via *Agrobacterium tumefaciens* em duas linhagens de plantas transgenicas de *Nicotiana benthamiana* que expressam a proteína fluorescente RFP, sendo que uma delas expressa na histona 2b no núcleo e a outra no retículo endoplasmático. A análise das plantas infiltradas, acoplada a observações de microscopia confocal, mostrou que as proteínas P1, HCPro e Nia se localizaram no núcleo e no citoplasma; as proteínas P3 e Nib se acomodaram no citoplasma, núcleo e nucléolo; enquanto que as proteínas PIPO e 6K1 se localizaram nas membranas celulares, no citoplasma. A proteína CP acumulou-se exclusivamente na periferia nuclear. Por outra parte, no segundo experimento, o objetivo foi investigar a possível capacidade de supressão do silenciamento gênico apresentada por algumas proteínas dos vírus: *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV), *Turnip mosaic virus* (TUMV), *Chinese yan necrotic mosaic virus* (CYNMV), *Blackberry virus Y* (BIVY) *Arepa palm necrotic ringspot virus* (APNRV), e *Brome streak mosaic virus* (BSTMV), todos pertencentes à família *Potyviridae*. Para isso, utilizamos um clone infeccioso do *Plum pox virus* (PPV) inserindo os genes que codificam as proteínas de interesse. As construções foram expressas em plantas de *Nicotiana benthamiana* via *Agrobacterium tumefaciens*. As imagens foram obtidas mediante microscopia de epifluorescência e as quantificações de fluorescência mediante fluorometria. Os resultados obtidos nesse trabalho não evidenciaram atividade de supressão de silenciamento das proteínas testadas, mas permitiram obter informações que contribuíram para a melhor compreensão dos mecanismos de silenciamento do SoyYSV no processo de infecção. Novos estudos deverão ser feitos visando conhecer o papel que desempenham as proteínas virais quando estas estão associadas a proteínas do vírus ou quando interagem especificamente com proteínas do hospedeiro.

Palavras chaves: Clonagem, Interação Planta-Patogeno, Expressão, Virologia molecular

GENERAL ABSTRACT

Soybean yellow shoot virus (SoyYSV) has a high potential for severe crop destruction and is a threat to soybean production in Brazil. Recently, SoyYSV was sequenced and molecular analyzes indicated that it is a new species belonging to the *Potyviridae* family. Therefore, it is important to understand the subcellular location of the viral proteins in the host cell and its possible silencing suppression activity to understand the molecular mechanisms involved in viral infection processes. For this, the genes coding for the SoyYSV viral proteins named P1, HCPro, P3, PIPO, 6K1, NIa, NIB and CP, were cloned into the entry clone plasmid of the Gateway system (PDONR221). After cloning, it was subcloned into the pSITE expression vector fused to the GFP fluorescence protein and expressed by *Agrobacterium tumefaciens*, in two lines of *Nicotiana benthamiana* transgenic plants expressing the RFP fluorescent protein, one of these fused to histone 2b, inducing fluorescence in the nucleus, and the other one with protein expressed in the endoplasmic reticulum. The analysis of the infiltrated plants, coupled with observations of confocal microscopy, showed that the proteins P1, HCPro and Nia were located in the nucleus and cytoplasm; P3 and Nib accumulated in the cytoplasm, nucleus and nucleolus, whereas the PIPO and 6K1 proteins were located in the cell membranes in the cytoplasm. The CP protein accumulated exclusively in the nuclear periphery. On the other hand, in the second experiment, the objective was to investigate the possible silencing suppression activity presented by some proteins of *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV), *Turnip mosaic virus* (TUMV), *Chinese yan necrotic mosaic virus* (CYNMV), *Blackberry virus Y* (BIVY) *Arepa palm necrotic ringspot virus* (APNRV) and *Brome streak mosaic virus* (BSTMV), belonging to the *Potyviridae* family. For this, an infectious clone of *Plum pox virus* (PPV) was used, inserting the genes encoding the proteins of interest. The constructs were expressed in *Nicotiana benthamiana* plants by *Agrobacterium tumefaciens*. The images were obtained by epifluorescence microscopy and fluorescence quantification using fluorometry. The results obtained in this work did not show silencing suppression activity, but allowed to obtain information that contributed to a better understanding of the silencing mechanisms of SoyYSV in the infection process. Further studies should be done by knowing the role of viral proteins when they are associated with virus proteins or when interacting specifically with host proteins.

Keywords: Clonation, Plant- Pathogen interaction, Expression, Molecular Virology

SUMÁRIO

CAPITULO 1	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 SoyYSV: Um novo vírus de plantas no Brasil.....	12
2.2 Família <i>Potyviriidae</i>	14
2.3 Características Biológicas e Bioquímicas das Proteínas dos <i>Potyvirus</i>	19
2.3.1 P1	20
2.3.2 HCPro.....	21
2.3.3 P3, PIPO 6K1 e 6K2.....	22
2.3.4 CI	23
2.3.5 NIa e VPg	24
2.3.6 NIb	25
2.3.7 CP.....	26
2.4 Supressão de silenciamento gênico	26
2.5 Proteínas fluorescentes que atuam como genes marcadores	28
2.6 Sistema de clonagem: Gateway	29
2.7 Plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> transgênicas que expressam marcadores subcelulares	30
3 REFERENCIAS	32
CAPITULO 2. EXPRESSION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF <i>Soybean yellow shoot virus</i> PROTEINS: A NOVEL MEMBER OF THE FAMILY <i>Potyviriidae</i> IN BRAZIL.....	43
1 INTRODUCTION	46
2 MATERIAL AND METHODS.....	47
3 RESULTS.....	51
4 DISCUSSION.....	53
6 LITERATURE CITED	56
CAPITULO 3. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS VISANDO DETECTAR SUPRESSORES DE SILENCIAMENTO GÊNICO DO <i>Soybean yellow shoot virus</i> (SoyYSV), UM NOVO MEMBRO DA FAMÍLIA <i>Potyviriidae</i> NO BRASIL.....	59
1 INTRODUÇÃO	63
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3 RESULTADOS	74
4 DISCUSSÃO	83
5 REFERENCIAS	87

CAPITULO 1

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o maior produtor de soja do mundo, com produção estimada de 120,50 milhões de toneladas no período 2018/19, numa área plantada de mais de 37,50 milhões de hectares (CONAB, 2018). Isto representa um 33,52% da produção mundial, segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2018). Mesmo com essa alta produção, os agricultores necessitam vencer diversos desafios causados por fatores que limitam a produtividade da soja, como as doenças causadas por vírus. Estas diminuem o rendimento e a qualidade das sementes, levando à rejeição de lotes inteiros, destinados à exportação, e gerando grande impacto econômico.

Hill e Whitham (2014) listaram 45 espécies de vírus que infetam naturalmente a cultura da soja no mundo. No Brasil, isolados do *Soybean mosaic virus* (SMV) foram considerados como o principal fator limitante, afetando entre 20 e 70% dos rendimentos da cultura (SILVA et al. 2003), levando à busca de novos fatores de resistência e à utilização de sementes livres de vírus (HAJIMORAD et al. 2018). Porém, com a expansão do plantio de soja para novas áreas, principalmente na forma de monocultura, novas viroses têm surgido, podendo ocasionar perdas significativas na produção (JAMIL et al. 2017, YASMIN et al. 2017).

Em meados dos anos 80, um novo vírus com partículas flexuosas com 750 a 780nm de comprimento foi detectado em Lavras, Minas Gerais, Brasil (DESLANDES et al., 1984), e denominado de vírus do amarelo do broto da soja (*Soybean yellow shoot virus* - SoyYSV), isolado Lavras84 (FIGUEIRA et al., 1991). Estudos recentes indicaram que devido às suas características moleculares, biológicas e estruturais, o SoyYSV está organizado em uma ORF que codifica uma poliproteína, com as mesmas características dos membros da família *Potyviridae* (FIGUEIRA et al., 2019). Entretanto, não se encaixou em nenhum dos gêneros já descritos nessa família, indicando se tratar de uma espécie pertencente a um novo gênero.

Figueira e colaboradores (2019) evidenciaram que, quando o SoyYSV foi inoculado mecanicamente em diversas cultivares de soja, foi capaz de causar perdas significativas na qualidade e quantidade de produção de sementes, sendo portanto considerado potencialmente importante para as lavouras de soja no Brasil. Além disso, o SoyYSV infecta espécies de soja

resistentes ao *Soybean mosaic virus* (SMV), representando um risco extra para as cultivares que geralmente são plantadas.

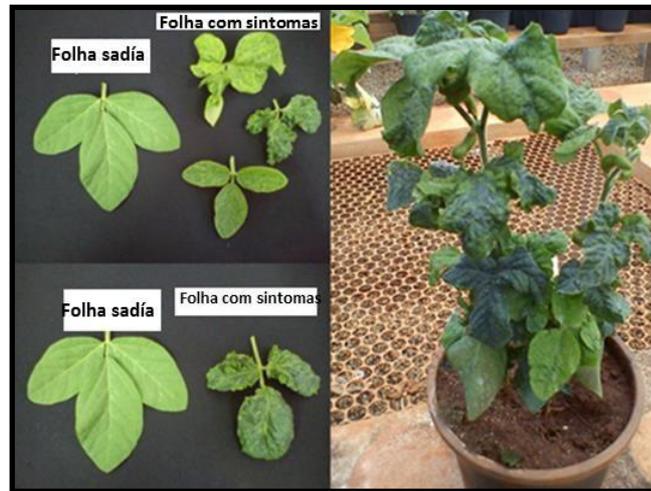
Assim sendo, faz-se necessário desenvolver um estudo mais detalhado da interação desse vírus com as células da planta hospedeira, com a finalidade de obter subsídios para futuros estudos envolvendo o controle desse vírus via melhoramento genético convencional ou por modificação genética. Nesse contexto, o estudo da localização das proteínas, expressas individualmente no ambiente celular da planta hospedeira como o mecanismo de silenciamento gênico do SoyYSV utilizado pelo vírus para suprimir a defesa da planta, poderá fornecer informações importantes sobre o seu mecanismo de atuação, bem como revelar as possíveis diferenças que esse vírus apresenta em relação a outras espécies de vírus da família *Potyviridae* já relatadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SoyYSV: Um novo vírus de plantas no Brasil

O vírus do amarelo do broto da soja ou *Soybean Yellow shoot virus* (SoyYSV), foi detectado em Lavras-MG, na estação experimental da EPAMIG, em 1984. Os sintomas induzidos pelo SoyYSV iniciam-se com mosaico, clareamento de nervuras, evoluindo até os sintomas mais característicos, como amarelecimento e encrespamento dos brotos. Além disso, ocorre paralização do crescimento dos ponteiros, causando enfezamento e superbrotamento (Figura 1) (DESLANDES et al., 1984; FIGUEIRA et al., 1987, FIGUEIRA et al., 2019). Santos (2000) observou que o SoyYSV também afeta as sementes, induzindo o aparecimento de manchas e deformações, o que leva a perdas consideráveis.

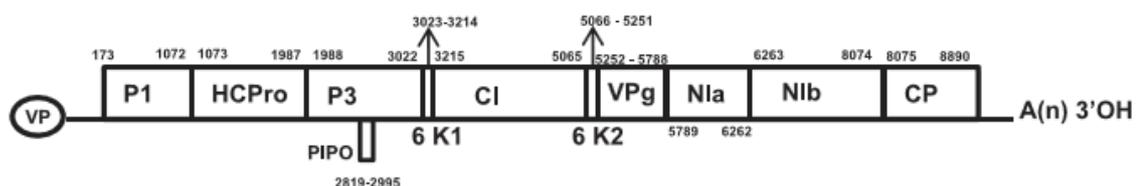
Figura 1 Sintomatologia característica do SoyYSV induzidos em casa de vegetação em plantas de soja.



O SoyYSV possui uma ampla gama de hospedeiras e lesões locais induzidas em folhas de *Carica papaya* e *Chenopodium quinoa* características deste vírus. Na análise de tecidos foliares infectados foram identificadas partículas com 750 a 780 nm de comprimento, além de inclusões lamelares típicas, indicando que o SoyYSV deveria ser um novo membro da família *Potyviridae*, ainda não descrito na literatura (DESLANDES et al., 1984; FIGUEIRA et al., 1991; FIGUEIRA et al., 2019).

Recentemente o genoma do SoyYSV foi sequenciado, evidenciando que o vírus contém 9052 nucleotídeos, excluindo a cauda poli (A), e está organizado em uma ORF que codifica uma única poliproteína que após processos de clivagem gera 10 proteínas maduras e uma proteína incorporada na região codificadora para a proteína P3, denominada PIPO (Figura 2) (FIGUEIRA et al., 2019).

Figura 2 Organização genômica do *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV).



A análise da sequência da poliproteína do SoyYSV apresentou uma identidade de nucleotídeos de 49% e 36% de aminoácidos com uma espécie do gênero *Brambyvirus*, o *Blackberry virus Y* (BIVY) (FIGUEIRA et al., 2019). Entretanto, as espécies do gênero *Brambyvirus* são separadas dos outros gêneros da família *Potyviridae* devido ao grande tamanho da proteína P1 com o domínio AlkB, ausente no SoyYSV (SUSAIMUTHU et al., 2008).

Uma importante diferença entre o genoma do SoyYSV e o genoma dos *Potyvirus* foi a falta dos motivos KITC e PTK da proteína HCPro, que estão envolvidos na transmissão do vírus (REVERS et al., 2015). Mesmo com a ausência desses domínios, o SoyYSV foi transmitido pelos afídeos *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*.

Os sintomas observados quando o SoyYSV foi mecanicamente inoculado, denotou que tem um alto potencial para causar danos severos às lavouras de soja no Brasil. É importante ressaltar que o SoyYSV pode infectar espécies de soja resistentes ao *Soybean mosaic virus* (SMV) e representa uma ameaça potencial à produção de soja (FIGUEIRA et al., 2019).

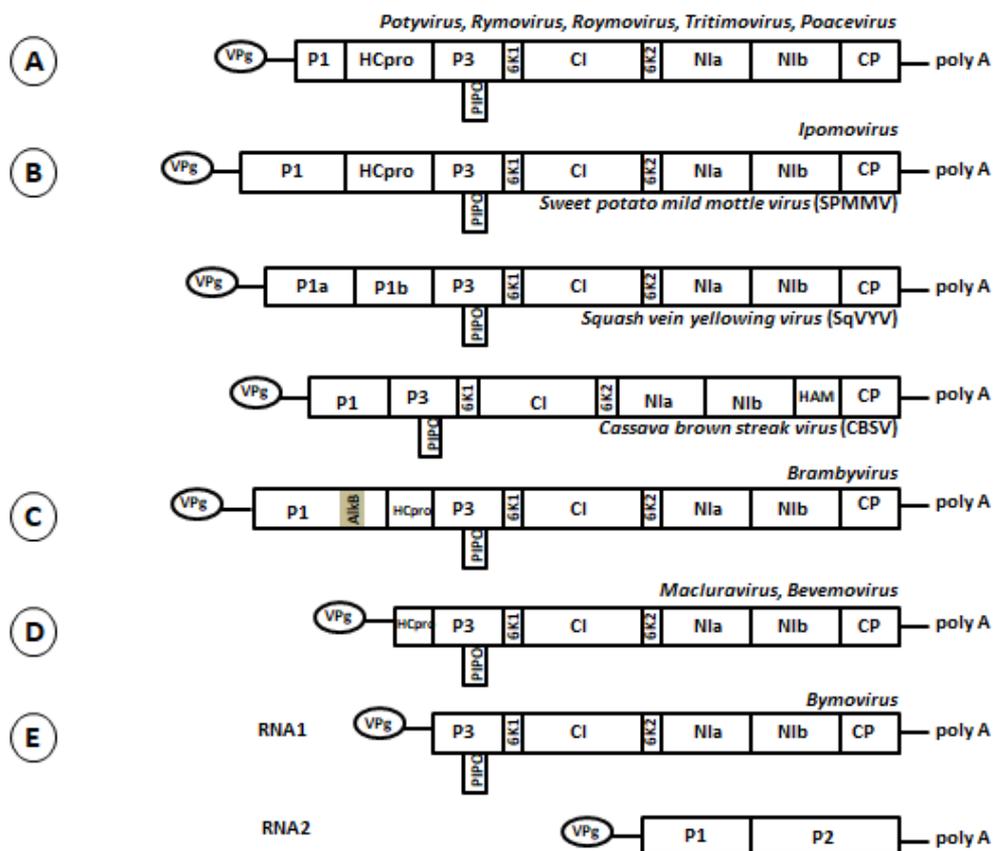
2.2 Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* possui cerca de 30% dos vírus de plantas já descritos, sendo a família mais estudada entre os fitovírus. Do ponto de vista econômico, representa um grupo de vírus importante para a agricultura, causando doenças em diversas culturas (KING et al., 2012). No último relatório do Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (ICTV), a família *Potyviridae* inclui aproximadamente 200 espécies de vírus (WYLIE et al., 2017). Segundo o ICTV as 200 espécies da família *Potyviridae* estão classificadas em dez gêneros (*Potyvirus*, *Roymovirus*, *Bevemovirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Brambyvirus* e *Poacevirus*). Esta divisão é baseada no inseto vetor, gama de hospedeiras e o número de componentes do genoma viral, que é conservado dentro da família, com exceção do gênero *Bymovirus* que apresenta genoma bipartido (WYLIE et al., 2017).

Os vírus pertencentes à família *Potyviridae* possuem partículas flexuosas e filamentosas não envelopadas, medindo de 11 a 20 nm de diâmetro, sendo que o comprimento das partículas difere entre os gêneros pertencentes a essa família. Nove entre os dez gêneros já descritos até o momento, ou seja: *Potyvirus*, *Roymovirus*, *Bevemovirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Brambyvirus* e *Poacevirus*, possuem genoma único, encapsulados em partículas medindo entre 650 nm e 950 nm de comprimento. Apenas um

gênero, o denominado *Bymovirus*, abriga espécies com genoma bipartido, encapsulados em partículas de diferentes tamanhos, sendo a menor medindo entre 250 e 330 nm e a maior entre 500 e 600 nm de comprimento (Figura 3) (WYLIE et al., 2017).

Figura 3 Mapas genômicos dos gêneros da família *Potyviridae*. **A)** Organização genômica compartilhada pelos gêneros *Potyvirus*, *Rymovirus*, *Roymovirus*, *Tritimovirus* e *Poacevirus*. **B)** Organização genômica de membros do gênero *Ipomovirus*. Diferença entre as proteínas P1 e HCPro das espécies *Squash vein yellowing virus* (SqVYV), *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV) e *Cassava brown streak virus* (CBSV). **C)** Representação do genoma de *Brambyvirus*. O domínio AlkB, que se encontra dentro da P1, está representado de cinza. **D)** Organização genômica do gênero *Macluravirus* e *Bevemovirus* evidenciando ausência da proteína P1. **E)** Organização genômica do gênero *Bymovirus*. Genoma bipartido com duas poliproteínas (RNA1 e RNA2). O retângulo preto embaixo da P3 representa a proteína PIPO (adaptado de REVERS & GARCÍA 2015).



O gênero *Brambyvirus* possui uma única espécie chamada de *Blackberry virus Y* (BIVY) que infectam hospedeiros da família *Rosaceae*. Esta espécie é considerada distinta dos outros membros da família *Potyviridae*, pois a proteína P1, com 83,6 kDa, é maior do que

a dos outros membros da família e contém um domínio AlkB ausente nos demais gêneros (Figura 3C) (HALGREN et al., 2007). A partícula dos *Brambyvirus* possui 11-15 nm de diâmetro e 800 nm de comprimento, e o genoma possui cerca de 11kb de tamanho. Além da diferença apresentada no tamanho da P1 e por ser filogeneticamente distinto de outros vírus, o restante da organização genômica dos vírus pertencentes a esse gênero é idêntica à da maioria dos vírus monopartidos pertencentes à família *Potyviridae* (SUSAIMUTHU et al., 2008).

Por outro lado, o gênero *Ipomovirus*, esta composto por oito espécies com genomas que variam de 9069–10818 nt, excluindo a cauda poli A no terminal 3' (WYLIE et al., 2017). Uma característica que as diferencia dos demais gêneros da família é que são transmitidos por mosca branca (*Bemisia tabaci*) (MARUTHI et al., 2005). A partícula viral possui um tamanho de 800-950 nm de comprimento e o genoma possui cerca de 9 a 10,8Kb. A organização genômica de SPMMV (*Sweet potato mild mottle virus*), que é a espécie tipo do gênero, é semelhante à de outros *Potyvirus*, entretanto alguns “motifs” na HCPro e na CP que são característicos de *Potyvirus*, por serem transmitidos por afídeos, não estão presentes neste grupo de vírus, o que pode contribuir para a sua relação vetorial com moscas brancas. A P1 não possui o domínio AlkB e, por isso, difere de *Brambyvirus* (ADAMS et al., 2012). *Cucumber vein yellowing virus* e *Squash vein yellowing virus* (CVYV e SqVYV) diferem de SPMMV pelo fato de a proteína P1 possuir duas cópias (P1a e P1b), sendo que a P1b possui função supressora de silenciamento gênico e pela ausência da HCPro (Figura 3B) (VALLI et al., 2006). Nenhuma relação sorológica com outros membros da família *Potyviridae* foi encontrada (ADAMS et al., 2012).

O gênero *Macluravirus* assemelha-se aos membros do gênero *Potyvirus* por serem transmitidos por pulgões, este gênero é composto por nove espécies e a espécie tipo é o *Maclura mosaic virus* (MacMV). Os vírus deste grupo são geralmente menores e se caracterizam pela ausência da proteína P1 (Figura 3D). Possuem partícula viral que variam de 650- 675 nm, e o tamanho do genoma é de 8 kb. Eles formam um grupo distinto filogeneticamente e possuem diferenças no sítio de clivagem da poliproteína (ADAMS et al., 2012).

Recentemente, dois gêneros foram propostos pelo ICTV denominados de *Bevemovirus* e *Roymovirus* (WYLIE et al., 2017; SEO et al., 2017; MOLLOV et al., 2013). O gênero *Bevemovirus*, é representado por uma única espécie, o *Bellflower veinal mottle virus* (BVMoV) que não possui a proteína P1, característica compartilhada com os membros do gênero *Macluravirus*. A proteína HCPro não possui os motivos conservados de transmissão

por pulgões dos *Potyvirus* KITC/PTK, a partícula viral tem um tamanho de 760 nm e seu genoma é de 8,259 nt (SEO et al., 2017). Por outro lado, o gênero *Rymovirus* igualmente representado por uma única espécie, o *Rose yellow mosaic virus* (RYMV), possui uma partícula viral de 750 nm e seu genoma é de 9,508 nt (MOLLOV et al., 2013).

O gênero *Rymovirus* contém apenas três vírus, que são transmitidos por populações de ácaros de forma semi-persistente. Os ácaros que transmitem os *Rymovirus* são diferentes daqueles que transmitem os vírus pertencentes ao gênero *Tritimovirus*. *Abacarus hystrix* transmite tanto RGMV (*Ryegrass mosaic virus*) quanto o AgMV (*Agropyron mosaic virus*), mas somente o primeiro é transmitido de forma eficiente. Nenhum vetor é conhecido como responsável pela transmissão de HoMV (*Hordeum mosaic virus*). As partículas desses vírus são de 690-720 nm de comprimento por 11-15 nm de largura, e o tamanho do genoma é de 9,5 kb. A espécie tipo deste gênero é *Ryegrass mosaic virus* (RGMV) (ADAMS et al., 2012).

Os vírus do gênero *Tritimovirus* são transmitidos por ácaros e formam um grupo filogenético distinto composto por seis espécies. A partícula possui 690-700 nm, e o genoma é de 9,4 a 9,6 kb. A espécie tipo do gênero é *Wheat streak mosaic virus* (WSMV). Os “motifs” presentes na poliproteína de *Potyvirus* também estão presentes nas proteínas de vírus do gênero *Tritimovirus*, entretanto alguns “motifs” na HCPro e na CP, que são característicos de *Potyvirus*, não estão presentes neste grupo de vírus, o que contribui para que as espécies pertencentes a esse gênero sejam transmitidos por ácaros (ADAMS et al., 2012).

O gênero *Bymovirus*, atualmente com seis espécies, é o único gênero dentro da família *Potyviridae* cujos membros possuem genomas bipartidos, sendo o RNA1 com 7,5 a 8,0 kb, e RNA2 com 3,5 a 4,0 kb. As duas moléculas de RNA são traduzidas em duas poliproteínas que, por sua vez, sofrem processamento proteolítico gerando 10 proteínas funcionais (Figura 3E). O tamanho da partícula viral varia de 250-300 nm e 500-600 nm, ambos com 13 nm de largura. A organização do RNA1 é semelhante à de outros *Potyvirus*, exceto pela proteína P1 que se encontra no RNA2, e a HCPro que não está presente no genoma do grupo de vírus pertencente a esse gênero. O RNA2 codifica uma poliproteína presente somente em *Bymovirus*. Acredita-se que a proteína P1 possa estar envolvida na transmissão pelo vetor. Esse vírus é transmitido pelo fungo *Polymyxa graminis* de maneira persistente, sobrevivendo em esporos, desde que estes continuem viáveis, e é transmitido também experimentalmente por inoculação mecânica. A gama de hospedeiro é restrita somente à família *Gramineae* (ADAMS et al., 2012).

No ano de 2009, Tatineni et al. propuseram um novo gênero para a família *Potyviridae*, chamado *Poacevirus*. Assim como os demais gêneros, este se caracteriza por possuir corpos de inclusão em células de plantas infectadas e por ter o genoma expressando uma poliproteína. As partículas são flexuosas filamentosas de 890 nm de comprimento e 15 nm de largura, o genoma possui tamanho de 9,7 a 10,2 kb. Apesar de serem transmitidos por ácaro, os *Poacevirus* são filogeneticamente distintos de vírus de outros gêneros que são transmitidos pelo mesmo vetor. O nome do gênero é derivado da família *Poaceae*, que é o nome da família das plantas hospedeiras. Actualmente o gênero possui três espécies (WYLIE et al., 2017).

O gênero *Potyvirus* é o mais importante e numeroso dentre os gêneros pertencentes à família *Potyviridae*, pois os vírus deste gênero infecta uma ampla variedade de plantas tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, sendo assim responsáveis por grandes perdas econômicas. Este gênero inclui os vírus transmitidos por afídeos e representa cerca 1/5 dos fitovírus já relatados (ADAMS et al., 2012). Esse gênero é caracterizado por possuir partículas filamentosas flexuosas, com 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro. O genoma dos vírus é monopartido, composto de RNA fita simples senso positivo, codificando uma única poliproteína, que após processos de clivagem geram 10 proteínas maduras e uma proteína incorporada na região codificadora para a proteína P3, denominada PIPO (Figura 3A) (KING et al., 2012). Esta ORF é traduzida e sua expressão ocorre pela fusão com a proteína P3, responsável pela replicação e desenvolvimento de sintomas na região N terminal (P3N- PIPO). A extremidade 5' do genoma dos *Potyvirus* é covalentemente ligada a uma proteína de origem viral, denominada de VPg, e a extremidade 3' é poliadenilada (ADAMS et al., 2005). A proteína CI forma inclusões cilíndricas denominadas “catavento”, que é uma característica taxonômica importante de espécies classificadas na família *Potyviridae*. Já a proteína NIB (*Nuclear inclusion b*), forma inclusões nucleares, assim como a proteína NIa (*Nuclear inclusion a - VPg-Pro*). A CP (*coat protein*) é responsável pelo movimento viral e pela transmissão do vírus pelo inseto vetor. A 6K1 é uma proteína de pequeno tamanho, porém com função desconhecida. A 6K2 é também uma proteína pequena transmembrana envolvida no processo replicativo do vírus no retículo endoplasmático (KING et al., 2012).

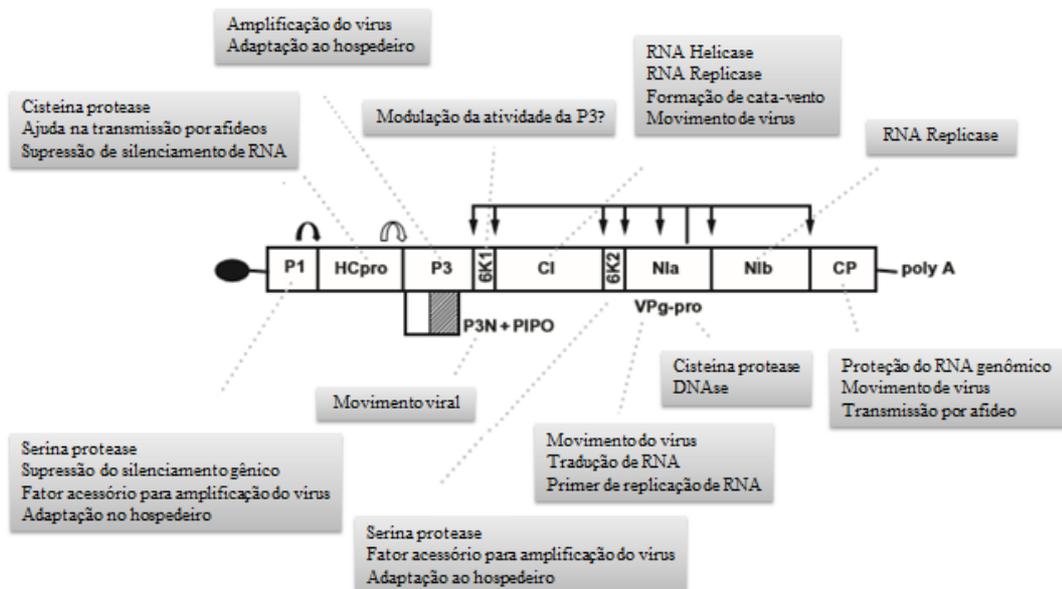
As espécies de vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus* são transmitidas naturalmente por afídeos de maneira não persistente, isto é de maneira não circulativa, requerendo assim, um período de aquisição curto de alguns segundos ou poucos minutos. Dessa forma, o período

de latência é ausente e período de retenção é curto, inferior à uma hora. Para esse tipo de transmissão, um período de jejum para a pré-aquisição aumenta a eficiência de transmissão. Um período de aquisição superior a cinco minutos diminui esta eficiência (KING et al., 2012).

2.3 Características Biológicas e Bioquímicas das Proteínas dos *Potyvirus*

As atividades das diferentes proteínas dos *Potyvirus* parecem ocorrer de uma maneira coordenada e interdependente. A grande rede de conexões com diferentes proteínas virais (e hospedeiras) provavelmente contribui para a natureza multifuncional de muitas delas (ELENA et al., 2012). As propriedades bioquímicas, estruturais e de interação, modificação pós-traducional, localização subcelular e supressão de silenciamento de RNA (RSS) se encontram resumidas na figura 3.

Figura 4 Funções relevantes das proteínas dos *Potyvirus*. A ORF PIPO é indicada como uma área listrada abaixo da região P3. A proteína VPg no terminal 5' está representada como uma elipse. As setas a partir das três proteases (P1, HCPro e NIa) indicam os sítios de clivagem na poliproteína. As funções conhecidas de cada proteína estão discriminadas nas caixas cinza.



2.3.1 P1

A proteína P1 (*Proteinase 1*) é a proteína menos conservada em sequência e mais variável em tamanho, entre os diferentes gêneros. Está envolvida na replicação, na supressão do silenciamento gênico e possui um domínio de protease de serina para a clivagem no C terminal da HCPro (Figura 3), necessário para o processo de infecção. A P1 é importante principalmente na transmissão por vetor e pela supressão do silenciamento gênico (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001). A proteína P1 dos *Potyvirus* pode ser classificada como Tipo A ou Tipo B, com base na relação filogenética, ponto isoelétrico, atividade de supressão de RNA e fatores de interação do hospedeiro (RODAMILANS et al., 2013).

Existem dados experimentais que apóiam a hipótese de que a P1 estimula a atividade de supressão de silenciamento gênico da proteína HCPro (RAJAMAKI et al., 2005; VALLI et al., 2007). Por outro lado, outros autores sugerem que o efeito na supressão desse silenciamento gênico pode ser devido ao aumento da síntese de HCPro, quando é precedido por P1, em vez de uma atividade específica da proteína P1 (TENA FERNANDEZ et al., 2013). Além disso, a P1 aumenta a infecção viral mesmo em plantas deficientes em silenciamento de RNA, o que sugere que esta proteína desempenha um papel independente da supressão do silenciamento de RNA (PASIN et al., 2014; CHENG et al., 2017).

Na recente caracterização da P1 do *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), foi encontrada uma ORF extra produzida após o deslizamento da polimerase, que origina o produto PIN-PISPO. Os ensaios de expressão transiente mostraram que a P1 do SPFMV e a PIN-PISPO apresentaram atividade de supressão de Silenciamento de RNA (RSS), o que não aconteceu com a HCPro (RODAMILANS et al., 2018).

Embora o domínio protease da P1, que se encontra na região C terminal da proteína, seja bem conservado, ela é a proteína que apresenta maior variabilidade em tamanho (de 30 a 63 kDa) e sequência (VALLI et al., 2007; YOSHIDA et al., 2012). Isto é uma consequência da grande variabilidade da sua região N terminal. (PASIN et al., 2014).

Observando a localização no ambiente subcelular, Martinez e Daros (2014) encontraram a proteína P1 do *Potyvirus Tobacco etch virus* (TEV) dentro e fora do núcleo das células infectadas de *N. benthamiana*. Outros resultados encontrados pelos mesmos autores mostraram que a proteína P1 do TEV interagiu com os ribossomos citoplasmáticos 80S do hospedeiro e se ligou especificamente às subunidades ribossômicas 60S durante o processo de

infecção, o que os levou a concluir que a proteína pode se movimentar do citoplasma para o núcleo durante o ciclo infeccioso do TEV.

2.3.2 HCPro

A proteína HCPro (*Helper Component Proteinase*) é provavelmente a proteína mais estudada nos *Potyvirus*. O nome desta proteína deriva de sua primeira função descoberta: proteinase e componente auxiliar na transmissão por pulgões (GOVIER et al., 1977). A HCPro é uma cisteína-proteinase que se auto-cliva em sua região C terminal (CARRINGTON et al., 1989; Fig. 3) e está envolvida em múltiplas funções (SYLLER et al., 2005), sendo que algumas delas derivou de sua capacidade de suprimir o silenciamento de RNA (DEL TORO et al., 2017; DUNOYER et al., 2004; IVANOV et al., 2016; GONZALEZ-JARA et al., 2005; JAY et al., 2011; KASSCHAU et al., 2003; MALLORY et al., 2002; SOITAMO et al., 2011).

Resultados recentes sugerem que a proteína HCPro pode desempenhar um papel no núcleo das células infectadas (SAHANA et al., 2014). Outros autores encontraram evidências de que a HCPro é necessária para estabilizar a CP e para o rendimento adequado e infectividade da progênie potyviral (VALLI et al., 2014).

Três domínios estruturais podem ser distinguidos na proteína HCPro: as regiões N e C terminal, de aproximadamente 100 aminoácidos, e o domínio central, de aproximadamente 250 aminoácidos (PLISSON et al., 2003). O domínio C terminal é responsável pela atividade proteolítica da proteína. A estrutura atômica deste domínio foi determinada para a HCPro do *Turnip mosaic virus* (TuMV) (GUO et al., 2011). O domínio N terminal é necessário para a transmissão do vírus por pulgões, mas a maioria das funções da HCPro é baseada na região central da proteína (VARRELMANN et al., 2007).

A HCPro demonstrou interagir com um grande número de proteínas virais e hospedeiras, (ROUDET -TAVERT et al., 2002), mas a relevância funcional dessas interações ainda necessita ser caracterizada em detalhe. Outras proteínas virais, além da CP, com as quais o HCPro pode interagir, são CI (ZILIAN et al., 2011), P1 (MERITS et al., 1999), VPg e seu precursor NIa (ROUDET-TAVERT et al., 2007). Várias proteínas das hospedeiras interagiram com a HCPro: uma proteína relacionada à calmodulina (NAKAHARA et al., 2012), o fator de transcrição induzível por etileno RAV2 (ENDRES et al., 2010) e HEN1 (JAMOUS et al., 2011); vários componentes do proteassoma PAE1, PAA, PBB e PBE

(DIELEN et al., 2011), o fator de iniciação da tradução eIF4E e eIF(iso)4E (ALA-POIKELA et al., 2011), a proteína HIP2 associada a microtúbulos (HAIKONEN et al., 2013), ferredoxina-5 precursora dos cloroplastos (CHENG et al., 2008), calreticulina (SHEN et al., 2010), proteínas com função de respostas de defesa, mediadas por ácido salicílico (SA) (POQUE et al., 2018), e enzimas ligadas ao ciclo da metionina (IVANOV et al., 2016), entre outras.

2.3.3 P3, PIPO 6K1 e 6K2

A proteína P3 (*Protein 3*) é uma das menos estudadas e caracterizadas. Ao contrário da maioria das proteínas dos *Potyvirus*, a P3, juntamente com 6K1 e 6K2, não se liga ao RNA viral (MERITS et al., 1998). A proteína P3 foi encontrada associada às inclusões cilíndricas citoplasmáticas formadas pela proteína viral CI (RODRÍGUEZ-CEREZO et al., 1993), e com inclusões nucleares formadas pelas proteínas virais NIa e NIb (LANGENBERG et al., 1997). Mais recentemente, experimentos de expressão transitória em folhas saudáveis e infectadas mostraram que a P3 é direcionada para as membranas do retículo endoplasmático (ER) e forma inclusões associadas ao aparelho de Golgi, que trafega ao longo dos filamentos de actina e colocalizam com vesículas de replicação (CUI et al., 2010; EIAMTANASATE., 2007).

A P3 interage com as proteínas potyvíricas CI, NIb e NIa (GUO et al., 2001; LIN et al., 2009; ZILIAN et al., 2011), mas até agora apenas um fator do hospedeiro, correspondente a subunidades da Rubisco, interage diretamente com a proteína P3 (LIN et al., 2011). Embora não tenha sido demonstrado um papel direto desse fator do hospedeiro na infecção por *Potyvirus*, a recente observação do envolvimento da Rubisco em infecções por *Tobamovirus* (ZHAO et al., 2013) pode sugerir um papel similar nos *Potyvirus*.

Baseado no fato de que a separação proteolítica entre P3 e 6K1 não é essencial para a infectividade do vírus, aventou-se a hipótese de que P3-6K1, ao invés de P3 e 6K1 separadas, poderia ser o principal produto funcional e o seu processamento proteolítico ocuparia um papel regulador (RIECHMANN et al., 1995). No entanto, o processamento da P3-6K1 ainda afetou a expressão dos sintomas, sugerindo que a 6K1 sozinha pode ter um papel relevante na infecção dos *Potyvirus*. Apoiando essa possibilidade, Waltermann e Maiss (2006) mostraram claramente que 6K1 do *Plum pox virus* (PPV) foi detectado exclusivamente como uma

proteína madura de 6 kDa em *Nicotiana benthamiana*, sugerindo um papel indefinido na multiplicação dos *Potyvirus* (MERITS et al., 2002). Estudos recentes utilizando clones infecciosos de *Plum pox virus* (PPV) indicaram que a proteína 6K1 é necessária para a replicação viral, no estágio inicial na infecção (CUI et al., 2016).

Antes da descoberta da P3N-PIPO, a relevância funcional de sua sequência codificadora já era notada para o vírus do gênero *Tritimovirus*, *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) (CHOI et al., 2005). Outros autores demonstraram o papel da P3N-PIPO no movimento do vírus, em conjunto com a CI e sua interação com o fator PCAP1 (*plasma membrane-associated cation-binding protein*) do hospedeiro (VIJAYAPALANI et al., 2012). Estudos mais recentes sugerem que a proteína P3 do *Turnip mosaic virus* (TuMV) tem duas funções distintas: P3-PIPO com função de movimento célula-a-célula e P3 como um componente essencial na montagem dos complexos de replicação viral (VRC) (CUI et al., 2017).

2.3.4 CI

A proteína CI (*Cytoplasmic Inclusion*) forma as inclusões cilíndricas na forma de cataventos, típicas no citoplasma de células infectadas com *Potyvirus* (EDWARDSON et al., 1996). Como mencionado acima para a proteína HCPro, a CI é uma proteína multifuncional (SOREL et al., 2014). Esta proteína possui atividades de ATPase e RNA helicase que são necessárias para a replicação do RNA viral (DENG et al., 2015).

Observações ultraestruturais e temporais das inclusões cilíndricas, bem como análises genéticas, mostram que a proteína CI age em conjunto com a P3N-PIPO, auxiliando o movimento do vírus (ZHANG et al., 2009), mas não se sabe se as atividades enzimáticas desta proteína são necessárias para esta função.

Por outro lado, a proteína CI foi encontrada associada às extremidades dos virions dos *Potyvirus*, sugerindo que ela pode ter uma função motora para ajudar na translocação do vírus, através dos plasmodesmas (PD), e na desmontagem das partículas (MOVAHED et al. 2017).

Além disso, a proteína CI atua como um fator de virulência para diferentes genes de resistência (SOREL et al., 2014). Três fatores do hospedeiro foram encontrados interagindo com a CI, o fator de iniciação da tradução eIF4E (TAVERT-ROUDET et al., 2012), um

componente do fotossistema I (PSI-K) (JIMENEZ et al., 2006) e e um ortólogo vegetal de um inibidor da proteína quinase dependente de RNA de cadeia dupla P58^{IPK} (Bilgin et al., 2008).

2.3.5 NIa e VPg

A NIa (*Nuclear Inclusion a*) é a maior proteína que forma uma inclusão cristalina produzida por muitos *Potyvirus* (KNUHTSEN et al., 1974). Essas inclusões são encontradas principalmente no núcleo, mas também podem ser detectadas no citoplasma das células infectadas (MARTÍN et al., 1992). A NIa é parcialmente processada para produzir VPg e NIaPro (DOUGHERTY et al., 1991).

Diferentes aspectos da proteína VPg (*Viral Genome-linked*) têm sido amplamente estudados. A VPg interage com uma variedade de parceiros diferentes, incluindo ela própria (ORUETXEBARRIA et al., 2001), participando em diversos processos moleculares (RANTALAINEN et al., 2011). Quando a VPg é parte da NIa, ela está localizada tanto no citoplasma quanto no núcleo das células infectadas (COTTON et al., 2009; RAJAMAKI et al., 2009), onde desempenha um papel fundamental na replicação do RNA viral (BEAUCHEMIN et al., 2007).

A VPg contém um sitio de ligação para nucleotídeos e, quando é ligada ao domínio NIaPro, preferencialmente em cis, tem atividade de NTPase (MATHUR et al., 2012). No momento, só é possível especular sobre a relevância funcional dessa atividade.

Tem sido demonstrado que a VPg pode ser fosforilada (MATHUR et al., 2012), e essa modificação após a sua tradução pode ser muito importante para a regulação de várias funções, nas quais esta proteína está envolvida. A VPg interage com a maioria das proteínas dos *Potyvirus* (ELENA & RODRIGO, 2012) e com vários fatores do hospedeiro: o fator de iniciação eucariótico eIF4E (WANG et al., 2012), a proteína nucleolar fibrilarina (RAJAMAKI et al., 2009), PABP (BEAUCHEMIN et al., 2007), e uma proteína semelhante à RNA helicase de pêssigo e *Arabidopsis* (AtRH8) que está relacionado ao eIF4A (HUANG et al., 2010).

Estudos mais recentes demonstraram que a VPg do *Turnip mosaic virus* (TuMV) atua como um supressor de silenciamento gênico pós transcricional e sugere que uma interação com o SGS3 (*suppressor of gene silencing 3*) do hospedeiro pode ser importante neste processo, promovendo a infecção viral (RAJAMAKI et al., 2014; CHENG et al., 2017).

Niapro é o domínio de protease responsável pelo processamento proteolítico das regiões central e C terminal da poliproteína dos *Potyvirus* (Figura 4) (ADAMS et al., 2005). As características funcionais do domínio Niapro foram caracterizadas em detalhes em diferentes sistemas experimentais (ADAMS et al., 2005), e a base estrutural para sua atividade e especificidade tem sido estudada por cristalografia de raios-X (SUN et al., 2010). A variação na eficiência dos diferentes locais de clivagem da Niapro, sugere que a maturação das proteínas potyvirais é altamente regulada e desempenha um papel relevante no controle da infecção por *Potyvirus*.

Além de sua atividade proteinase a Niapro possui atividade de DNase. Tem sido especulado que a degradação do DNA do hospedeiro pela proteína Niapro, localizada no núcleo, poderia desempenhar algum papel regulador na expressão do gene do hospedeiro, o que seria relevante para a infecção viral (ANINDYA et al., 2004).

2.3.6 Nib

A Nib (*Nuclear Inclusion b*), em conjunto com Niapro, forma as inclusões cristalinas mencionadas acima (KNUHTSEN et al., 1974). A Nib é a RNA polimerase dependente de RNA, ou RNA replicase, responsável pela replicação do genoma dos *Potyvirus* (HONG et al., 1996). Acredita-se que a Nib seja direcionada para as estruturas membranosas, onde tem lugar a replicação de RNA viral, interagindo com os domínios da 6K2, VPg e Niapro (DUFRESNE et al., 2008). As interações da Nib com as proteínas hospedeiras eEF1A, PABP e Hsc70-3 devem contribuir para a formação de complexos de replicação funcional (DUFRESNE et al., 2008).

Muito pouco se sabe sobre o papel que a Nib poderia desempenhar no núcleo das células infectadas (LI et al., 1997). Xiong & Wang (2013), relataram que a Nib interage com a enzima conjugadora SUMO SCE1 tanto no núcleo quanto no citoplasma, podendo ser importante para a infecção por *Potyvirus*. Também tem sido sugerido que a SUMO SCE1 poderia regular diretamente a atividade da Nib, gerando um ambiente mais favorável para a multiplicação do vírus.

2.3.7 CP

A principal função da proteína CP (*Coat Protein*) é a encapsidação do genoma viral. Cerca de 2000 subunidades de CP organizadas de forma helicoidal, ao redor do RNA genômico, formam os virions (ADAMS et al., 2012). A região central da proteína CP é altamente conservada na família *Potviridae* e forma o núcleo das partículas virais (VOLOUDAKIS et al., 2004). No entanto, também os domínios N e C terminal têm sido encontrados como essenciais para as interações entre as subunidades da CP, envolvidas no início da montagem do vírus (SEO et al., 2013).

A região N-terminal da CP é exposta na superfície da partícula viral, enquanto a localização do C terminal parece depender das espécies de *Potyvirus* (SHUKLA et al., 1988). A sequência primária da região N terminal da CP é altamente variável entre os *Potyvirus* (KSENOFONTOV et al., 2013).

Além da encapsidação do genoma viral, outras funções da CP na amplificação, movimento e transmissão do genoma foram descritas. Semelhante ao P3, foi relatado que a CP interage com a enzima Rubisco do hospedeiro (FEKI et al., 2005), que, como mencionado acima, parece ser um fator de importação para infecções virais (ZHAO et al., 2013). Assim, não se pode descartar a possibilidade de que a interação da CP dos *Potyvirus* com a Rubisco desempenhe um papel na infecção viral e/ou nas respostas defensivas das plantas. Estudos mais recentes revelaram que a CP do *Cucumber mosaic virus* (CMV) interage com a proteína ferredoxina I do cloroplasto (Fd I), levando a supressão das funções da Fd I durante a infecção viral (QUI et al. 2018).

2.4 Supressão de silenciamento gênico

O silenciamento gênico é um fenômeno conservado, que regula a expressão gênica, por meio do reconhecimento específico de sequências de transcritos de RNA (DAROS et al., 2017). Esse mecanismo é importante na manutenção da integridade do genoma da planta contra infecções, principalmente de origem viral. Porém, os vírus, além de alvos, são também indutores de silenciamento, que podem estar associados à indução de sintomas nas plantas. Há três processos básicos de silenciamento: (i) silenciamento gênico pós-transcricional (*Post-transcriptional gene silencing*, PTGS), que ocorre no citoplasma das células, e é mediado por

pequenos RNAs de interferência (*small interfering RNA*, siRNA) (WANG et al., 2012); (ii) silenciamento mediado por micro RNA (miRNA), que são codificados pela própria planta (KAMTHAN et al., 2015); e (iii) silenciamento gênico transcricional (*transcriptional gene silencing*, TGS), mediado por siRNA, associados à metilação do DNA genômico da planta (WANG et al., 2012).

O PTGS é um sistema de defesa contra patógenos bastante sofisticado, que também é ativo na regulação da expressão de genes da própria planta. Este mecanismo promove a degradação de ssRNA, incluindo mRNAs, e é ativado pela presença de dsRNA (derivados de ssRNA) que alcançam níveis elevados na célula, servindo de molde para as enzimas RNA polimerase dependentes de RNA (RdRp 1 a 6). Os dsRNAs são então clivados em fragmentos de 21 a 25 nucleotídeos (siRNA) e, por estarem sempre associados a sistemas exibindo PTGS, são considerados os marcadores desse processo. As enzimas que atuam sobre os dsRNAs são RNAses tipo III, denominadas Dicer (DCL1 a 4), sendo que os siRNAs gerados atuam como moldes para a degradação de mRNAs homólogos em um complexo de silenciamento ribonucleoproteico denominado RISC (*RNA induced silencing complex*), com a participação de proteínas argonautas (AGO) (CARBONELL et al., 2015)

Os vírus de RNA, durante o processo de replicação, produzem intermediários de dsRNA. Essas moléculas são alvos dos mecanismos de PTGS, que geram pequenos RNAs derivados do genoma viral (*virus-derived small RNA*, vsRNA), disparados por um processo denominado virus-induced gene silencing (VIGS). Ao serem processados por RISC, os vsRNAs levam a uma degradação específica de alvos (homólogos) de mRNAs e geram um sinal que é disseminado célula a célula através dos plasmodesmas e também via floema, o que garante uma distribuição sistêmica do processo. Portanto, VIGS, tem sido utilizada como uma ferramenta de silenciamento de genes virais. Dessas estratégias a que tem gerado resultados mais eficientes de silenciamento tem sido o emprego de hpRNAs separados por um intron com sequências invertidas, formando, após a transcrição do transgene, uma estrutura de RNA em grampo (hairpin). Essa tecnologia tem possibilitado a obtenção de plantas transgênicas com excelentes níveis de resistência contra vírus de RNA e DNA (GALVEZ et al., 2014; DAROS et al., 2017).

O silenciamento, como um sistema de defesa das plantas, apresenta elevada especificidade e resposta massiva no combate à invasão de moléculas (RNAs) exógenas. Entretanto, muitos vírus contra-atacam por meio da expressão de proteínas supressoras de silenciamento, inibindo os processos descritos acima e garantindo o sucesso da infecção.

Diversos genes virais já foram caracterizados, apresentando essa capacidade, dentre eles HCPro dos *Potyvirus*, P1 dos *Ipomovirus* e casos pontuais como a P1-PISPO do *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) e VPg do *Turnip mosaic virus* (TuMV) pertencentes ao gênero *Potyvirus* todos eles membros da família *Potyviridae* (REVERS et al., 2015; RODAMILANS et al., 2018; VALLI et al., 2006; GINER et al., 2010; CHENG et al., 2017; RAJAMAKI et al., 2014). Para contornar o contra-ataque dos vírus, uma das estratégias tem sido utilizar miRNAs artificiais (amiRNA) contra os supressores de silenciamento viral. Essa estratégia tem sido utilizada para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a uma série de vírus de RNA e DNA (GALVEZ et al., 2014; KAMTHAN et al., 2015).

2.5 Proteínas fluorescentes que atuam como genes marcadores

A primeira proteína fluorescente conhecida, a GFP (*Green fluorescent protein*), foi isolada por Osamu Shimomura (1962) de uma água viva bioluminescente encontrada no pacífico, denominada *Aqueora victoria*. A fluorescência desse celenterado ocorre devido à ativação de duas fosfoproteínas, a aequorina e a proteína fluorescente verde. Quando ele enfrenta uma situação adversa, a aequorina interage com íons cálcio emitindo uma luz azul que excita a GFP, que por sua vez emite luz fluorescente verde. Após vários anos da descoberta do GFP, o gene *gfp* foi clonado e sequenciado por Prasher et al. (1992) e, dois anos depois, Chalfie et al. (1994) relataram a primeira transformação genética bem sucedida utilizando o *gfp* como gene marcador, sendo que até hoje ele é um dos mais empregados entre os marcadores moleculares conhecidos.

A GFP é formada por 238 aminoácidos, com peso molecular de 27 kDa e possui um cromóforo localizado na região central, que absorve luz em picos máximos de 395 e 475 nm e emite no pico máximo de 508 nm (MATZ et al., 1999). A família das GFPs tem profundo impacto na versatilidade das técnicas disponíveis para a biologia molecular, 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 et al., 1997).

A necessidade de observar mais de uma proteína, quando expressadas ao mesmo tempo na célula, levou os pesquisadores a investigar novas possibilidades de cores contrastantes, que permitissem uma melhor visualização no ambiente celular. Nesse sentido,

uma nova proteína com características semelhantes à proteína verde fluorescente (GFP), mas com propriedades espectrais drasticamente diferentes foi descoberta. Trata-se da proteína fluorescente vermelha denominada de DsRed isolada a partir de um coral marinho conhecido cientificamente por *Discosoma* sp., esta proteína fluorescente necessita de um comprimento de onda - cerca de 583 nm - para sua visualização, o que definitivamente facilita sua distinção e uma atraente opção para ser empregada ao mesmo tempo com a GFP (MÁS et al., 2000). Após a sua descoberta, muitos outros mutantes foram, também, obtidos, visando melhorar a sua eficiência (BAIRD et al., 2000).

Atualmente, mais de 35 proteínas autofluorescentes (AFPs), que abrangem uma gama de emissões do azul ao vermelho, do espectro visível (460-595nm), já 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 como, por exemplo, interação proteína-proteína ou expressão de marcadores fluorescentes distintos na mesma célula (STEWART JUNIOR, 2006).

2.6 Sistema de clonagem: Gateway

Na tentativa de facilitar o processo de clonagem, foi desenvolvida uma plataforma de clonagem chamada Gateway, baseada nas propriedades de recombinação do bacteriófago lambda (LANDY, 1989). O bacteriófago lambda se integra no cromossomo da bactéria *Escherichia coli* alternando entre os ciclos lisogênico (integração) e lítico (excisão) (PTASHNE, 1992). A integração ocorre com a participação das proteínas integrase do bacteriófago lambda e fatores de Integração do hospedeiro de *E. coli*, que no sistema Gateway são combinados na produção da BP clonase. A excisão utiliza estas mesmas proteínas acrescidas da excisionase do bacteriófago lambda, reunidas no sistema Gateway formando a LR clonase. Esta recombinação ocorre através de sequências específicas chamadas attachment (att) sites, presentes na bactéria e no bacteriófago, sendo esta reação direcional e específica (GOODIN et al., 2007).

Na técnica Gateway, a clonagem é realizada em duas reações. Na primeira reação chamada de reação BP, ocorre a recombinação entre os sítios attB1/attB2, inseridos por PCR no gene a ser clonado, e os sítios attP1/attP2, presentes no vetor de entrada (pDONR), gerando um clone de entrada no sistema. Na segunda reação, chamada de reação LR, ocorre a

recombinação entre os sítios attL1/attL2, presentes no clone de entrada, e os sítios attR1/attR2, presentes no vetor de destinação escolhido, que vai permitir 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. (GOODIN et al., 2007).

Pela eficiência, adaptabilidade e compatibilidade apresentadas pela técnica Gateway, torna-se extremamente favorável à utilização desta plataforma na construção de vetores de expressão, pois a possibilidade de realizar a transferência dos genes de interesse, para vetores de destinação com aplicações distintas, acelera sobremaneira os estudos de caracterização de genes (WILLE et al., 2015).

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

Atualmente, *Nicotiana benthamiana* é uma das plantas modelo mais utilizadas em experimentos de virologia vegetal, por ser hospedeiro de uma grande variedade de vírus, fato atribuído à presença natural nesta planta de uma mutação no RNA dependente de RNA polimerase (RDRP1), reduzindo sua eficiência de silenciamento gênico (YANG et al., 2004). Adicionalmente, *N. benthamiana* é suscetível a uma ampla gama de agentes patôgenos, como bactérias, oomicetos e fungos, tornando-se uma ferramenta valiosa no estudo da relação patógeno-hospedeiro de diferentes patossistemas.

Apesar de *N. benthamiana* ser muito utilizada por virologistas, estudos voltados à biologia molecular só se iniciaram em função do avanço de três técnicas. A primeira 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 (ESCOBAR et al., 2003; LUCAS et al., 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). Curiosamente, assim como para VIGS, a 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 características que permitem o uso de corantes para o núcleo, membrana e outra estrutura relevante dentro da célula (GOODIN et al., 2005, 2007). 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. Plantas de *N. benthamiana* tem sido essencial para estudos de interação proteína-proteína. Segundo Ohad et al. (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 homocigota para o gene mGFP-ER (SIEMERING et al., 1996), expressando proteína fluorescente verde (GFP) no retículo endoplasmático (ER) (BRIGNETTI et al., 1998; RUIZ et al., 1998). Chakrabarty et al. (2007) substituíram o *gfp* do mGFP-ER por *rfp* que codifica a RFP (Red fluorescent 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 (cyan fluorescent protein-CFP) foi fusionada à histona 2B, originando plantas de *N. benthamiana* que possuem um marcador fluorescente 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.

O entendimento do processo de replicação dos *Potyvirus* tem avançado enormemente durante os últimos anos. Isto foi possível graças, principalmente, à combinação de várias técnicas: a expressão fácil e eficiente de proteínas virais fusionadas a marcadores fluorescentes em plantas (particularmente via *Agrobacterium* em plantas de *N. benthamiana*), seu rastreamento em células utilizando microscopia confocal, e disponibilidade de clones de cDNA infecciosos de *Potyvirus*, frequentemente expressando proteínas virais marcadas com proteínas fluorescentes.

3 REFERENCIAS

ADAMS, M. J.; ZERBINI, F. M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D. C.; VALKONEN, J. P. T. Family *Potyviridae*. Virus Taxonomy, Nine Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. Academic Press, New York, p. 1069-1089, 2012.

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. Archives of Virology, v.150, p.459- 479, 2005.

ALA-POIKELA, M., GOYTIA, E., HAIKONEN, T., RAJAMAKI, M. L., & VALKONEN, J. T. Helper component proteinase of genus *Potyvirus* is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E that contains a 4E binding motif. Journal of Virology, v. 85, p. 6784-6794. 2011.

ANINDYA, R., & SAVITHRI, H. S. Potyviral NIa proteinase, a proteinase with novel deoxyribonuclease activity. Journal of Biological Chemistry, v. 279, p. 32159-32169, 2004.

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.

BEAUCHEMIN, C., BOUTET, N., & LALIBERTE, J. F. Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of *Turnip mosaic virus*, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in planta. Journal of Virology, v. 81, p. 775-782, 2007.

BILGIN, D.D. et al. Elevated Ozone Alters Soybean-Virus Interaction. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 21, p. 1297-1308, 2008.

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.

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.

CARRINGTON, J. C., FREED, D. D., & SANDERS, T. C. Autocatalytic processing of the Potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. *Journal of Virology*, v. 63, p. 4459-4463, 1989.

CARBONELL, A.; CARRINGTON, J. C. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 27, p. 111-117, 2015.

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.

CHENG, X., & WANG, A. The *Potyvirus* silencing suppressor protein VPg mediates degradation of SGS3 via ubiquitination and autophagy pathways. *Journal of Virology*, v. 91, e01478-16, 2017.

CHENG, Y. Q., LIU, Z. M., XU, J., ZHOU, T., WANG, M., CHEN, Y.T., et al. HCPro protein of sugar cane mosaic virus interacts specifically with maize ferredoxin-5 in *vitro* and in planta. *Journal of General Virology*, v. 89, p. 2046-2054, 2008.

CHOI, I. R., HORKEN, K. M., STENGER, D. C., & FRENCH, R. An internal RNA element in the P3 cistron of *Wheat streak mosaic virus* revealed by synonymous mutations that affect both movement and replication. *Journal of General Virology*, v. 86, p. 2605-2614, 2005.

COTTON, S., GRANGEON, R., THIVIERGE, K., MATHIEU, I., IDE, C., WEI, T., et al. Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. *Journal of Virology*, v. 83, p. 10460-10471, 2009.

CUI, X., YAGHMAIEAN, H., WU, G., WU, X., CHEN, X., THORN, G., WANG, A. The C-terminal region of the *Turnip mosaic virus* P3 protein is essential for viral infection via targeting P3 to the viral replication complex. *Virology*, v. 510, p. 147-155, 2017.

CUI, X., & WANG, A. Plum pox virus 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early stage of infection. *Journal of Virology*, v. 90, p. 5119-5131, 2016.

CUI, X., WEI, T., CHOWDA-REDDY, R. V., SUN, G., & WANG, A. The *Tobacco etch virus* P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology*, v. 397, p. 56-63, 2010.

DEL TORO, F. J., DONAIRE, L., AGUILAR, E., CHUNG, B., TENLLADO, F., CANTO, T. Potato virus Y HCPro suppression of antiviral silencing in *Nicotiana benthamiana* plants correlates with its

- ability to bind in vivo to 21-and 22-nucleotide small RNAs of viral sequence. *Journal of Virology*, v.91, e00367-17, 2017.
- DENG, P., WU, Z., & WANG, A. The multifunctional protein CI of Potyvirus es plays interlinked and distinct roles in viral genome replication and intercellular movement. *Virology Journal*, v. 12, p. 141, 2015.
- DESLANDES, J. A.; COSTA, A. S.; FIGUEIRA, A. R. Amarelo do broto da soja causado por Potyvirus diferente do mosaico comum, registrado em Minas Gerais. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 10, n. 1/2, p. 25-26, 1984.
- DIELEN, A. S., SASSAKI, F. T., WALTER, J., MICHON, T., MENARD, G., PAGNY, G., et al. The 20S proteasome $\alpha 5$ subunit of *Arabidopsis thaliana* carries an RNase activity and interacts in planta with the *Lettuce mosaic virus* HCPro protein. *Molecular Plant Pathology*, v. 12, p. 137-150, 2011.
- DOUGHERTY, W. G., & DAWN PARKS, T. Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: Identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology*, v. 183, p. 449-456, 1991.
- DUFRESNE, P. J., THIVIERGE, K., COTTON, S., BEAUCHEMIN, C., IDE, C., UBALIJORO, E., et al. Heat shock 70 protein interaction with *Turnip mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology*, v. 274, p. 217-227, 2008.
- 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 State of America*, Washington, v. 94, n. 26, p. 4837-4842, 1997.
- EDWARDSON, J. R., & CHRISTIE, R. G. Cylindrical inclusions. Gainesville, FL, USA: University of Florida, Agricultural Experiment Station, Bulletin 894, 1996.
- ELENA, S. F., & RODRIGO, G. Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. *Current Opinion in Virology*, v. 2, p. 719-724, 2012.
- EIAMTANASATE, S., JURICEK, M., & YAP, Y. C-terminal hydrophobic region leads PRSV P3 protein to endoplasmic reticulum. *Virus Genes*, v. 35, p. 611-617, 2007.
- ENDRES, M. W., GREGORY, B. D., GAO, Z., FOREMAN, A. W., MLOTSHWA, S., GE, X., et al. Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathogens*, v. 6, e1000729, 2010.
- 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.
- FEKI, S., LOUKILI, M. J., TRIKI-MARRAKCHI, R., KARIMOVA, G., OLD, I., OUNOUNA, H., et al. Interaction between tobacco ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Rubisco-LSU) and the PVY coat protein (PVY-CP). *European Journal of Plant Pathology*, v. 112, p. 221-234, 2005.

FIGUEIRA, A. R.; COSTA, A. S.; REIS, C. H. Mosaico dourado em certas variedades de soja e feijoeiro associado à infecção pelo vírus do Amarelo do Broto da soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 12, n. 2, p. 145-149, abr./jun. 1987.

FIGUEIRA, A. R.; ALVES, A. M. C.; KITAJIMA, E. Studies with *Soybean yellow shoot virus*: new Potyvirus detected in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 81, n. 6, p. 83-93, nov./dez. 1991.

FIGUEIRA, A.R., GERALDINO-DUARTE, P.S., NUÑEZ, A.M.P., VAN LENT, J., GALVINO-COSTA, S.B.F., FARMAN, M., GOODIN, M. M. Characterization of *Soybean yellow shoot virus*, a new member of the family *Potyviridae* infecting Soybean plants in Brazil. *Plant Disease*, 2019.

GALVEZ, L. C. et al. Engineered plant virus resistance. *Plant Science*, v. 228, p. 11-25, 2014.

GONZALEZ-JARA, P., ATENCIO, F. A., MARTINEZ-GARCIA, B., BARAJAS, D., TENLLADO, F., & DIAZ-RUIZ, J.R. A single amino acid mutation in the plum pox virus helper component-proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities. *Phytopathology*, v. 95, p. 894-901, 2005.

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

GOODIN, M. M. et al. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions: review. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 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.

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

GOVIER, D. A., KASSANIS, B., & PIRONE, T.P. Partial purification and characterization of the *Potato Virus Y* helper component. *Virology*, v. 78, p. 306-314, 1977.

GUO, B., LIN, J., & YE, K. Structure of the autocatalytic cysteine protease domain of Potyvirus helper-component proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 21937-21943, 2011.

GUO, D. Y., RAJAMAKI, M. L., SAARNA, M., & VALKONEN, J. P. T. Towards a protein interaction map of Potyvirus es: Protein interaction matrixes of two Potyvirus es based on the yeast two-hybrid system. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 935-939, 2001.

HAIKONEN, T., RAJAMAKI, M. L., TIAN, Y.P., & VALKONEN, J. P. T. Mutation of a short variable region in HCPro protein of *Potato virus A* affects interactions with a microtubule-associated protein and induces necrotic responses in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 26, p. 721-733, 2013.

- HALGREN, A.; TZANETAKIS, I. E.; MARTIN, R. R. Identification, characterization, and detection of *Black raspberry necrosis virus*. *Phytopathology*, v. 97, p. 44-50, 2007.
- HONG, Y., & HUNT, A. G. RNA polymerase activity catalyzed by a Potyvirus -encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*, v. 226, p. 146-151, 1996.
- HUANG, T. S., WEI, T., LALIBERTE, J. F., & WANG, A. A host RNA helicase-like protein, AtRH8, interacts with the potyviral genome-linked protein, VPg, associates with the virus accumulation complex, and is essential for infection. *Plant Physiology*, v. 152, p. 255-266, 2010.
- IVANOV, K. I., ESKELIN, K., BASIC, M., DE, S., LOHMUS, A., VARJOSALO, M., & MAKINEN, K. Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro. *The Plant Journal*, v. 85, p. 30-45, 2016.
- JAY, F., WANG, Y., YU, A., TACONNAT, L., PELLETIER, S., COLOT, V., et al. Misregulation of Auxin Response Factor 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in arabidopsis. *PLoS Pathogens*, v. 7, e1002035, 2011.
- JAMOUS, R. M., BOONROD, K., FUELLGRABE, M. W., ALI-SHTAYEH, M. S., KRCZAL, G., & WASSENEGGER, M. The helper component-proteinase of the *Zucchini yellow mosaic virus* inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity *in vitro*. *Journal of General Virology*, v. 92, p. 2222-2226, 2011.
- JIMENEZ, I., LOPEZ, L., ALAMILLO, J. M., VALLI, A., & GARCIA, J. A. Identification of a *Plum pox virus* CI-interacting protein from chloroplast that has a negative effect in virus infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 19, p. 350-358, 2006.
- KAMTHAN A. et al. Small RNAs in plants: development and application for Crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 208, 2015.
- KASSCHAU, K. D., XIE, Z. X., ALLEN, E., LLAVE, C., CHAPMAN, E. J., KRIZAN, K. A., et al. P1-HCPro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Developmental Cell*, v. 4, p. 205-217, 2003.
- KING, A.M.Q., LEFKOWITZ, E., ADAMS, J.M., CARSTENS, E.B. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy*, 1327p, 2012.
- KNUHTSEN, H., HIEBERT, E., & PURCIFULL, D. E. Partial purification and some properties of tobacco etch virus induced intranuclear inclusions. *Virology*, v. 61, p. 200-209, 1974.
- KSENOFONTOV, A. L., PAALME, V., ARUTYUNYAN, A. M., SEMENYUK, P. I., FEDOROVA, N. V., RUMVOLT, R., et al. Partially disordered structure in intravirus coat protein of *Potyvirus Potato virus A*. *PLoS One*, v. 8, e67830. 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.

- LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*, 58: 913-949, 1989.
- LANGENBERG, W. G., & ZHANG, L. Y. Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology*, v. 118, p. 188-195, 1997.
- LI, X. H., VALDEZ, P., OLVERA, R. E., & CARRINGTON, J. C. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): Subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *Journal of Virology*, v. 71, p. 1598-1607, 1997.
- LIN, L., LUO, Z., YAN, F., LU, Y., ZHENG, H., & CHEN, J. Interaction between Potyvirus P3 and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) of host plant. *Virus Genes*, v. 43, p. 90-92, 2011.
- LIN, L., SHI, Y., LUO, Z., LU, Y., ZHENG, H., YAN, F., et al. Protein-protein interactions in two potyviruses using the yeast two-hybrid system. *Virus Research*, v. 142, p. 36-40, 2009.
- 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.
- MALLORY, A. C., REINHART, B. J., BARTEL, D., VANCE, V. B., & BOWMAN, L. H. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 15228-15233, 2002.
- MARTÍNEZ, F.; DAROS, J.A. *Tobacco etch virus* protein P1 traffics to the nucleolus and associates with the host 60S ribosomal subunits during infection. *Journal of Virology*, v. 88, n. 18, p. 10725-10737. 2014.
- MARTIN, K. M. 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, M. T., GARCIA, J. A., CERVERA, M. T., GOLDBACH, R. W., & VAN LENT, J. W. M. Intracellular localization of three non-structural plum pox Potyvirus proteins by immunogold labelling. *Virus Research*, v. 25, p. 201-211, 1992.
- MARUTHI, M.N., HILLOCKS, R.J., MTUNDA, K., RAYA, M.D., MUHANNA, M., KIOZIA, H., REKHA, A.R., COLVIN, J., THRESH, J.M. Transmission of *Cassava brown streak virus* by *Bemisia tabaci* (*Gennadius*). *Journal Phytopathology*, v. 153, p. 307-312, 2005.
- MÁS, P. et al. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature*, London, v. 408, n. 6809, p. 207-211, Nov. 2000.
- MATHUR, C., JIMSHEENA, V. K., BANERJEE, S., MAKINEN, K., GOWDA, L. R., & SAVITHRI, H. S. Functional regulation of PVBV Nuclear Inclusion protein-a protease activity upon interaction with Viral Protein genome-linked and phosphorylation. *Virology*, v. 422, p. 254-264, 2012.

- MATHUR, C., & SAVITHRI, H. S. Novel ATPase activity of the polyprotein intermediate, viral protein genome-linked-nuclear inclusion-a protease, of *Pepper vein banding Potyvirus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 427, p. 113-118, 2012.
- MATZ, M. V., FRADKOV, A. F., LABAS, Y. A., SAVITSKY, A. P., ZARAIISKY, A. G., MARKELOV, M. L., LUKYANOV, S. A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*, v. 17, p. 969-973. 1999.
- MERITS, A., RAJAMAKI, M. L., LINDHOLM, P., RUNEBERG-ROOS, P., KEKARAINEN, T., PUUSTINEN, P., et al. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *Journal of General Virology*, v. 83, p. 1211-1221, 2002.
- MERITS, A., GUO, D., JARVEKULG, L., & SAARNA, M. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A Potyvirus -encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology*, v. 263, p. 15-22, 1999.
- MOLLOV, D., LOCKHART, B., ZLESAK, D. Complete nucleotide sequence of rose yellow mosaic virus, a novel member of the family *Potyviridae*. *Archive Virology*, v. 158, p. 1917-1923, 2013.
- MOVAHED, N., PATARROYO, C., SUN, J., VALI, H., LALIBERTE, J.F., & ZHENG, H. Cylindrical inclusion protein of *Turnip mosaic virus* serves as a docking point for the intercellular movement of viral replication vesicles, *Plant Physiology*, v. 175, p. 1732-1744, 2017.
- NAKAHARA, K. S., MASUTA, C., YAMADA, S., SHIMURA, H., KASHIHARA, Y., WADA, T. S., et al. Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*, v. 109, p. 10113-10118, 2012.
- 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.
- ORUETXEBARRIA, I., GUO, D. Y., MERITS, A., MAKINEN, K., SAARMA, M., & VALKONEN, J. P. T. Identification of the genome-linked protein in virions of *Potato virus A*, with comparison to other members in genus *Potyvirus* . *Virus Research*, v. 73, p. 103-112, 2001.
- PASIN, F., SIMON-MATEO., & GARCIA, J.A. The hypervariable amino-terminus of P1 protease modulates potyviral replication and host defense responses. *PLoS Pathogens*, v. 10, e1003985, 2014.
- PLISSON, C., DRUCKER, M., BLANE, S., GERMAN-RETANA, S., LE GALL, O., THOMAS, D., et al. Structural characterization of HCPro, a plant virus multifunctional protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 23753-23761, 2003.
- POQUE, S., WU, H.W., HUANG, C. H., CHENG, H. W., HU, W.C., YANG. D.W., YEH. S. D. Potyviral Gene-Silencing Suppressor HCPro Interacts with Salicylic Acid (SA)-Binding Protein 3 to Weaken SA-Mediated Defense Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 31, p. 86-97. 2018.

PRASHER, D.D., ECKENRODE, W. K., WARD, W. W., PREDERGAST, F. G., CORMIER, M. J. Primary structure of the *Aequorea Victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, v. 111, p. 229-233, 1992.

PTASHNE, M. A Genetic Switch: Phage (Lambda) and Higher Organisms (Cambridge, MA: Cell Press), 1992.

QUI, Y., ZHANG, Y., WANG, CH., LEI, R., WU, Y., LI, X., & ZHU, S. Cucumber mosaic virus coat protein induces the development of chlorotic symptoms through interacting with the chloroplast ferredoxin I protein. *Scientific Reports*, v, 8:205, 2018.

RAJAMAKI, M. L., STRENG, J., & VALKONEN, J. P. T. Silencing suppressor protein VPg of a *Potyvirus* interacts with the plant silencing-related protein SGS3. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 27, p. 1199-1210, 2014.

RAJAMAKI, M. L., & VALKONEN, J. P. T. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of Picorna-like *Potato virus A* in *Nicotiana* species. *The Plant Cell*, v. 21, p. 2485-2502, 2009.

RAJAMAKI, M. L., KELLONIEMI, J., ALMINAITE, A., KEKARAINEN, T., RABENSTEIN, F., & VALKONEN, J. P. A novel insertion site inside the *Potyvirus* P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. *Virology*, v. 342, p. 88-101, 2005.

RANTALAINEN, K. I., ESKELIN, K., TOMPA, P., & MAKINEN, K. Structural flexibility allows the functional diversity of *Potyvirus* genome-linked protein VPg. *Journal of Virology*, v. 85, p. 2449-2457, 2011.

REVERS, F., & GARCÍA, J. A. Molecular Biology of *Potyvirus* es. *Adv. Virus 581 Res*, v. 92, p. 101-199, 2015.

RIECHMANN, J.L., CERVERA, M. T., & GARCIA, J.A. Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 951-956, 1995.

RODAMILANS, B., VALLI, A., & GARCIA, J.A. Mechanistic divergence between P1 proteases of the family *Potyviridae*. *Journal General Virology*, v. 94, p. 1407–1414, 2013.

RODAMILANS, B., VALLI, A., MINGOT, A., LEON, S. D., LOPEZ-MOYA, J. J., & GARCIA, J.A. An atypical RNA silencing suppression strategy provides a snapshot of the evolution of sweet potato-infecting *Potyvirus* es. *Scientific Reports*, v.8, 15937, 2018.

RODRIGUEZ-CEREZO, E., AMMAR, E., PIRONE, E. D., & SHAWN, J. G. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in *Potyvirus* -infected cells. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 1945-1939. 1993.

ROUDET-TAVERT, G., GERMAN-RETANA, S., DELAUNAY, T., DELECOLLE, B., CANDRESSE, T., & LE GALL, O. Interaction between *Potyvirus* helper component-proteinase and capsid protein in infected plants. *Journal of General Virology*, v. 83, p. 1765-1770, 2002.

ROUDET-TAVERT, G., MICHON, T., WALTER, J., DELAUNAY, T., REDONDO, E., & LE GALL, O. Central domain of a Potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor Eif4e and the viral protein HCPro. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 1029-1033, 2007.

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

SAHANA, N. et al. The asparagine residue in the FRNK box of potyviral helper-component protease is critical for its small RNA binding and subcellular localization. *Journal of General Virology*, v. 95, p. 1167-1177. 2014.

SANTOS, C. S. Caracterização parcial de um novo Potyvirus detectado em *Glycine max* L (Merril). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 64 p. 2000.

SEO, J. K., VO PHAN, M. S., KANG, S. H., CHOI, H. S., & KIM, K. H. The charged residues in the surface-exposed C-terminus of the *Soybean mosaic virus* coat protein are critical for cell-to-cell movement. *Virology*, v. 446, p. 95-101, 2013.

SEO, J.K., KWAK, H.R., KIM, M.K., KIM, J.S., CHOI, H.S. The complete genome sequence of a novel virus, *bellflower veinal mottle virus*, suggests the existence of a new genus within the family Potyviridae. *Archive Virology*, v. 162, p. 2457-2461, 2017.

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.

SHEN, W., YAN, P., GAO, L., PAN, X., WU, J., & ZHOU, P. Helper component-proteinase (HCPro) protein of *Papaya ringspot virus* interacts with papaya calreticulin. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, p. 335-346, 2010.

SHUKLA, D. D., STRIKE, P. M., TRACY, S. L., GOUGH, K. H., & WARD, C. W. The N and C termini of the coat proteins of Potyviruses are surface-located and the N-terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology*, v. 69, p. 1497-1508, 1988.

SOITAMO, A. J., JADA, B., & LEHTO, K. HCPro silencing suppressor significantly alters the gene expression profile in tobacco leaves and flowers. *BMC Plant Biology*, 11, 68, 2011.

SOREL, M., GARCIA, J. A., & GERMAN-RETANA, S. The Potyviridae cylindrical inclusion helicase: A key multipartner and multifunctional protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 27, p. 215-226, 2014.

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.

SUN, P., AUSTIN, B. P., TOZSER, J., & WAUGH, D. S. Structural determinants of tobacco vein mottling virus protease substrate specificity. *Protein Science*, v. 19, p. 2240-2251, 2010.

SUSAIMUTHU, J.; TZANETAKIS, I. E.; GERGERICH, R. C.; MARTIN, R. R. A member of a new genus in the *Potyviridae* infects *Rubus*. *Virus Research*, 131, p. 145-151, Oct. 2008.

SYLLER, J. The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by Potyviruses and caulimoviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 67, p. 119-130, 2005.

TATINENI, S.; ZIEMS, A. D.; WEGULO, S. N.; FRENCH, R. Triticum mosaic virus: a distinct member of the family potyviridae with an unusually long leader sequence. *Phytopathology*, v. 99, n. 8, p. 943-950, 2009.

TAVER-ROUDET, G., ABDUL-RAZZAK, A., DOUBLET, B., WALTER, J., DELAUNAY, T., GERMAN-RENATA, S., et al. The C terminus of lettuce mosaic Potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *Journal of General Virology*, v. 93, p. 184-193, 2012.

TENA FERNANDEZ, F., GONZALEZ, I., DOBLAS, P., RODRIGUEZ, C., SAHANA, N., KAUR, H., et al. The influence of cis-acting P1 protein and translational elements on the expression of *Potato virus Y* HC-Pro in heterologous systems and its suppression of silencing activity. *Molecular Plant Pathology*, v. 14, p. 530-541, 2013.

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.

URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A.L., & BERNARDI, F. Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Research*, v. 74, p. 157-175, 2001.

VALLI, A., GALLO, A., CALVO, M., PEREZ, J. D. J., GARCIA, J. A. A novel role of the potyviral helper component proteinase contributes to enhance the yield of viral particles. *Journal of Virology*, v. 88, p. 9808-9818, 2014.

VALLI, A.; LOPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family *Potyviridae*. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 1016-1028, 2007.

VALLI, A.; MARTIN-HERNANDEZ, A. M.; LOPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of Cucumber vein yellowing Ipomovirus, a member of the family Potyviridae that lacks the cysteine protease HC-Pro. *J. Virol.*, v. 80, p. 10055-10063, 2006.

VARRELMAN, M., MAIS, E., PILOT, R., & PALKOVICS, L. Use of pentapeptide-insertion scanning mutagenesis for functional mapping of the plum pox virus helper component proteinase suppressor of gene silencing. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 1005-1015, 2007.

VIJAYAPALANI, P., MAESHIMA, M., NAGASAKI-TAKEKUCHI, N., MILLER, W. A. Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLoS Pathogens*, v. 8, e1002639, 2012.

VOLOUDAKIS, A. E., MALPICA, C. A., ALEMAN-VERDAGUER, M. E., STARK, D. M., FAUQUET, C. M., & BEACHY, R. N. Structural characterization of Tobacco etch virus coat protein mutants. *Archives of Virology*, v. 149, p. 699-712, 2004.

WALTERMANN, A., & MAISS, E. Detection of 6K1 as a mature protein of 6 kDa in plum pox virus-infected *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 2381-2386, 2006.

WANG, A., & KRISHNASWAMY, S. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Molecular Plant Pathology*, v. 13, p. 795-803, 2012.

WILLE, T., BARLAG, B., JAKOVJEVIC, V., HENSEL, M., SOURJIK, V., GERLACH, R. G. A Gateway-based system for fast evaluation of protein-protein interactions in bacteria. *PLoS One*, 10(4): e0123646, 2015.

WYLIE, S.J., ADAMS, M., CHALAM, C., KREUZE, J., LOPEZ-MOYA, J.J., OHSHIMA, K., PRAVEEN, S., RABENSTEIN, F., STENGER, D., WANG, A. AND MURILO ZERBINI, F. ICTV virus taxonomy profile: Potyviridae. *Journal General Virology*, v. 98, p. 352–354, 2017.

XIONG, R., & WANG, A. SCE1, the SUMO-conjugating enzyme in plants that interacts with Nib, the RNA-dependent RNA polymerase of *Turnip mosaic virus* is required for viral infection. *Journal of Virology*, v. 7, p. 4704-4715, 2013.

YANG, S.J.; CARTER, S.A; COLE, A.B.; CHENG, N.H.; NELSON, R.S.A. Natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.101, p. 6297-6302, 2004.

YOSHIDA, N., SHIMURA, H., YAMASHITA, K., SUZUKI, M., & MASUTA, C. Variability in the P1 gene helps to refine phylogenetic relationships among leek yellow stripe virus isolates from garlic. *Archives of Virology*, v. 157, p. 147-153, 2012.

ZHANG, C., HAJIMORAD, M. R., EGGENBERGER, A. L., TSANG, S., WHITHAM, S. A., & HILL, J. H. Cytoplasmatic inclusion cistron of *Soybean mosaic virus* serves as a virulence determinant on *Rsv3*-genotype soybean and symptom determinant. *Virology*, v. 391, p. 240-248, 2009.

ZHAO, J., LIU, Q., ZHANG, H., JIA, Q., HONG, Y., & LIU, Y. The Rubisco small subunit is involved in tobamovirus movement and Tm-2² –mediated extreme resistance. *Plant Physiology*, v. 161, p. 374-383, 2013.

ZILIAN, E., & MAISS, E. Detection of plum pox potyviral protein-protein interactions in planta using an optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system. *Journal of General Virology*, v. 92, p. 2711-2723, 2011.

CAPITULO 2. EXPRESSION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF *Soybean yellow shoot virus* PROTEINS: A NOVEL MEMBER OF THE FAMILY *Potyviridae* IN BRAZIL

**EXPRESSION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF *Soybean yellow shoot virus*
PROTEINS: A NOVEL MEMBER OF THE FAMILY *Potyviridae* IN BRAZIL**

Andrés M.P. Nuñez¹, Antonia R. Figueira^{1*}, Sergio B. Fernandes¹, Silvino I. Moreira¹, Priscila G. Duarte¹.

Department of ¹Plant Pathology, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author: Department of Plant Pathology, Lavras Federal University, Lavras 37200-000, Minas Gerais, Brazil. E-mail address: antonia@dfp.ufla.br (A.R. Figueira).

ABSTRACT

A new species of virus in Brazil was characterized recently, belonging to the *Potyviridae* family, it is called *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV). Results obtained on its effects on the plant have revealed that this virus has a high potential to cause severe damages to crop production and productivity, representing a potential threat to the soybean crop. Thus, studies involving the understanding of the mechanisms of virus-plant interaction are important for the basis of control measures that aim to obtain plants resistant to the viruses. In our work the transient expression of the genes coding for the viral proteins P1 (*Proteinase 1*), HCPro (*Helper Component Proteinase*), P3 (*Protein 3*), PIPO (*Pretty Interesting Potyvirus ORF*), 6K1 (*Protein of 6kDa*), NIa (*Nuclear Inclusion a*), NIB (*Nuclear Inclusion b*), and CP (*Coat Protein*) of the SoyYSV, were cloned into the entry clone plasmid of the Gateway system (PDONR221). After cloning, it was subcloned into the pSITE expression vector fused to the GFP fluorescence protein and expressed by *Agrobacterium tumefaciens*, in two lines of *Nicotiana benthamiana* transgenic plants expressing the RFP fluorescent protein, in order to determine its location in the subcellular environment and to infer about its possible function in the process of pathogen infection. The analysis of the agroinfiltrated plants, in confocal microscope, showed that the proteins P1, HCPro and Nia, were located in the nucleus and in the cytoplasm; the P3 and Nib proteins were accommodated in the cytoplasm, nucleus and nucleolus, whereas the PIPO and 6K1 proteins were located in the cell membranes in the cytoplasm. The CP protein accumulated exclusively in the nuclear periphery. This study of the localization of SoyYSV proteins in the host plant, through transient expression mediated by *A.tumefaciens*, has been shown to be an important tool to aid the characterization and function of proteins. Further studies should be carried out to investigate the interaction between them, in order to construct an interaction map. This should contribute to a better understanding of this patosystem.

Key words: *Potyviridae*, *Soybean yellow shoot virus*, protein, *Agrobacterium tumefaciens*

1 INTRODUCTION

Brazil is the largest soybean producer in the world, with an estimated production of 120.50 million tons in the period 2018/19, in a planted area of more than 37.50 million hectares (CONAB, 2018). According United States Department of Agriculture (USDA, 2018), these values represents 33.52% of world production. Therefore, farmers need to overcome various challenges caused by factors that limit soybean yields, such as diseases caused by viruses. These diminish the yield and the quality of the seeds, leading to the rejection of whole lots, destined to the export, and generating great economic impact.

There are 45 species of viruses listed by Hill and Whitham (2014) that naturally infect the soybean crop in the world. In Brazil, isolates of *Soybean mosaic virus* (SMV) were considered the main limiting factor, affecting between 20 and 70% of crop yields (Silva et al., 2003), leading to the search for new resistance factors and the use of seeds free of viruses (HAJIMORAD et al., 2018). However, with the expansion of soybeans to new areas, mainly in the form of monoculture, new viruses have arisen, which can cause significant losses in production (JAMIL et al., 2017, YASMIN et al., 2017).

In the mid-1980s, a new virus with 750 to 780nm-long flexuous particles was detected in Lavras, Minas Gerais, Brazil (DESLANDES et al., 1984), it was called -*Soybean yellow shoot virus* - SoyYSV isolated Lavras84 (FIGUEIRA et al., 1991). Recent studies indicate that because of their molecular, biological and structural characteristics, SoyYSV is organized in an ORF (*Open Reading Frame*) that encodes a polyprotein, with the same characteristics as the members of the *Potyviridae* family (FIGUEIRA et al., 2019). However, it did not fit into any of the genera described in this family, indicating whether it is a species belonging to a new genus.

Figueira et al. (2019) showed that when SoyYSV was mechanically inoculated in several soybean cultivars, it was able to cause significant losses in the quality and quantity of seed production, and was therefore considered potentially important for soybeans in Brazil. In addition, SoyYSV infects *Soybean mosaic virus* (SMV) resistant soybean species, posing an extra risk for the cultivars that are usually planted.

Therefore, it is necessary to develop a more detailed study of the interaction of this virus with the cells of the host plant, for the purpose of obtain subsidies for future studies involving the control of this virus via conventional genetic improvement or by genetic modification. On this context, localization of SoyYSV proteins, expressed individually in the host plant cell environment, may provide important information about its mechanism of action, as well as reveal the possible differences that this virus presents in relation to other virus species of the *Potyviridae* family that have already been reported. In the present work, eight SoyYSV proteins were cloned into the vector pDONR221 and subsequently subcloned into the binary vector pSITE-2CA, fused to Green Fluorescent Protein (GFP). Then they were expressed via *Agrobacterium tumefaciens* in a lineage of transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*, which have genes encoding nuclear and endoplasmic reticulum fused with *gfp* (Goodin et al., 2007; MARTIN et al., 2009) and analyzed in confocal microscope. The results obtained allowed to determine the location of the proteins expressed in the cellular environment, contributing to a better understanding of the pathosystem.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Conduction of experiments

The experiments were conducted in greenhouse at the Laboratory of Molecular Virology and Electronic Microscopy and Ultraestructural Analysis, in the Plant Pathology Department of the Federal University of Lavras.

2.2 Viral isolation and procurement of plants

The Lavras84 viral isolate was maintained in the Laboratory of Molecular Virology of the DFP / UFLA, dehydrated in ultrafreezer. At the occasion of the experiments was multiplied by mechanical inoculation in soybean plants cv. Santa Rosa. At once, tissues were triturated in 0.01M Ph 7 phosphate buffer containing sodium sulfite in the same molarity, and the extract obtained was rubbed on the previously sprayed soybean plants with carborundum (Csi). The plants were then washed and kept in a greenhouse throughout the course of the experiments.

Transient expressions of proteins by agro-infiltration were done in *Nicotiana benthamiana*, determining location of the GFP-fused viral proteins, two transgenic lines expressing constitutively Red Fluorescent Protein (RFP) were used: one of these fused to histone 2b, inducing fluorescence in the nucleus, and the other one with protein expressed in the endoplasmic reticulum, allowing the monitoring of the location of the viral protein in the cellular environment with greater precision. These seeds provided by Michael Goodin of the University of Kentucky. The plants were obtained by sowing in pots and grown in a greenhouse maintained 16 hours of light with supplementary illumination and 19-23 °C.

2.3 RT-PCR amplification genes, cloning and bacterial transformation

2.3.1 RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted from soybean plants infected with SoyYSV using Qiagen Rneasy Plant minikit according to the manufacturer's instructions. The cDNA synthesis and the polymerase chain reaction (PCR) were performed using the enzyme reverse transcriptase Superscript III (Invitrogen) and the enzyme DNA polymerase Phusion high fidelity (Finnzymes). For the amplification genes: P1, HCPro, P3, PIPO, 6K1, NIa, NIb and CP of SoyYSV, a pair of specific primers was used, linked to the att sequences specific for the Gateway System "entry clone" plasmid (Table 1).

Table 1 Primers sequence designed to amplify the proteins of the linked sequence att (in bold) which are the specific adapters to Gateway System "entry clone" plasmid

Name primer	Nucleotides sequence (att and Primer)
attB-P1-foward	5'AAAAAGCAGGCTTAATGGCAGCAATGAT3'
attB-P1-reverse	5'AGAAAGCTGGGTAATAAAACAACATGTT3'
attB-Hcpro-foward	5'AAAAAGCAGGCTTAGGGGCACAACAGAC3'
attB-Hcpro-reverse	5'AGAAAGCTGGGTATCCAAC TTTGTAGTC3'
attB-P3-foward	5'AAAAAGCAGGCTTAGGCATCAAGGAAAG3'
attB-P3-reverse	5'AGAAAGCTGGGTAGGATTGTAGATTGAG3'
attB-Pipo-foward	5'AAAAAGCAGGCTTAGAAAGGAAGACAAA3'
attB-Pipo-reverse	5'AGAAAGCTGGGTAAATTCAGTCCATCTTTT3'
attB-6K1-foward	5'AAAAAGCAGGCTTAAAGAGTAGTACAAA3'
attB-6K1-reverse	5'AGAAAGCTGGGTATTGCATCTCGCTACTT3'
attB-NIa-foward	5'AAAAAGCAGGCTTAAAGTGAAACACATAA3'
attB-NIa-reverse	5'AGAAAGCTGGGTATTGAGCTATCACAGG3'
attB-NIb-foward	5'AAAAAGCAGGCTTATCAGATTTCCACATC3'
attB-NIb-reverse	5'AGAAAGCTGGGTATTGATTTATTGCTGTT3'
attB-CP-foward	5'AAAAAGCAGGCTTAGGCGTTGTTGTTT3'
attB-CP-reverse	5'AGAAAGCTGGGTAAGCGAAGTCCATGC3'

For PCR, 35 cycles were used for gene extension. The annealing temperatures were specific for each pair of primers. The PCR products were analyzed on 0.7% agarose gel and purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. For the PCR reaction of each of the genes were used, 5 µl buffer, 1 µl dNTP, 0.2 µl Taq DNA polymerase, 1 µL primer F and 1 µL primer R and finally 1 µL cDNA.

2.3.2 Bp and LR clonase recombination reaction

For the insertion in the Gateway system plasmid of the PCR product obtained in the amplification of the genes, was made reaction containing: 5 µl of the reaction product, 2 µl of pDONR221 vector, 4 µl of the 5x Te buffer of BP clonase and 2 µl of the Bp clonase enzyme. After incubation for 1 hour at room temperature, was added 2 µl of Proteinase K (2 µg / µl) and re-incubated at 37 °C for 10 minutes. Then, the recombinant plasmid obtained in *E. coli* Omnimax competent cell (Invitrogen), was transformed by the heat shock method. This

technique consisted of adding 5 µl of the Bp clonase reaction to 50 µl of *E. coli* cell, followed by incubation on ice for 30 min. The next step was to incubate the reaction at 42 °C for 45 seconds and place on ice for 5 minutes. 1 ml of LB (Luria-Bertani) liquid medium was added and incubated at 37 °C for 1 hr, shaking at 150-200 rpm. Then the bacterial cells were plated in LB solid medium containing Kanamycin (50 µg / ml) and incubated for 12 to 16 h at 37 °C.

To test whether the product was properly cloned, they were initially submitted to RT-PCR with specific primers for each gene, according to the technique described above and these were sent for genetic sequencing. After verification of the cloned sequences, the colonies were multiplied in LB liquid medium at 37 °C overnight, and the DNA plasmid was extracted by the alkaline lysis method (SAMBROOK et al., 2001). This DNA was used for the LR clonase reaction.

The recombination was done by placing in a 1.5 ml tube, 5 µl of ultrapure water, 1.5 µl of entry clone (derived from the Bp clonase reaction), 1.5 µl of pSITE-2NB (GFP) (provided by Michael Goodin, University of Kentucky) (GOODIN et al., 2007) and, finally, 1.5 µl of the enzyme LR clonase (Invitrogen). The reaction was then incubated for 1 hour at room temperature, followed by addition of 2 µl Proteinase K (2 µg / µl), re-incubation at 37 °C for 10 minutes and transformation of the *E. coli* Omnimax competent cell (Invitrogen), as described above, by changing only the antibiotics used, which were streptomycin (100 µg / ml) and spectromycin (100 µg / ml).

2.3.3 Agro-infiltration

N. benthamiana was infiltrated with *A. tumefaciens* strain LBA4404 carrying the plasmid with the protein indicated that was obtained by LR clonase reaction. Appropriate *Agrobacterium* cultures were sedimented by centrifugation at 10000x g for 10 minutes and re-suspended in the induction buffer (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5,9 and 0,15 mM acetosyringone). Cells were left in this medium for 3 h at room temperature. Mixes of indicated strains were then prepared (DO₆₀₀=1.0 of each strain) and applied with a syringe to the underside of 2-3 leaves of 4 week-old plants. These plants were maintained for 48 hours at 96 ° C in a growth chamber, with a mean temperature of 22 °C and a cycle of 16 light hours and 8 dark hours.

2.4 Confocal laser scanning microscopy

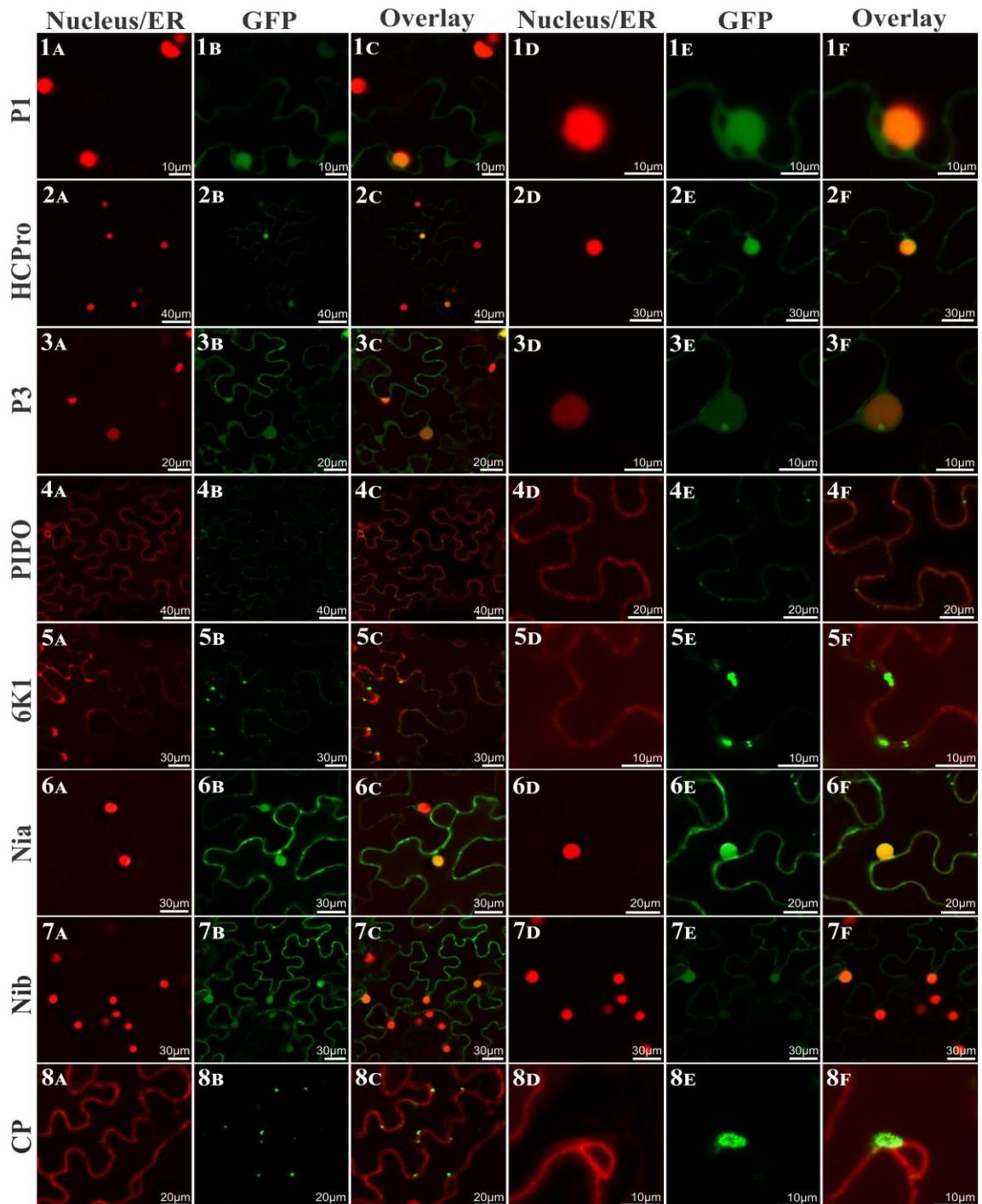
The fluorescence evaluations on the abaxial face leaves using Confocal laser Microscope LSM780 Zeiss Observer Z.1 in the Electron Microscopy and Ultrastructural Analysis Laboratory of UFLA were done. Localization of transgenic plants expressing the RFP in the nucleus and in the endoplasmic reticulum, was made using the Ch2 detector, beam splitter MBS 543 nm, pinhole 190 μm , 25% laser, master gain 701, digital gain 1.15, and emission filter for 562 to 626 nm. GFP-fused viral protein was localized using the ChS1 detector, MBS 488 nm beam beam, pinhole 88 μm , 5% laser, master gain 696, digital gain 1 and emission filter for 491 to 535 nm. The objective used was the C-Apochromat 63x / 1.2 W Korr M27. The acquired images were edited and diagrammed using Photoshop and Corel Draw software.

3 RESULTS

The location of the GFP-fused SoyYSV proteins in the *N. benthamiana* cells with the labeled nucleus and/or endoplasmic reticulum are showed in figure 1. Two lines of *N. benthamiana* plants agro-infiltrated with each protein, showed different patterns of subcellular localization when they were analyzed in confocal laser microscopy.

Proteins P1, HCPro and NIa, fused to GFP, were detected in the nucleus and cytoplasm (Figure 1, panel 1, 2 and 6 respectively), protein P3 and NIB accumulated in the nucleus, nucleolus and cytoplasm (Figure 1 , panels 3 and 7). The PIPO and 6K1 proteins were located in the cytoplasm specifically in the cell membranes (Figure 1, panel 4 and 5). On the other hand, CP protein was expressed exclusively in the nuclear periphery as aggregates (Figure 1, panel 8).

Figure 1 Images obtained by confocal laser microscopy of SoyYSV proteins fused to GFP, expressed by agroinfiltration in leaf epidermal cells of transgenic *N. benthamiana* plants expressing RFP fused to histone 2B (nuclear marker) or targeted to the endoplasmic reticulum. Cellular fluorescence of RFP, GFP and overlaid images, respectively, are provided. P1 (1A-1F, scale = 10 μ m). HCPro (2A-2C, scale = 40 μ m. 2D-2F, scale 30 μ m). P3 (3A-3C, scale = 20 μ m. 3D-3F, scale = 10 μ m). PIPO (4A-4C, scale = 40 μ m. 4D-4F, scale = 20 μ m). 6K1 (5A-5C, scale = 30 μ m. 5D-5F, scale = 10 μ m). NIa (6A-6C, scale = 30 μ m. 6D-6F, scale = 20 μ m). Nib (7A-7F, scale = 30 μ m). CP (8A-8C, scale = 20 μ m. 8D-8F, scale = 10 μ m). Proteins P1-GFP, HCPro-GFP, P3-GFP, NIa-GFP and Nib-GFP in plants expressing RFP in the nucleus (panels A-F). Proteins PIPO-GFP, 6K1-GFP and CP-GFP in plants expressing RFP in the endoplasmic reticulum. Images are acquired two days post-agroinfiltration.



4 DISCUSSION

Recognize the subcellular localization of proteins is fundamental for the understanding of their functions in the cell. Several works of expression and subcellular localization have been done in different species of virus belonging to the *Potyviridae* family (CHENG et al. 2017; MARTINEZ et al. 2014; ZHENG et al. 2011; DEL TORO et al. 2014; SAHANA et al. 2012, 2014; CUI et al. 2010), however, this is the first report with SoyYSV, which revealed to be a new member of genus not yet described in the *Potyviridae* family.

P1 protein (*Proteinase 1*), HCPro (*Helper Component Proteinase*) and NIa (*Nuclear Inclusion a*), showed the same localization pattern when they were expressed in plants of *N. benthamiana* with the nucleus and endoplasmic reticulum marked. In the case of the P1 protein, similar results have been found by Martinez and Daros (2014) who demonstrated that the P1 protein of *Potyvirus Tobacco etch virus* (TEV) was located inside and outside the nucleus of infected cells of *N. benthamiana*. Other results found by the same authors showed that the P1 protein of the TEV interacted with the host's 80S cytoplasmic ribosomes and specifically bound to the 60S ribosomal subunits during the infection process. The results obtained here suggest that the P1 protein can move from the cytoplasm to the nucleus during the infectious cycle and is important in the replication of the viral particle in the cell.

However, the HCPro protein has been characterized as multifunctional and synthesized by most of the *Potyviridae* family viruses. Cell localization studies of different HCPro's potyviruses, performed by Zheng et al. (2011) revealed that, when expressed separately, it was located in the cytoplasm. Recently, Del Toro et al. (2014) investigated the subcellular localization of the HCPro of the *Potato virus Y* (PVY), fused with different fluorescent proteins and observed that it also appeared only in the cytoplasm. However, Sahana et al. (2012, 2014), expressed HCpro from another *Potyvirus*, the *Papaya ringspot virus* (PRSV), it was located in the nucleus of *N. benthamiana* plants, as happened with the results observed with SoyYSV HCPro protein.

These disparity in the results suggests that the location of HCPro is complex and dynamic, it should not be restricted to a single region within the infected cells because its location tends to change during the infection cycle to exercise its multiple functions and/or in response to external changes. The spatial and temporal distribution of HCPro, as well as the dynamic subcellular location and its various functions deserve further study.

Both NIa (*Nuclear Inclusion a*) and NIB (*Nuclear Inclusion b*), multifunctional nuclear inclusion proteins, had the same localization pattern, the latter also accumulated in the nucleolus. NIa protein is the largest protein found associated with a crystalline inclusion produced by many *Potyvirus*es (KNUHTSEN et al., 1974). These inclusions are mainly found in the nucleus but can also be detected in the cytoplasm of infected cells (MARTIN et al., 1992). NIB is an RNA-dependent RNA polymerase, or RNA replicase, responsible for the replication of the potyviral genome (HONG et al., 1996). Little is known about the role that NIB could play in the nucleus of infected cells (LI et al., 1997). Restrepo et al. (1994) and Beauchemin et al. (2007) detected NIB protein in plant nucleolus infected with *Tobacco etch virus* (TEV) and *Turnip mosaic virus* (TuMV), respectively. Similar results were found in this work. Other studies have reported that NIB interacts with a host-bound factor of *A. thaliana* and *N. benthamiana* in both the nucleus and cytoplasm (XIONG et al., 2013).

Rodriguez-Cerezo et al. (1993) found the P3 protein (*Protein 3*) associated with the cytoplasmic cylindrical inclusions formed by the CI (*Cylindrical Inclusion*) viral protein. More recently, transient expression experiments on healthy and infected leaves of *N. benthamiana* showed that P3 was directed to endoplasmic reticulum membranes (ER) and formed inclusions associated with the Golgi complex that circulate along the actin filaments (CUI et al., 2010; EIAMTANASATE et al., 2007).

The SoyYSV P3 protein, are in endoplasmic reticulum membranes, as well as in the nucleus and in the nucleolus, showing a pattern different from those already described in the literature. This is one of the less characterized potyviral proteins.

Corroborating the predicted function for the P3N-PIPO protein, which acts on cell-to-cell translocation, the GFP-fused protein, expressed in that study, accumulated in the cytoplasm specifically in the membranes of the endoplasmic reticulum (Figure 1, 4 AF), same pattern expressed by the 6K1 protein. P3N-PIPO has been characterized as a determinant protein for the cell-to-cell movement of *Potyvirus* (WEN et al., 2010). It was later demonstrated that P3N-PIPO interacts directly with the CI protein, a cytoplasmic inclusion protein and a new CI / P3NPIPO complex is formed in the membranes of the endoplasmic reticulum (ER) to finally target the plasmodesmata through the secretory pathways (Wei et al., 2010). In the future, an investigation using the BiFC technique (*Bimolecular fluorescence complementation*) will be able to show if the SoyYSV P3NPIPO and CI will also exhibit this same behavior.

The CP protein of SoyYSV was observed in the cytoplasm at the nuclear periphery exclusively. In addition to encapsulating viral nucleic acid, CP is a multifunctional protein, like most other proteins encoded by Potyviruses. Recently, some researchers have proposed that CP also plays an important role in the temporary coordination of virions formation (HAFRÉN et al., 2010; HOFIUS et al., 2007; LÖHMUS et al., 2017). In the early stages of viral infection the accumulation of this protein is reduced due to the need to avoid premature encapsulation of the nucleic acid, since viral RNA must be available for the replication and translation processes (LÖHMUS et al., 2017). The prevention of encapsulation seems to be linked to the accumulation levels of CP in the cytoplasm (LÖHMUS et al., 2017).

During the last decade, become acquainted about the molecular biology of *Potyvirus* has advanced considerably. After characterizing the structure and strategy of genome expression and identifying the basic functions of most *Potyvirus* proteins, recent research has boosted the understanding and comprehension of replication and cell-to-cell movement processes, for which not only viral and of the directly involved host were identified, but also their particular subcellular locations. Thus, the destructive tendencies of viral proteins for a specific host cell depend on which subcellular compartment they install. Therefore, basic information was generated to support the study and characterization of *Soybean yellow virus* (SoyYSV) proteins, a virus recently reported in Brazil, that has the potential to significantly affect soybean production.

5 ACKNOWLEDGMENTS

Authors would like to thank the Brazilian Institutions: Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support to the current work.

6 LITERATURE CITED

- BEAUCHEMIN, C.; BOUTET, N.; LALIBERTE, J. F. Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of *Turnip mosaic virus*, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in planta. *Journal of Virology*, v. 81, n. 2, p. 775-782. 2007.
- 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*, v. 20, n. 7, p. 740-750. 2007.
- CHENG, X., WANG, A. The *potyvirus* silencing suppressor protein VPg mediates degradation of SGS3 via ubiquitination and autophagy pathways. *Journal of Virology*, v. 91, e01478-16, 2017.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) Perspectivas para a Agropecuária, safra 2018/2019. *Prévia*, v. 6, p. 34-52. 2018.
- CUI, X. et al. The *Tobacco etch virus* P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology*, v. 397, p. 56-63. 2010.
- DEL TORO, F. et al. *Potato virus Y* HCPro localization at distinct, dynamically related and environment-influenced structures in the cell cytoplasm. *Mol. Plant-Microbe Interact*, v. 27, p. 1331-1343. 2014.
- DESLANDES, J. A.; COSTA, A. S.; FIGUEIRA, A. R. Amarelo do broto da soja causado por *Potyvirus* diferente do mosaico comum, registrado em Minas Gerais. *Summa Phytopathologica*, v. 10, n. 1/2, p. 25-26. 1984.
- EIAMTANASATE, S.; JURICEK, M. C-terminal hydrophobic region leads PRSV P3 protein to endoplasmic reticulum. *Virus Genes*, n. 35, p. 611-617. 2007.
- FIGUEIRA, A. R.; ALVES, A. M. C.; KITAJIMA, E. Studies with *Soybean yellow shoot virus*: new potyvirus detected in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 81, n. 6, p. 83-93. 1991.
- FIGUEIRA, A.R., GERALDINO-DUARTE, P.S., NUÑEZ, A.M.P., VAN LENT, J., GALVINO-COSTA, S.B.F., FARMAN, M., GOODIN, M. M. Characterization of *Soybean yellow shoot virus*, a new member of the family *Potyviridae* infecting Soybean plants in Brazil. *Plant Disease*, 2019.
- 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*, v. 88, n. 6, p. 1810-1820. 2007.
- HAJIMORAD, M. R., DOMIER, L. L., TOLIN, S. A. WHITHAM, S.A., SAGHAI MAROOF, M.A. *Soybean mosaic virus*: a successful potyvirus with a wide distribution but restricted natural host range. *Molecular Plant Pathology*, v. 19, p. 1563–1579. 2018.
- HAFREN, A. et al. HSP70 and its cochaperone CIP1 promote potyvirus infection in *Nicotiana Benthamiana* by regulating viral coat protein functions. *Plant Cell*, v. 22, p. 523-535. 2010.
- HOFIUS, D. et al. Capsid protein-mediated recruitment of host DnaJ-like proteins is required for *Potato virus Y* infection in tobacco plants. *Journal of Virology*, v. 81, n. 21, p. 11870-11880. 2007.

- HONG, Y.; HUNT, A.G. Polymerase Activity Catalyzed by a Potyvirus-Encoded RNA-Dependent RNA Polymerase. *Virology*, v. 226, n. 0639, p. 146-151. 1996.
- KNUHTSEN, H. et al. Partial purification and some properties of *Tobacco etch virus* induced intranuclear inclusions. *Virology*, v. 61, p. 200-209. 1974.
- LI, X.H. et al. Functions of the *Tobacco etch virus* RNA polymerase (NIb): Subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *Journal of Virology*, v. 71, n. 2, p. 1598-1607. 1997.
- LOHMUS, A.; HAFREN, A.; MAKINEN, K. Coat protein regulation by CK2, CPIP, HSP70 and CHIP is required for *Potato virus A* replication and coat protein accumulation. *Journal of Virology*, v. 91, n. 3, e01316-16. 2017.
- MARTIN, M.T. et al. Intracellular localization of three non-structural *plum pox potyvirus* proteins by immunogold labelling. *Virus Research*, v. 25, p. 201-211. 1992.
- MARTIN, K. M. et al. Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. *The Plant Journal*, v. 59, n. 1, p. 150-162. 2009.
- MARTÍNEZ, F.; DAROS, J.A. *Tobacco etch virus* protein P1 traffics to the nucleolus and associates with the host 60S ribosomal subunits during infection. *Journal of Virology*, v. 88, n. 18, p. 10725-10737. 2014.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E.; AMMAR, D.; PIRONE T.P.; SHAW, J.G. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 1945-1949. 1993.
- RESTREPO, H. M. A.; CARRINGTON, J.C. The *Tobacco etch potyvirus* 6-Kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *Journal of Virology*, v. 68, n. 4, p. 2388-2397. 1994.
- SAHANA, N. et al. The asparagine residue in the FRNK box of potyviral helper-component protease is critical for its small RNA binding and subcellular localization. *Journal of General Virology*, v. 95, p. 1167-1177. 2014.
- SAHANA, N. et al. Inhibition of the host proteasome facilitates *Papaya ringspot virus* accumulation and proteosomal catalytic activity is modulated by viral factor HcPro. *PLoS ONE* 7, v. 7, n. 12, e52546. 2012.
- SAMBROOK, J. RUSSELL, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- SILVA, M. F. ALMEIDA, A. M. R. ARIAS, C. A. A. Evaluation of losses caused by two strains of *Soybean mosaic virus* in two soybean cultivars. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. 597-601. 2003.
- USDA (U.S. Department of Agriculture). World Agricultural Supply and Demand Estimates. Report of June 9, 2017. https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/Secretary_Briefing/Archive/2017/June_2017_WASDE_Locku_Briefing.pdf.

WEI, T. et al. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *Plos Pathogens*, v. 6, e1000962. 2010.

WEN, R.H.; HAJIMORAD, M.R. Mutational analysis of the putative PIPO of *Soybean mosaic virus* suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology*, n. 400, p. 1-7. 2010.

XIONG, R.; WANG, A. SCE1, the SUMO-conjugating enzyme in plants that interacts with N1b, the RNA-Dependent RNA Polymerase of *Turnip mosaic virus*, is required for viral infection. *Journal of Virology*, v. 87, n. 8, p. 4704-4715. 2013.

YASMIN, T., NELSON, B. D., HOBBS, H. A., MCCOPPIN, N. K., LAMBERT, K. N. DOMIER, L. L. Molecular characterization of a new soybean-infecting member of the genus *Nepovirus* identified by high-throughput sequencing. *Archives Virology*, v. 162, p. 1089-1092. 2017.

ZHENG, H. et al. Mapping the self-interacting domains of TuMV HC-Pro and the subcellular localization of the protein. *Virus Genes*, n. 42, p. 110-116. 2011.

**CAPITULO 3. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS VISANDO DETECTAR
SUPRESSORES DE SILENCIAMENTO GÊNICO DO *Soybean yellow shoot virus*
(SoyYSV), UM NOVO MEMBRO DA FAMÍLIA *Potyviridae* NO BRASIL**

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS VISANDO DETECTAR SUPRESSORES DE
SILENCIAMENTO GÊNICO DO *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV), UM NOVO
MEMBRO DA FAMÍLIA *Potyviridae* NO BRASIL**

Andrés M.P. Nuñez¹, Antonia R. Figueira^{1*}, Sergio B. Fernandes¹, B. Rodamilans²

Departamento de ¹Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil

Departamento de ²Genética Molecular, Centro Nacional de Biotecnología CNB, CSIC, Madrid, Espanha

*Autor para correspondência: Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Minas Gerais, Brasil. E-mail: antonia@dfp.ufla.br (A.R. Figueira).

RESUMO

As proteínas virais desempenham diversas funções no ciclo de vida do patógeno, como replicação, movimentação do vírus na planta e formação da capa proteica. Entretanto, outra importante função é a inibição do mecanismo de silenciamento de RNA da planta hospedeira, para que o vírus possa se multiplicar livremente e invadir sistemicamente a planta. Diversas proteínas virais têm sido associadas à supressão do mecanismo de silenciamento de RNA. O objetivo deste trabalho foi investigar a possível capacidade de supressão do silenciamento gênico apresentada por algumas proteínas dos vírus: *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV), uma nova espécie de vírus da família *Potyviridae* recentemente descrito em Lavras-MG, *Turnip mosaic virus* (TUMV), *Chinese yan necrotic mosaic virus* (CYNMV), *Blackberry virus Y* (BIVY) *Arepa palm necrotic ringspot virus* (APNRV), e *Brome streak mosaic virus* (BSTMV), todos pertencentes à família *Potyviridae*. Para isso, os genes que codificam as proteínas HCPro do BIVY, BSTMV, SoyYSV, CYNMV e APNRV, a proteína P1 do SoyYSV e as proteínas VPg do SoyYSV, CYNMV, TUMV foram expressas empregando-se um clone infeccioso do *Plum pox virus* (PPV) via *Agrobacterium tumefaciens*, em plantas de *Nicotiana benthamiana* e observadas ao microscópio de epifluorescência. Foram também feitas quantificações de fluorescência por fluorometria. Os resultados obtidos não evidenciaram atividade de supressão de silenciamento gênico de RNA das proteínas testadas, quando estas foram expressas isoladamente. Existe, porém, a possibilidade de que elas necessitem se interagir com outras proteínas, seja da planta ou do próprio vírus, para apresentar essa atividade supressora. Portanto, novos estudos envolvendo a interação proteína-proteína serão necessários para complementar esse estudo.

Palavras chaves: *Soybean yellow shoot virus*, proteína, *A.tumefaciens*, silenciamento gênico

ABSTRACT

Viral proteins play several roles in the pathogen's life cycle, such as replication, virus movement in the plant and the formation of the coat. However, another important function is the inhibition of the host plant RNA silencing mechanism, so that the virus can multiply freely and systematically invade the plant. Several viral proteins have been associated with mechanism of RNA silencing suppression. The objective of this work was to investigate the possible suppression of gene silencing presented by some virus proteins of: *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV), a new species of virus of the *Potyviridae* family recently described in Lavras-MG, *Turnip mosaic virus* (TUMV), *Chinese yan necrotic mosaic virus* (CYNMV), *Blackberry virus Y* (BIVY) *Arepa palm necrotic ringspot virus* (APNRV) and *Brome streak mosaic virus* (BSTMV), all belonging to the *Potyviridae* family. For that, the genes encoding the HCPro proteins of BIVY, BSTMV, SoyYSV, CYNMV and APNRV, the P1 protein of SoyYSV and the VPg proteins of CYNMV, TUMV, were expressed using an infectious clone of *Plum pox virus* (PPV) by *Agrobacterium tumefaciens* in *Nicotiana benthamiana* plants and observed under the epifluorescence microscope. The results obtained did not show activity of RNA silencing suppression of the proteins tested, when these were expressed alone. However, there is the possibility that they need to interact with other proteins, either from the plant or from the virus itself, to present this suppressive activity. Therefore, further studies involving protein-protein interaction will be needed to complement this study.

Keywords: *Soybean yellow shoot virus*, protein, *A. tumefaciens*, RNA silencing suppression

1 INTRODUÇÃO

A infecção e replicação dos vírus no hospedeiro induzem diversos mecanismos para combater a infecção viral, sendo que um dos mais bem estudados é o do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), encontrado nas plantas. No entanto, para que sejam capazes de se multiplicar e invadir sistemicamente a planta, os vírus necessitam de superar esse mecanismo defensivo, expressando uma ou mais proteínas que atuam como supressores do silenciamento (RSS) (DARÒS, 2017).

Existem três mecanismos básicos para silenciamento gênico nas plantas. O primeiro mediada por microRNAs (miRNAs) que são codificados pela própria planta controlando a expressão de fatores de transcrição e regulando etapas cruciais do seu desenvolvimento. O segundo é o silenciamento gênico pós-transcricional (*Post-transcriptional gene silencing*, PTGS), que ocorre no citoplasma das células, e é mediado por pequenos RNAs de interferência (*small interfering RNA*, siRNA), dirigido à degradação de RNA, podendo esse ser o da própria planta ou um mRNA exógeno. Nesses dois mecanismos, fitas duplas de RNA incorporadas a um complexo presente no citoplasma reconhecem e se ligam a sequências complementares no RNA alvo, induzindo silenciamento por degradação ou por inibição da tradução do mRNA. O terceiro denominado de silenciamento gênico transcricional (*transcriptional gene silencing*, TGS), mediado por siRNA, associados à metilação do DNA genômico da planta. (DARÒS, 2017; WANG et al., 2012).

Durante sua evolução, os vírus têm desenvolvido diferentes estratégias para evadir o silenciamento de RNA. A estratégia mais efetiva parece estar relacionada com a expressão de proteínas virais conhecidas como supressores de silenciamento de RNA (RSS). Diversos supressores virais já foram identificados na maioria dos gêneros de vírus de plantas, interagindo com os principais componentes antivirais do hospedeiro. Um exemplo interessante é a proteína multifuncional HCPro (*Helper Component Proteinase*), codificada pela maioria dos vírus da família *Potyviridae*, ao qual lhe foram atribuídas pelo menos três funções independentes: transmissão por pulgões, processamento proteolítico da poliproteína viral e supressão do silenciamento de RNA (VALLI et al., 2018; IVANOV et al., 2016).

Outras proteínas com atividade de supressão de silenciamento do RNA foram relatadas (RODAMILANS et al., 2018; CHENG et al., 2017; PASIN et al., 2014). Uma dessas proteínas é a proteína P1 (*Proteinase 1*), envolvida na replicação e na supressão do

silenciamento gênico, além de possuir um domínio de protease de serina, para a clivagem no C-terminal da HCPro, necessário para o processo de infecção (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001). Estudos mais recentes demonstraram que a proteína VPg (*Viral Genome-linked*) do *Turnip mosaic virus* (TuMV) também atua como um supressor de silenciamento de RNA e sugerem uma possível interação com o fator SGS3 (*suppressor of gene silencing 3*) do hospedeiro, promovendo a infecção viral (CHENG et al., 2017; RAJAMAKI et al., 2014).

Baseados nas diferentes informações a respeito do processo de infecção viral, mencionados anteriormente, nesse estudo foi testado o possível envolvimento das seguintes proteínas na supressão do mecanismo de silenciamento gênico da planta: P1, HCPro e VPg do *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV) recentemente descrito em Lavras-MG e ainda não alocado em nenhum gênero; HCPro do *Brome streak mosaic virus* (BSTMV) pertencente ao gênero *Tritimovirus*, do *Arepa palm necrotic ringspot virus* (APNRV) recentemente descrito mas ainda não alocado em nenhum gênero, do *Blackberry virus Y* (BIVY) pertencente ao gênero *Brambivirus*; HCPro e VPg do *Chinese yan necrotic mosaic virus* (CYNMV) pertencente ao gênero *Macluravirus* e a VPg do *Turnip mosaic virus* (TUMV) pertencente ao gênero *Potyvirus*, todos eles membros da família *Potyviridae*, visando comparar com outras espécies já relatadas.

Os resultados obtidos neste estudo, com as proteínas citadas expressas por um vetor viral e via *Agrobacterium tumefaciens*, permitiram inferir sobre as possíveis rotas de silenciamento que os vírus da família *Potyviridae* poderiam utilizar no processo de infecção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Virologia Molecular no departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras e no Laboratório de Interações Planta Patógeno em Infecções Virais do departamento de Genética Molecular de Plantas do Centro Nacional de Biotecnologia de Madrid (CSIC-CNB).

2.2 Obtenção das plantas

Os ensaios de infectividade viral e expressão transiente de proteínas foram realizados em plantas de *Nicotiana benthamiana*. As plantas foram obtidas por semeadura em bandejas com posterior transplante para vasos de 1 Kg, dez dias após a germinação. Durante todo o experimento elas foram mantidas em casa de vegetação, com temperaturas entre 18 e 23 °C, umidade relativa de 60% e períodos de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

2.3 Extração do RNA total da planta, RT-PCR e PCR para clonagem dos genes no sistema gateway

No caso dos genes que codificam as proteínas P1, HCPro e VPg do SoyYSV o RNA total foi extraído de plantas de soja infectadas com o vírus no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, utilizando Qiagen Rneasy Plant minikit, segundo as instruções do fabricante. A síntese do cDNA e a reação em cadeia polimerase (PCR) foram realizadas utilizando a enzima Transcriptase reverse Superscript III (Invitrogen) e a enzima DNA polimerase Phusion high fidelity (Finnzymes). Para a amplificação dos genes mencionados anteriormente, foram utilizados os pares de *primers* específicos para cada proteína, ligados às sequências att (em negrito) que são os adaptadores específicos para o “entry clone” do sistema Gateway (tabela 1).

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

Nome do <i>primer</i>	Sequencia de nucleotídeos (att e <i>Primer</i>)
attB-P1-foward	5'AAAAAGCAGGCTTAATGGCAGCAATGAT3'
attB-P1-reverse	5'AGAAAGCTGGGTAAATAACAACATGTT3'
attB-Hcpro-foward	5'AAAAAGCAGGCTTAGGGGCACAACAGAC3'
attB-Hcpro-reverse	5'AGAAAGCTGGGTATCCAACCTTTGTAGTC3'
attB-VPg-foward	5'AAAAAGCAGGCTTAATGGAAGGCAAGAA3'
attB-VPg-reverse	5'AGAAAGCTGGGTATTTCGGGATTAAGTAT3'

A reação foi composta por 5 µL de solução tampão, 1 µL de dNTP, 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase, 1 µL do primer F e 1 µL do primer R e finalmente 1 µL de cDNA, em 35 ciclos. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 0,7%, contrastados

com Gel Red (Biotium) e purificados utilizando-se o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante, para clonagem no plasmídeo do sistema Gateway.

A clonagem foi feita utilizando-se 5 µl do produto da reação de PCR, 2 µl do vetor pDONR221, 4 µl do tampão de reação 5x Te Buffer da BP clonase e 2 µl da enzima Bp clonase. Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente, foram adicionados 2 µl de Proteínase K (2 µg/µl), fazendo-se nova incubação a 37°C por 10 minutos. Em seguida, foi feita a transformação do plasmídeo recombinante obtido em célula competente *E. coli Omnimax* (Invitrogen), pelo método de choque térmico. Para testar se o produto foi devidamente clonado, inicialmente se submeteram às colônias à técnica RT-PCR com os *primers* específicos para cada gene, conforme a técnica descrita acima, e estas foram enviadas para sequenciamento genético. Após verificação das sequências clonadas, as colônias foram multiplicadas em meio LB líquido a 37°C overnight, e o DNA plasmidial foi extraído pelo método da lise alcalina (SAMBROOK et al., 2001). Esse DNA foi liofilizado e levado para o Centro Nacional de Biotecnologia de Madri para os estudos de silenciamento gênico.

2.4 Amplificação dos genes por PCR a partir dos plasmídeos disponíveis no CNB

As amplificações dos genes clonados, por PCR, foram feitas com o auxílio da DNA Polymerase "Phusion" (Fermentas), numa reação com volume final de 20 µL, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para cada amplificação foram utilizados diferentes *primers* a 0,5 µM de concentração final na reação (Tabela 2). O número e as condições de cada ciclo foram determinados com base na sequência do par de *primers* utilizados e no tamanho do fragmento a amplificar utilizando um termociclador PTC-100TM (MJ Research, INC).

Tabela 2 Sequência de *primers* desenhados para amplificar as proteínas de interesse utilizadas neste estudo a partir dos plasmídeos disponíveis no CNB.

Nome do <i>primer</i>	Gene amplificado	Sequencia de nucleotídeos (5'-3')
HCppv-foward	HCPPro (PPV)	5'CCACCAACTCTATAATGTTTTATATATC3'
HCppv-reverse		5'CCTCCAACCAGGTATGTTTC3'
HCspfmv-foward	HCPPro (SPFMV)	5'AAGCTCTACTATGGAAAGATTTCTG3'
HCspfmv-reverse		5'CCGCCTACTATGTAGTGTTTCATC3'
HCsoyysv-foward	HCPPro (SoyYSV)	5'AGGGGCACAACAGACGAC3'
HCsoyysv-reverse		5'CCTCCAACCTTGTAGTCGTTATATG3'
HChlvy-foward	HCPPro (BIVY)	5'AAGTGAGGAGTTGCAACCATG3'
HChlvy-reverse		5'CCCCCACGCGGTACTC3'
HCbstmv-foward	HCPPro (BSTMV)	5'AAGTAGCAAGAGGCGCATGG3'
HCbstmv-reverse		5'CCACCAATCTCGTATTCCTTAAG3'
HCcynmv-foward	HCPPro (CYNMV)	5'AAGCTCTACTATGGAAATTGATTTCTG3'
HCcynmv-reverse		5'CCGCCTACTATGTAGAGTGTTTCATC3'
HCapnrv-foward	HCPPro (APNRV)	5'AAGTGAGGAGTTGCAACCATATG3'
HCapnrv-reverse		5'CCCCCACGCGGTACCGGCTC3'
P1soyysv-foward	P1 (SoyYSV)	5'AATGGCAGCAATGATCACTTTC3'
P1soyysv-reverse		5'CCATAAAACAACATGTTGTCGACC3'
VPgsoyysv-foward	VPg(SoyYSV)	5'AATGGAAGGCAAGAAGGTTGATAAG3'
VPgSoyysv-reverse		5'CCTTCGGGATTAAGTATAGGTTG3'
HCcynmv-foward	HCPPro (CYNMV)	5'AAGTGAGGAGTTGCCATTATG3'
HCcynmv-reverse		5'CCCCCACGCGGTTTACCGGCTC3'
VPgtumv-foward	VPg(TUMV)	5'GGCGAAAGGTAAGAGGCAAAAG3'
VPgtumv-reverse		5'GCCTCGTGGTCCACTGGGAC3'

Os plasmídeos, nos quais estavam clonados os genes de interesse, bem como os plasmídeos de destino estão discriminados na tabela 3.

Tabela 3 Plasmídeos de origem empregados nos processos de clonagem dos genes que codificam as proteínas P1, HCPro, VPg e P14, nos respectivos plasmídeos de destino, de acordo com a finalidade do teste.

Família	Gênero	Espécie	Gene	Plasmídeo de Origem	Plasmídeo de Destino	Referência*
	<i>Arepavirus</i>	<i>Arepa palm necrotic ringspot Virus (APNRV)</i>	HCPro2	pBIM19	PLX-PPV _{r-ΔHC}	(Yang et al., 2018)
	<i>Brambivirus</i>	<i>Blackberry virus Y (BIVY)</i>	HCPro	pGEM3	PLX-PPV _{r-ΔHC} / PLX-PPV _{r-s3}	(Rodamilans et al., 2018)
	<i>Tritimovirus</i>	<i>Brome streak mosaic virus (BSTMV)</i>	HCPro	pBIM19	PLX-PPV _{r-ΔHC}	(Rodamilans et al., 2018)
	<i>Macluravirus</i>	<i>Chinese yam necrotic mosaic virus (CYNMV)</i>	HCPro Vpg	pGEM3	PLX-PPV _{r-ΔHC} / PLX-PPV _{r-s3} / PMDC32	(Rodamilans et al., 2018)
<i>Potyviridae</i>	<i>Não classificado</i>	<i>Soybean yellow shoot virus (SoyYSV)</i>	HCPro P1 Vpg	pDONR221	PLX-PPV _{r-ΔHC} PLX-PPV _{r-ΔHC} / PMDC32	(Não publicado)
	<i>Potyvirus</i>	<i>Turnip mosaic virus (TUMV)</i>	Vpg	pBIM19	PLX-PPV _{r-ΔHC}	(Miyoshi et al., 2008)
	<i>Potyvirus</i>	<i>Plum pox virus (PPV)</i>	**HCPro	pBIM19	PLX-PPV _{r-ΔHC} / PLX-PPV _{r-s3}	(Rodamilans et al., 2018)
	<i>Potyvirus</i>	<i>Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV)</i>	**HCPro	pBIM19	PLX-PPV _{r-ΔHC} / PLX-PPV _{r-s3}	(Pasin et al., 2014)
<i>Tombusviridae</i>	<i>Aureusvirus</i>	<i>Pothos latent virus (PoLV)</i>	**P14	pBIM19	-	(Rodamilans et al., 2018)

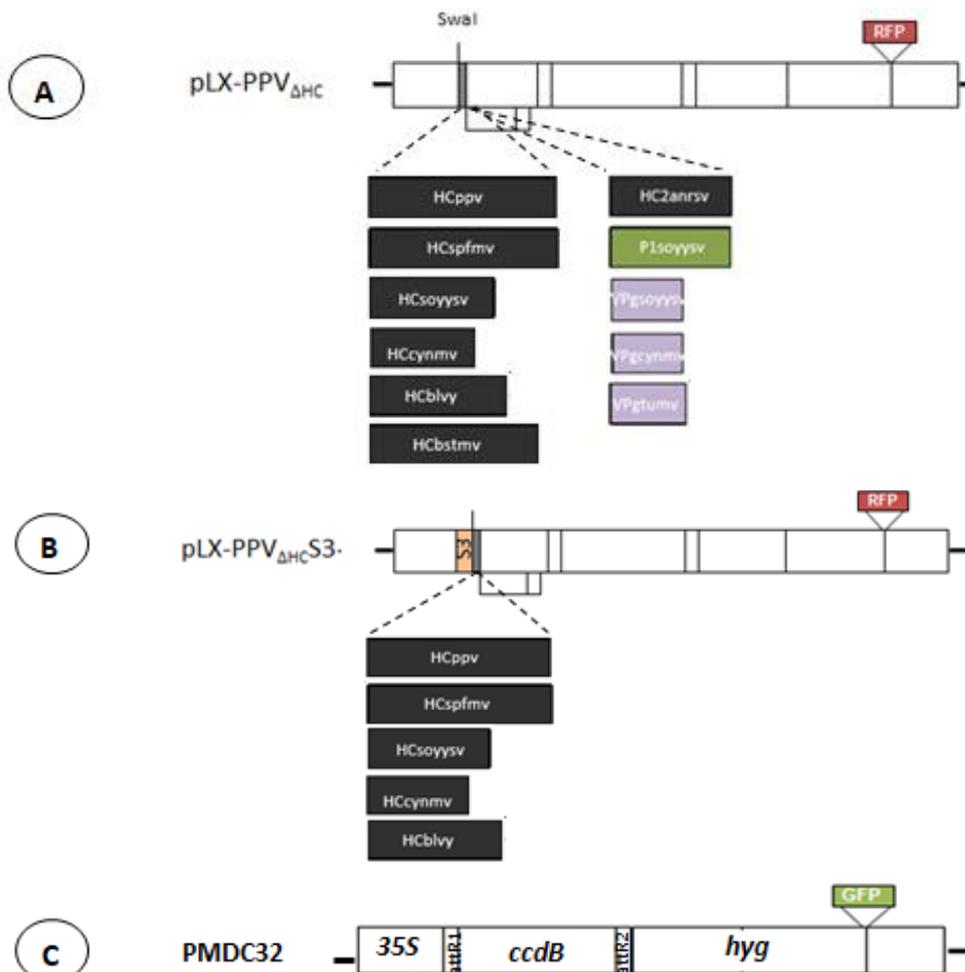
* Referência dos plasmídeos de origem

**Proteínas com atividade de supressão do silenciamento gênico utilizadas como controle positivo

2.5 Multiplicação e purificação dos plasmídeos

Para a expressão das proteínas de interesse foram utilizados 3 plasmídeos vetores, conforme discriminado na tabela anterior. Os vetores PLX-PPV $_{\Delta HC}$ e PLX-PPV $_{r-S3}$ são vetores modificados a partir de um clone infeccioso do *Plum pox virus* (PPV) (PASIN et al., 2014), desenhados para avaliar atividade de silenciamento gênico, sendo que também foram utilizados nos testes de detecção da proteína HCPro por western blot. O vetor PMDC32 foi empregado para o ensaio de expressão transiente. (Figura 1).

Figura 1 Representação esquemática das construções virais feitas a partir do Clone infeccioso de *Plum pox virus* (pLX-PPV) **A.** PLX-PPV $_{\Delta HC}$: clone infeccioso utilizado para o estudo de atividade de silenciamento gênico inserindo o sítio de restrição *SwaI* para clonagem dos genes desejados **B.** PLX-PPV $_{r-S3}$: clone infeccioso utilizado para detecção do gene que codifica a proteína HCPro, inserindo o *tag* S3 que se liga a proteína HCPro recombinante **C.** Plasmídeo PMDC32 utilizado para o estudo de expressão transiente. Caixa preta representa a proteína HCPro, caixa verde representa a proteína P1 e caixa lilás representa a proteína VPg dos vírus de interesse.



Esses plasmídeos foram multiplicados na linhagem DH5 α de *Escherichia coli* (Sambrook et al., 2001). As linhagens DH5 α de *E. coli* foram cultivadas a 37°C em meio LB sólido (bacto-triptona 10 g / L, extrato de levedura 5 g / L, cloreto de sódio 10 g / L e 18 g / L de agar), Após 24 horas, as colônias foram cultivadas novamente em meio LB líquido (bacto-triptona 10 g / L, extrato de levedura 5 g / L, cloreto de sódio 10 g / L) em ambos casos foi adicionado o antibiótico Kanamicina (50 μ g/ml). A conservação das cepas originais de *E. coli* foi feita por ressuspensão das colônias em meio LB líquido, contendo glicerol a 15%, e manutenção a -80°C. A purificação dos plasmídeos foi feita pelo método da lise alcalina (SAMBROOK et al., 2001).

2.6 Clonagem dos genes de interesse

Para a clonagem dos genes de interesse, primeiramente foi feita a digestão dos plasmídeos vetores utilizados (PLX-PPV_{r- Δ H_C}, PLX-PPV_{r-S₃} e PMDC32) com enzimas de restrição conforme instruções de cada provedor (NEB ou Fermentas). Para evitar a auto-ligação do DNA plasmidial digerido sem a inserção do fragmento de interesse foi utilizado a fosfatase alcalina de camarão (SAP) que remove o grupo fosfato presente nas extremidades 5' de dsDNA, utilizando-se 10 μ L do dsDNA, 5 μ L da fosfatase alcalina e 5 μ L do respectivo tampão. Essa reação foi incubada por 1h a 37 °C e em seguida foi feita a ligação dos fragmentos de DNA de interesse no plasmídeo de destino com DNA ligase do bacteriófago T4 (Fermentas). Finalmente, as construções foram transformadas em células competentes DH5 α de *Escherichia coli*.

Em ambos os casos, a presença dos insertos nos plasmídeos previamente purificados foi checado pelo uso de enzimas de restrição e analisadas em gel de agarose a 1%, contrastado com brometo de etídio e visualizados no transiluminador "Gel Doc 2000" (Bio-Rad). Após a verificação do tamanho dos insertos, esses foram purificados a partir do gel, pelo método de "Freeze and Squeeze" (TAUTZ et al., 1983) ou utilizando o kit comercial "QIAEX II Gel extraction" (Qiagen) e enviados para sequenciamento na MacroGen para checagem dos genes.

2.7 Transformação de *A. tumefaciens* e Agroinfiltração

Após a verificação das sequencias, foi feita a transformação da *A. tumefaciens* linhagem C58C1 (VAN LAREBEKE et al., 1974), pelo método de “congelamento e descongelamento”, empregando-se 25 µl de suspensão de *A. tumefaciens* e 2 µl do plasmídeo recombinante. Essa mistura foi incubada por 5 minutos no gelo, imediatamente depois congelada em Nitrogênio líquido por 5 minutos e incubadas, por 5 minutos a 37°C. Após essa etapa, foram ressuspensas em 950 µl de meio LB líquido e mantidas a 28°C por duas horas. Após esse período, centrifugou-se a suspensão, deixando 100 µl para ressuspensão e plaqueamento em LB sólido, contendo rifampicina (50 µg/ml) e Kanamicina (50 µg/ml), finalmente estas foram incubadas por 36 a 48h à 28°C.

Após o crescimento, as colônias de *A. tumefaciens* foram multiplicadas em 2,5 mL de meio LB líquido e incubadas a 28°C por 48 horas, com os antibióticos citados. Posteriormente, 200 µL destas culturas foram adicionadas em 20 mL de meio LB líquido, contendo os antibióticos, e incubados a 28°C durante 16 horas. Após esse tempo, 6 mL foram separados para purificar o plasmídeo e verificar a sua identidade e integridade. O resto foi centrifugado a 10000 x g durante 15 minutos a 4 °C. O pellet foi ressuspendido em solução de sulfato de magnésio 10 mM, MES 10 mM e acetoseringona 150 µM, ajustando-se a concentração para uma OD600 de 0.5. A suspensão de células foi mantida à temperatura ambiente por 2 a 3 horas. Em seguida, estas suspensões foram infiltradas nos espaços intercelulares de dois folhas do hospedeiro pressionando com seringa de 1 mL na parte abaxial da folha.

2.8 Detecção das proteínas expressas em *N. benthamiana*

A detecção das proteínas expressas nas plantas agroinfiltradas foi feita pelo método Western-Blot. Os tecidos foliares das plantas foram macerados num almofariz contendo nitrogênio líquido e o pó resultante foi ressuspendido no tampão (125mM Tris-HCl, 2% SDS, 6M urea, 5% β-Mercaptoethanol 10% glicerol, 0,05% bromophenol blue, pH7,5) na proporção 1:2 (p:v). Em seguida, as proteínas totais do extrato obtido foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% na presença de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Após a corrida do gel de poliacrilamida, os fragmentos separados foram transferidos

para membrana de nitrocelulose, fazendo-se um "sanduíche" com papéis filtro, previamente embebidos com o tampão de transferência, durante 1 hora e 45 minutos. A membrana contendo as proteínas transferidas foi bloqueada em solução BSA (soroalbumina bovina) e incubada com os anticorpos primários anti-CP 1066 para detecção do vírus e anti-STREP para a detecção da proteína HCPro, o goat anti-rabbit IgG foi usado como anticorpo secundário. Finalmente, a membrana foi revelada no ChemiDoc XRS imager (BioRad) e analisados com o Image J software.

2.9 Observação e quantificação da fluorescência nos tecidos das plantas agroinfiltradas

A fluorescência emitida pelas proteínas fusionadas ao RFP, expressas nos tecidos das plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas, foi visualizada em microscópio de epifluorescência (Leica MZFLIII), usando os seguintes parâmetros: (filtro de excitação: 546/10 nm, filtro de bloqueio: 570 nm). As imagens foram adquiridas com uma câmera digital Olympus DP 70 acopladas ao microscópio. A quantificação da intensidade da fluorescência do GFP foi realizada colocando-se discos foliares de 5,0mm de diâmetro em uma placa preta com 96 poços, preenchida com 50 µL de água e lidas em leitor monocromador (Infinite M200, Tecan group) (PASIN et al., 2014).

2.10 Análise de sequências

Para comparar domínios conservados das proteínas P1, HCPro e VPg do SoyYSV com os de isolados disponíveis no GenBank, foram empregados representantes de cada um dos gêneros pertencentes à família *Potyviridae* discriminados na tabela (Tabela 4). O alinhamento das sequências foi realizado inicialmente pelo software MEGA X (Kumar et al., 2018) e posteriormente editados usando o software Jalview (WATERHOUSE et al., 2009).

Tabela 4 Isolados virais provenientes do GenBank, cujas sequencias das proteínas P1, HcPro e VPg foram empregadas para comparação as dos isolados estudados.

Gênero	Espécie	Acrônimo	Número de Acesso
<i>Macluravirus</i>	<i>Chinese yam necrotic mosaic virus</i>	CYNMV	AB710145
	<i>Cardamom mosaic virus</i>	CdMV	MF622947
<i>Brambivirus</i>	<i>Blackberry virus Y</i>	BIVY	AY994084
<i>Tritimovirus</i>	<i>Brome streak mosaic virus</i>	BrSMV	Z48506.1
	<i>Wheat streak mosaic virus</i>	WSMV	NC.001886.1
<i>Ipomovirus</i>	<i>Cassava brown streak virus</i>	CBSV	GU563327
	<i>Sweet potato mild mottle virus</i>	SPMMV	NC-003797
<i>Poacevirus</i>	<i>Caladenia virus A</i>	CaVA	JX156425
	<i>Triticum mosaic virus</i>	TriMV	FJ263671
<i>Rymovirus</i>	<i>Ryegrass mosaic virus</i>	RGMV	Y09854
	<i>Agropyron mosaic virus</i>	AgMV	NC-005903.1
<i>Potyvirus</i>	<i>Plum pox virus</i>	PPV	HG964686
	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	SPFMV	D86371
	<i>Turnip mosaic virus</i>	TUMV	NC-002509
	<i>Soybean mosaic virus</i>	SMV	D00507
<i>Roymovirus</i>	<i>Rose yellow mosaic virus</i>	RYMV	JF280796
<i>Não classificado</i>	<i>Soybean yellow shoot virus</i>	SoyYSV	MH890547.1

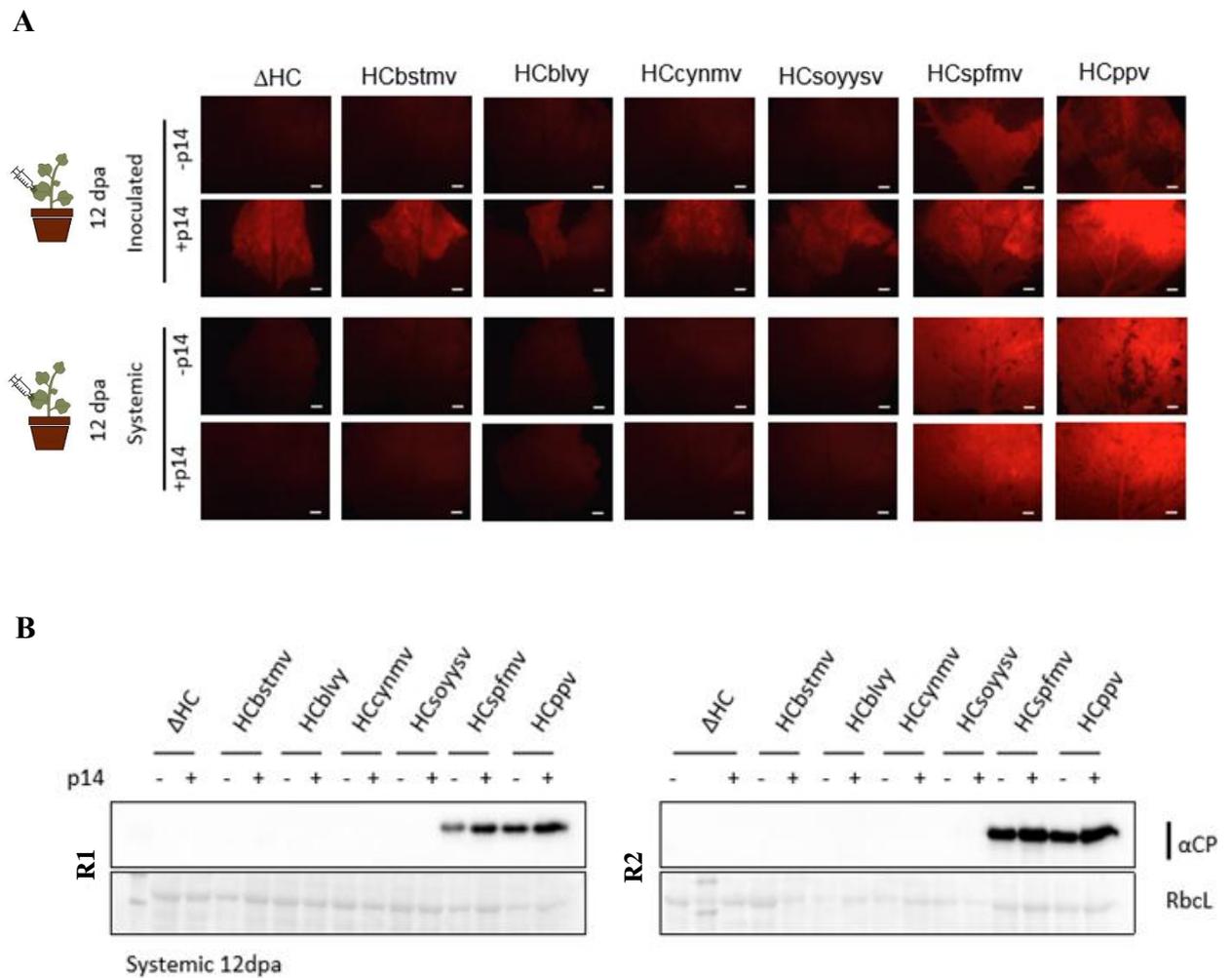
3 RESULTADOS

3.1 Atividade de supressão de silenciamento de RNA (RSS) de HCPro, P1 e VPg usando o vetor PLX-PPV Δ HC

Aos 12 dias após infiltração (dai), quando as proteínas que foram infiltradas com (+p14) e sem o p14 (-p14) foram analisadas, não se detectou fluorescência nas plantas em que a HCPro dos vírus investigados foi infiltrada sem p14, enquanto que quando as proteínas foram infiltradas juntamente com o p14 a fluorescência foi claramente evidenciada. Apenas as plantas infiltradas com a construção contendo HCPro do SPFMV (HCspfmv) e do PPV (HCppv), relatadas com atividade de supressão de silenciamento gênico e utilizadas como controle positivo, apresentaram fluorescência nas folhas inoculadas sem o p14 (Figura 2A). Esse efeito foi mais evidente quando o p14 foi empregado, pois as plantas infiltradas já apresentavam infecção sistêmica, com pontos vermelhos nas folhas não inoculadas, aos quatro dias após infiltração, evidenciando um maior efeito supressor (dados não apresentados).

Resultado semelhante foi observado quando as proteínas P1 e VPg dos vírus testados foram agroinfiltradas nas plantas de *Nicotiana benthamiana*. Apenas as plantas, que foram infiltradas junto com p14 ou plantas contendo a HCPro do PPV (HCppv), apresentaram fluorescência nas folhas (Figura 3A). Todas as plantas inoculadas com p14 mostraram fluorescência no local inoculado, o que indicou que as construções estavam se expressando corretamente. A construção HCppv causou uma forte infecção sistêmica com e sem a p14. No caso da HCPro do ANRSV (HC2anrsv), quando o p14 foi incluído, um forte dano apareceu na área agroinfiltrada (dados não apresentados), porém, não houve sinais de infecção sistêmica em nenhuma das plantas.

Figura 2 Atividade de supressão de silenciamento (RSS) de HCPro em plantas de *Nicotiana benthamiana* aos 12 dai. **A.** Imagens obtidas em microscópio de epifluorescência, sob irradiação UV. Painéis da esquerda para a direita. Δ HC: plasmídeo vazio; HCPro do *Brome streak mosaic virus* (HCbstmv), HCPro do *blackberry virus Y* (HCblvy), HCPro do *Chinese yam necrotic mosaic virus* (HCcynmv), HCPro do *Soybean yellow shoot virus* (HCsoyysv), HCPro do *Sweet potato feathery mottle virus* (HCspfmv) e HCPro do *Plum pox virus* (HCppv). p14: proteína do PoLV que possui atividade de supressão de silenciamento gênico. (-p14: ausência; +p14: presença) **B.** Western blot com o anticorpo anti CP do PPV (CP1066) nas duas repetições (R1 e R2). As membranas coradas com Ponceau vermelho mostram a maior subunidade da Rubisco (RbcL) e foram utilizadas como controle de carga.



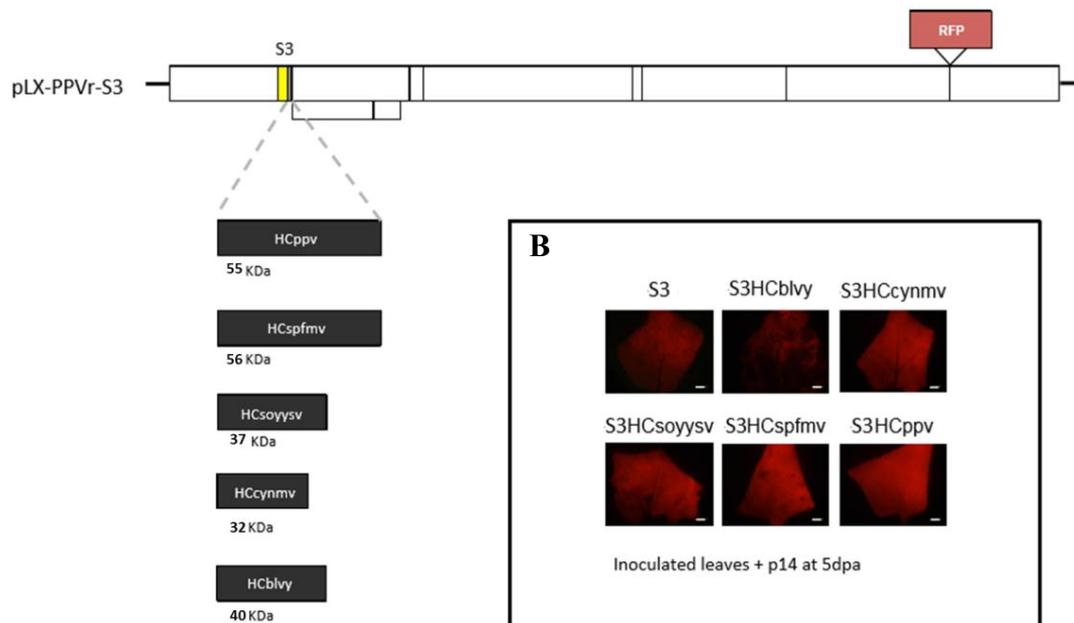
Finalmente, As plantas utilizadas nos experimentos da HCPro, P1 e VPg, foram avaliadas novamente aos 21dai (dados não apresentados). Nenhuma das plantas agroinfiltradas sem a p14 apresentou fluorescência, mostrando os mesmos resultados observados aos 12 dai, exceto nos controles positivos HCspfmv e HCppv que apresentaram fluorescência tanto nas folhas inoculadas como também na infecção sistêmica, com e sem p14, evidenciado o acúmulo de alta concentração dos produtos dos genes virais, conforme mostrado pelo Western blot (Figura 2B e 3B).

3.2 Atividade de supressão de silenciamento de RNA (RSS) de HCPro usando o vetor PLX-PPVr-S3

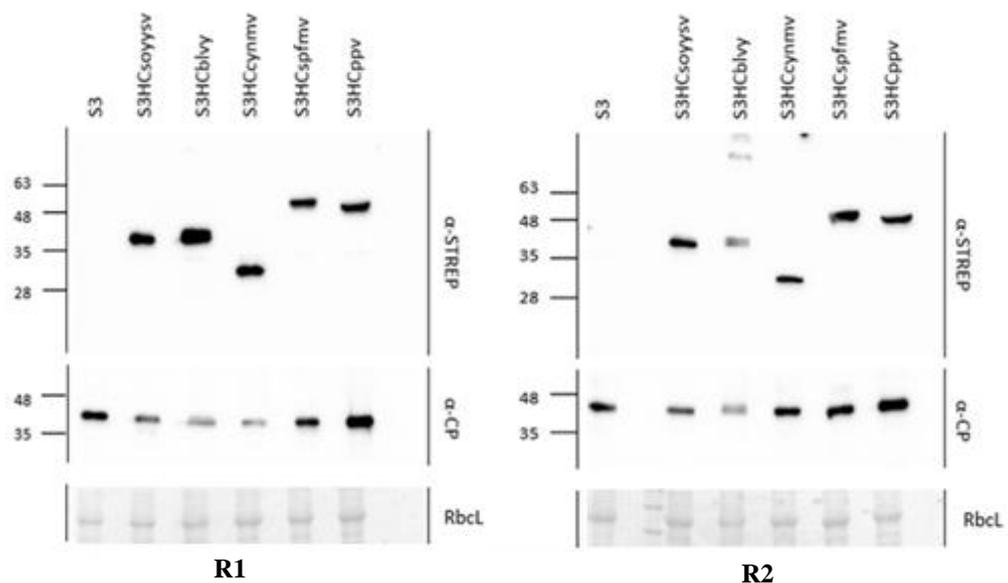
No experimento em que foram testadas as HCPro's do *Blackberry virus Y* (HCblvy), *Chinese yam necrotic mosaic virus* (HCcynmv), *Soybean yellow shoot virus* (HCsoyysv), *Sweet potato feathery mottle virus* (HCspfmv) e *Plum pox virus* (HCppv), todas as plantas apresentaram fluorescência vermelha na área inoculada (figura 4B). As plantas inoculadas com HCblvy mostraram necrose forte nesta área, evidenciada pela pouca fluorescência (figura 4B). O acúmulo das diferentes HCPro's testadas aos 5 dai ficou evidenciado no Western blot pela banda apresentada, indicando quantidades razoáveis das proteínas com o tamanho (kDa) esperado.

Figura 4 Atividade de supressão de silenciamento da HCPro em plantas de *Nicotiana benthamiana*. **A.** representação esquemática do vetor PLX-PPVr-S3 modificado a partir do clone infeccioso do PPV, inserindo o tag S3 e as proteínas dos diferentes vírus com os tamanhos (kDa) indicados nas caixas cinza; **B.** Imagens obtidas através do microscópio de epifluorescência, sob irradiação UV, aos 5dai nas folhas inoculadas. S3: plasmídeo vazio; HCPro do *Blackberry virus Y* (S3blvy), HCPro do *Chinese yam necrotic mosaic virus* (S3cynmv), HCPro do *Soybean yellow shoot virus* (S3soyysv), HCPro do *Sweet potato feathery mottle virus* (S3spfmv) e HCPro do *Plum pox virus* (S3HCppv). +p14: proteína do PoLV que possui atividade de supressão de silenciamento gênico; **C.** Western blot com o anticorpo anti CP 1066 e o anti STREP nas duas repetições (R1 e R2). As membranas coradas com membranas coradas com Ponceau vermelho mostram a maior subunidade da Rubisco (RbcL) e foram utilizadas como controle de carga.

A



C

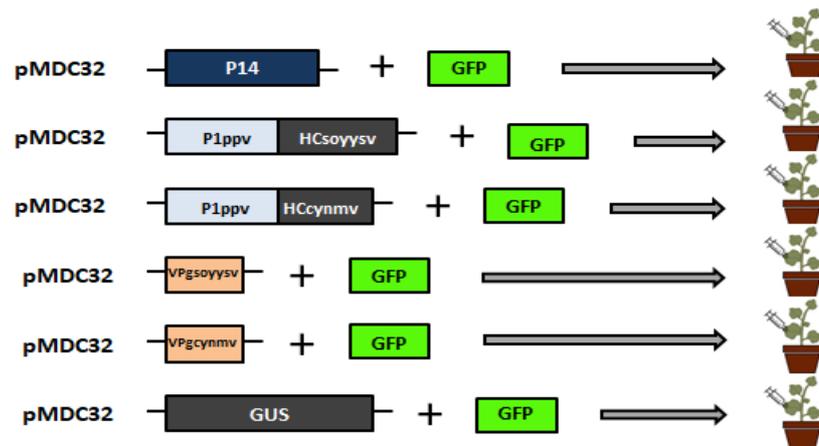


3.3 Atividade de supressão de silenciamento de RNA (RSS) na expressão transiente

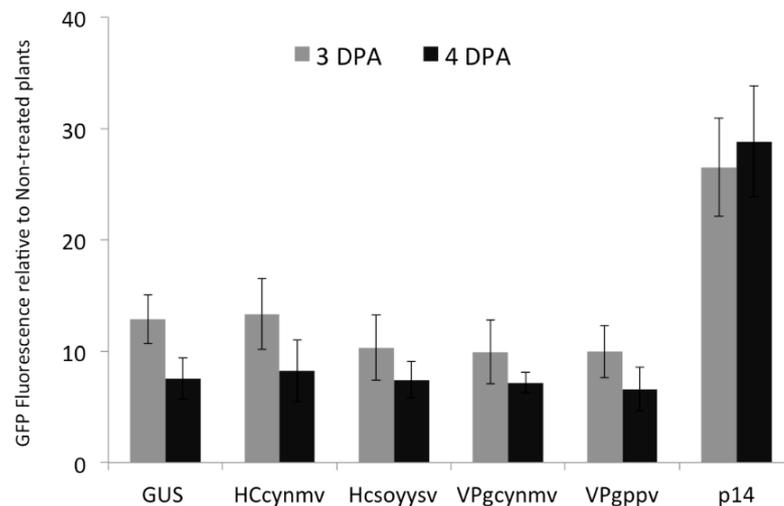
Para os experimentos de expressão transiente foram utilizadas as proteínas HCPro e VPg do *Soybean yellow shoot virus* (HCsoyysv) e *Chinese yam necrotic mosaic virus* (HCcynmv) esquematizadas na figura 5A. Estas foram clonadas em um vetor de expressão denominado PMDC32. As plantas utilizadas no experimento foram analisadas aos 3 e 4 dai. Duas plantas agroinfiltradas com cada uma das construções foram usadas para a análise. O acúmulo da proteína fusionada ao GFP foi medida por fluorometria e os resultados obtidos não evidenciaram diferenças significativas quando estas foram comparadas com o controle positivo p14 (Figura 5B).

Figura 5 A. Representação esquemática das diferentes construções empregadas B. Quantificação do GFP por fluorometria (GUS: controle negativo; p14: controle positivo).

A



B

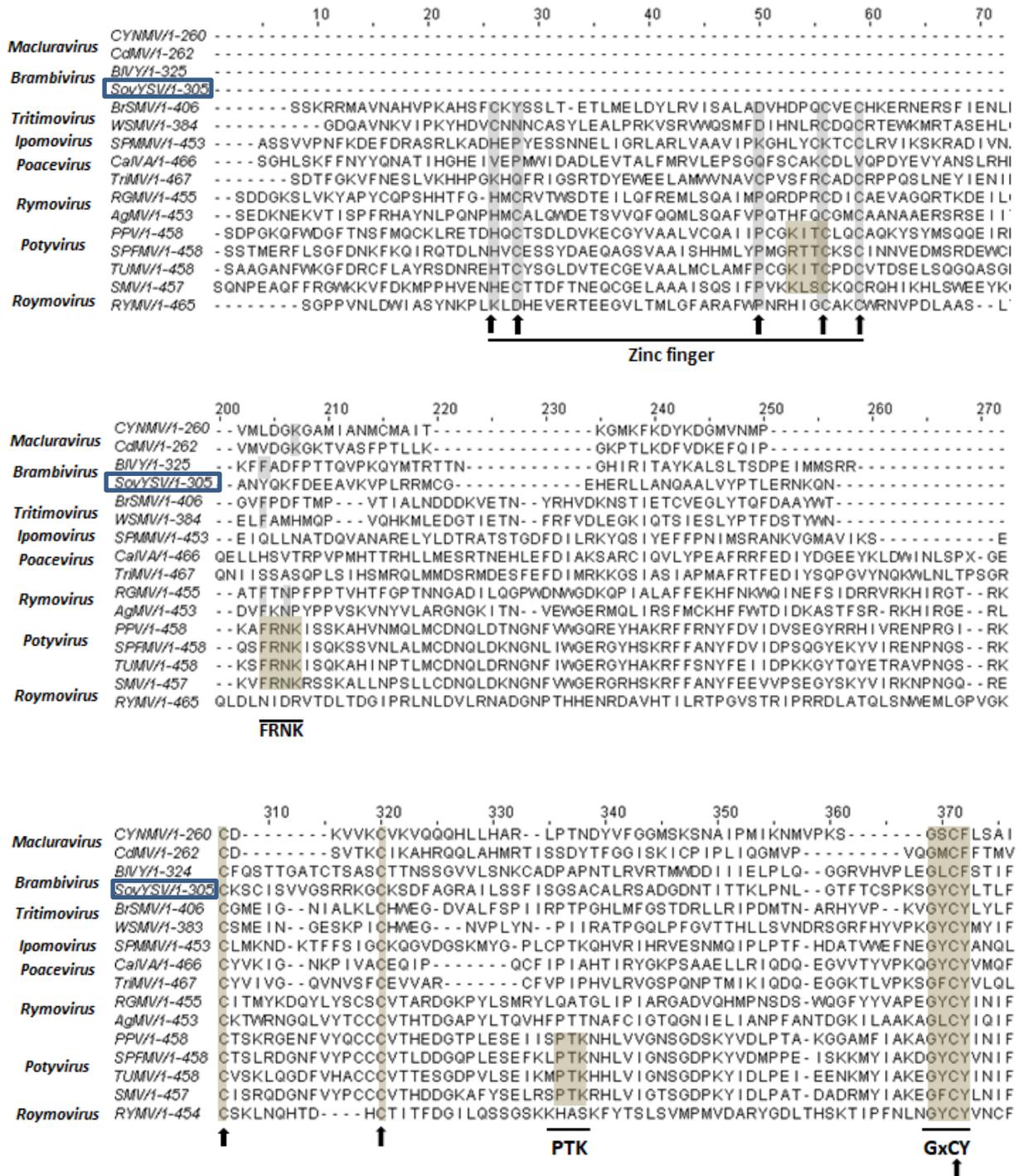


A proteína HCPro, nos primeiros 100 aminoácidos apresentou um motivo característico conservado que é requerido para a transmissão por afídeo no gênero denominado KITC. Este motivo está ausente nos gêneros *Macluravirus*, *Brambivirus* e no SoyYSV devido a falta da região Zinc finger da proteína (Figura 7A). Porém, nos membros do gênero *Potyvirus* que foram analisados o motivo é conservado.

A região intermediária da HCPro se mostrou totalmente conservada, mas exibiu alguns motivos que estão presentes na maioria dos gêneros da família *Potyviridae*. O motivo FRNK, se mostrou altamente conservado nos representantes do gênero *Potyvirus* analisados, enquanto apresentou variações nos isolados dos gêneros *Macluravirus*, *Brambivirus*, *Tritimovirus*, *Rymovirus*, sendo ausente no caso dos isolados dos gêneros *Ipomovirus*, *Poacevirus*, *Roymovirus* e no SoyYSV, cujo gênero não foi determinado (Figura 7B).

A segunda parte da região intermediária foi mais variável, com exceção de duas citosinas (C) nas posições 306 e 320 dos *Potyvirus*, *Roymovirus*, *Brambivirus* e SoyYSV, enquanto que nos demais vírus as duas citosinas estão presentes mas existe uma variação no número de aminoácidos entre essas duas posições. O motivo PTK, descrito em *Potyvirus* como relevante para a transmissão por afídeos e altamente conservado neste gênero, apresentou um grau de conservação variável nos isolados analisados e totalmente ausente no SoyYSV como aconteceu com o motivo conservado KITC. A última região da HCPro, a parte do C terminal apresentou o motivo GxCY, conservado em todos os membros com pequenas variações, sendo a região catalítica das proteases de cisteína conservada na proteína HCPro da família *Potyviridae*.

Figura 7 Características conservadas nas proteínas HCPro nos diferentes representantes analisados dos gêneros pertencentes à família *Potyviridae*. Motivos que podem ser reconhecidos em cada sequência HCPro. **A.** motivo KITC no Zinc finger conservado nos membros do gênero *Potyvirus* e ausente nos gêneros *Macluravirus*, *Brambivirus* e *SoyYSV*; **B.** motivo FRNK altamente conservado no gênero *Potyvirus* e com variações ou ausente nos outros gêneros da família; **C:** Motivo PTK altamente conservado no gênero *Potyvirus* apresentando variações nos outros gêneros e ausente nos *Roymovirus* e no *SoyYSV*.



No caso da proteína VPg, não foram encontradas diferenças específicas, exceto para o triptofano (W) em vermelho (Figura 8), que só está presente nos isolados dos gêneros *Macluravirus*, *Brambivirus* e no SoyYSV. Todos os *Macluravirus* que foram verificados apresentaram o triptofano (W) nesta posição (dados não apresentados).

Figura 8 Características conservadas nas proteínas VPg dos diferentes representantes analisados dos gêneros pertencentes à família *Potyviridae*. O triptofano em vermelho para os gêneros *Macluravirus*, *Brambivirus* e para o SoyYSV não classificado em nenhum gênero. O motivo RQTG altamente conservado para os gêneros *Potyvirus*, *Ipomovirus* e *Brambivirus* e com variações nos outros gêneros.

		130	140	150	160	170	180	190	200
Macluravirus	CYNMV_1/1-217	TITAP	IHQ	DDM	WAHQ	IP	TV	SG	MG
	CdMV_1/1-251	TVTAP	I	HET	SEL	WAHQ	IP	TV	VG
Brambivirus	BIVY_1/1-190	FN	-----	KEV	WSD	TH	ME	KIQ	AT
	SoyYSV_1/1-179	EE	-----	GT	AW	AD	SS	IGN	RL
Tritimovirus	BrSMV_1/1-213	LN	-----	RO	EDA	FF	DH	PMP	---
	WSMV_1/1-197	EN	-----	RW	DED	DF	DE	KIP	---
Ipomovirus	CBSV_1/1-186	DD	-----	YH	IL	KD	DR	ML	GK
	SPMMV_1/1-192	DE	-----	TG	IF	---	KQ	VN	EL
Poacevirus	CaIVA_1/1-204	SQ	-----	KRA	EL	NK	PD	LQ	LP
	TrMV_1/1-426	RT	-----	RML	D	KG	QH	DF	KD
Rymovirus	RGMV_1/1-193	ES	-----	MED	M	IL	Q	P	GV
	AgMV_1/1-193	EN	-----	LHE	S	LL	AP	GA	TF
Potyvirus	PPV_1/1-193	ND	-----	YI	G	DD	KI	TM	QH
	SPFMV_1/1-192	LN	-----	AI	KE	DE	LS	RE	KV
Roymovirus	SMV_1/1-190	KD	-----	MI	GE	EL	DR	QR	VY
	RYMV_1/1-196	LE	-----	LE	PE	VR	WA	DA	VP

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos de supressão, tanto utilizando o clone infeccioso como a expressão transiente não evidenciaram atividade de supressão de silenciamento das proteínas dos diferentes vírus testados. Porém, foram desvendadas algumas informações que permitiram inferir sobre as possíveis rotas de silenciamento que os vírus da família *Potyviridae* poderiam utilizar no processo de infecção.

Uma característica comum na família *Potyviridae* é a presença da proteína P1 no N terminal da poliproteína, seguida pela proteína HCPro. Tanto a P1 como a HCPro são proteases que se libertam do resto da poliproteína por autocatálise. Esta organização padrão tem sido muito estudada nos membros do gênero *Potyvirus*, como também em outros gêneros da família, como *Rymovirus*, *Brambivirus*, *Poacevirus*, *Tritimovirus* (ADAMS et al, 2012), *Roymovirus* e *Bevemovirus* (WYLIE et al., 2017; MOLLOV et al., 2013). No entanto, existem

algumas divergências notáveis. No caso dos membros do gênero *Bymovirus* (o único gênero da família com um genoma bipartido) não possuem P1 e HCPro, estes são substituídas por duas proteínas numa segunda molécula de RNA com função ainda não muito bem determinada (YOU et al., 2010). Entretanto, interessante é a falta da proteína P1 no gêneros *Macluravirus* (Kondo et al., 2012) e *Bevemovirus* (Wylie et al., 2017). O gênero *Ipomovirus* inclui membros que conservam o binômio P1-HCPro (ABRAHAM et al., 2012; GINER et al 2010), assim como vírus que não possuem HCPro, mas que possuem uma ou duas (P1a e P1b) proteases (MBANZIBWA et al., 2009; LI et al., 2008; VALLI et al., 2006).

A importância destas proteínas virais, além da sua função proteolítica mencionada anteriormente é a capacidade de suprimir os mecanismos de defesa das plantas. Muitos vírus contra-atacam por meio da expressão de proteínas supressoras que apresentam elevada especificidade e resposta massiva por parte do hospedeiro no combate à invasão de moléculas (RNAs) exógenas, inibindo diferentes processos metabólicos e garantindo o sucesso da infecção (REVERS et al., 2015). Diversos genes virais da família *Potyviridae* já foram caracterizados e se mostraram capazes de codificar proteínas portadoras dessa capacidade, como, por exemplo, a HCPro dos *Potyvirus*, a P1 dos *Ipomovirus* e casos pontuais como a P1-PISPO do *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) e VPg do *Turnip mosaic virus* (TuMV), pertencentes também ao gênero *Potyvirus* (REVERS et al., 2015; RODAMILANS et al., 2018; VALLI et al., 2006; GINER et al., 2010; CHENG et al., 2017; RAJAMAKI et al., 2014).

Nesse trabalho foram realizados alinhamentos das proteínas P1, HCPro e VPg de alguns isolados, pertencentes a todos os gêneros já descritos na família *Potyviridae*, visando encontrar diferenças entre as proteínas P1, HCPro e VPg do SoyYSV e os diferentes representantes analisados dos gêneros da família *Potyviridae*, que poderiam explicar sua aparente falta de atividade de supressão. No entanto, a comparação mostrou alterações significativas no tamanho e na presença e posição dos motivos descritos como críticos, incluindo o bem caracterizado motivo FRNK. A informação apresentada demonstra a grande divergência da região correspondente à proteína P1 dos membros da família *Potyviridae* (figura 6). Segundo Valli e colaboradores (2007) a proteína P1 pode ser agrupada em dois tipos ou classes: as clássicas "tipo P1a" e "tipo P1b", estas últimas com atividade supressora de silenciamento. No caso da P1 do SoyYSV a proteína P1 é do tipo P1a, com ausência dessa função, o que explica a falta da atividade de supressão apresentada nos experimentos aqui

realizados (figura 3), empregando-se o clone infeccioso do *Plum pox virus* (PPV) como vetor. Resultados semelhantes foram obtidos no experimento de expressão transiente (figura 5), via *Agrobacterium tumefaciens*.

Outras informações importantes reforçam a ausência desta função, inferindo a partir do fato de que, apesar de sua ampla divergência, todos os membros que possuem a proteína P1 de tipo P1a compartilham altos valores de pontos isoelétricos (>9), como foi demonstrado por Figueira et al. (2019) para a P1 do SoyYSV, cujo ponto isoelétrico é 9,33, uma característica não conservada nas proteínas do grupo P1b, que possuem pontos isoelétricos baixos (VALLI et al., 2007). Outro dado que corrobora esta informação, é o fato de o motivo VELI ser conservado no grupo de proteínas P1a (Fig. 6) (VALLI et al., 2007). Ainda mais importante, as proteínas do tipo P1a não apresentam atividade supressora, ficando essa atividade a cargo de outra proteína codificada pelo vírus, enquanto que as proteínas do tipo P1b apresentam essa atividade supressora independentemente da associação com outras proteínas (GINER et al., 2010; MBANZIBWA et al., 2009; TATINENI et al., 2012; VALLI et al., 2006; YOUNG et al., 2012; RODAMILANS et al., 2018).

Por outro lado, HCPro é uma proteína multifuncional e provavelmente a proteína do *Potyvirus* mais estudada em relação à sua capacidade supressora, sendo essencial para a infecção viral e altamente conservada nos membros do gênero *Potyvirus*, variando entre gêneros da família *Potyviridae* (VALLI et al., 2017).

Nos experimentos de supressão, tanto utilizando o clone infeccioso como a expressão transiente da HCPro do SoyYSV, permitiram deduzir que essa atividade está ausente na proteína (Figura 4 e 5). O clone infeccioso do *Plum pox virus* (PPV), empregado nesse trabalho, tem sido utilizado em diferentes trabalhos de supressão de silenciamento de RNA com ótimos resultados (PASIN et al., 2014; RODAMILANS et al., 2013, 2018; VALLI et al., 2006, 2007, 2017). Corroborando estes resultados, e utilizando análises de sequências comparando a HCPro do SoyYSV com outras HCPros de alguns representantes dos outros gêneros da família *Potyviridae* foram encontradas informações interessantes que precisam ser investigadas. A ausência de motivos conservados específicos associadas à determinada função não foram identificados na HCPro do SoyYSV. Por exemplo, o motivo FRNK requerido para uma interação eficiente com a CP (*Coat protein*) e determinante na supressão de silenciamento nos *Potyvirus* (SEO et al., 2013; VALLI et al., 2017), apresentou variações nos outros gêneros e ausência no SoyYSV (Figura 7B).

Outros motivos que foram analisados e de grande importância foram o KITC e PTK, relevantes na transmissão por afídeos (REVERS et al., 2015). Nas análises de sequências o SoyYSV não apresentou nenhum dos dois motivos. Curiosamente, Figueira e colaboradores (2019) mesmo com ausência desses motivos o SoyYSV foi transmitido pelos afídeos *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*. Futuros estudos precisam ser feitos para determinar quais são os mecanismos e a proteína envolvida nesta função.

No caso da VPg, estudos mais recentes demonstraram que a VPg do *Turnip mosaic virus* (TuMV) pertencente ao gênero *Potyvirus*, atua como um supressor de silenciamento gênico pós transcricional e sugere que uma interação com o SGS3 (*suppressor of gene silencing 3*) do hospedeiro pode ser importante neste processo, promovendo a infecção viral (RAJAMAKI et al., 2014; CHENG et al., 2017). A proteína VPg do SoyYSV não apresentou atividade de silenciamento gênico nas condições desse experimento. Um dado interessante obtido a través da análise de sequência aminoacídica permitiu estabelecer que o SoyYSV compartilhou o aminoácido W (Triptofano) com membros dos gêneros *Macluravirus* e *Brambivirus* ausente nos demais vírus analisados (Figura 8).

Os resultados obtidos nesse trabalho não permitem descartar as proteínas P1, HCPro e VPg como possíveis supressores de silenciamento de RNA do SoyYSV. Isso porque muitas proteínas virais cumprem suas funções quando estão associadas à outra proteína do vírus ou também quando interagem especificamente com proteínas do hospedeiro. Vários estudos demonstraram que a HCPro pode interagir com as proteínas CP, CI, P1, VPg e seu precursor NIa (MERITS et al., 1999; ROUDET-TAVERT et al., 2007; ZILIAN et al., 2011) ou interagir especificamente com proteínas hospedeiras (CHENG et al., 2008; ENDRES et al., 2010; SHEN et al., 2010; JAMOUS et al., 2011; DIELEN et al., 2011; ALA-POIKELA et al., 2011; NAKAHARA et al., 2012; HAIKONEN et al., 2013; IVANOV et al., 2016; POQUE et al., 2018), porém, não se pode subestimar a variabilidade genética dos vírus, principalmente aqueles constituídos de RNA.

A maioria dos vírus, se não todos, codificam pelo menos uma proteína com atividade de supressão de silenciamento gênico (CSORBA et al., 2015; ZHAO et al., 2016) e no caso dos *Potyvirus* amplamente estudado, eles são incapazes de iniciar uma infecção em ausência de um supressor ativo. Estes resultados demonstram a relevância de conhecer qual proteína do SoyYSV poderia estar cumprindo esta função para a viabilidade viral do mesmo.

Possivelmente o desenvolvimento de um clone infeccioso do SoyYSV permitirá desvendar o mecanismo utilizado pelo vírus para causar infecção e ser extrapolado a gêneros com características genômicas semelhantes que não estão caracterizados em detalhe no caso dos *Macluravirus* e *Brambivirus*.

5 REFERENCIAS

ABRAHAM, A., MENZEL, W., VETTEN, H. J., WINTER, S. Analysis of the tomato mild mottle virus genome indicates that it is the most divergent member of the genus *Ipomovirus* (family Potyviridae). *Archive Virology*, v. 157, p. 353-357, 2012.

ADAMS, M. J.; ZERBINI, F. M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D. C.; VALKONEN, J. P. T. Family *Potyviridae*. *Virus Taxonomy, Nine Report of the International Committee on Taxonomy of Virus*. Academic Press, New York, p. 1069-1089, 2012.

ALA-POIKELA, M., GOYTIA, E., HAIKONEN, T., RAJAMAKI, M. L., & VALKONEN, J. T. Helper component proteinase of genus *Potyvirus* is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E that contains a 4E binding motif. *Journal of Virology*, v. 85, p. 6784-6794. 2011.

CHENG, X., & WANG, A. The *Potyvirus* silencing suppressor protein VPg mediates degradation of SGS3 via ubiquitination and autophagy pathways. *Journal of Virology*, v. 91, e01478-16, 2017.

CHENG, Y. Q., LIU, Z. M., XU, J., ZHOU, T., WANG, M., CHEN, Y.T., et al. HCPro protein of sugar cane mosaic virus interacts specifically with maize ferredoxin-5 *in vitro* and *in planta*. *Journal of General Virology*, v. 89, p. 2046-2054, 2008.

CSORBA, T., KONTRA, L. & BURGYÁN, J. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 479480, p. 85-103, 2015.

DAROS, J.A. Viral suppressors combatting RNA silencing. *Nature Plants*, v. 3, 17098, 2017.

DIELEN, A. S., SASSAKI, F. T., WALTER, J., MICHON, T., MENARD, G., PAGNY, G., et al. The 20S proteasome $\alpha 5$ subunit of *Arabidopsis thaliana* carries an RNase activity and interacts *in planta* with the *Lettuce mosaic virus* HCPro protein. *Molecular Plant Pathology*, v. 12, p. 137-150, 2011.

ENDRES, M. W., GREGORY, B. D., GAO, Z., FOREMAN, A. W., MLOTSHWA, S., GE, X., et al. Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathogens*, v. 6, e1000729, 2010.

FIGUEIRA, A.R., GERALDINO-DUARTE, P.S., NUÑEZ, A.M.P., VAN LENT, J., GALVINO-COSTA, S.B.F., FARMAN, M., GOODIN, M. M. Characterization of *Soybean yellow shoot virus*, a new member of the family *Potyviridae* infecting Soybean plants in Brazil. *Plant Disease*, 2019.

- GINER, A., LAKATOS, L., GARCÍA-CHAPA, M., LÓPEZ-MOYA, J.J., BURGYÁN, J. Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs, *PLoS Pathogens*, v. 6, e1000996, 2010.
- HAIKONEN, T., RAJAMAKI, M. L., TIAN, Y.P., & VALKONEN, J. P. T. Mutation of a short variable region in HCPro protein of *Potato virus A* affects interactions with a microtubule-associated protein and induces necrotic responses in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 26, p. 721-733, 2013.
- IVANOV, K. I., ESKELIN, K., BASIC, M., DE, S., LOHMUS, A., VARJOSALO, M., & MAKINEN, K. Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro. *The Plant Journal*, v. 85, p. 30-45, 2016.
- JAMOUS, R. M., BOONROD, K., FUELLGRABE, M. W., ALI-SHTAYEH, M. S., KRCZAL, G., & WASSENEGGER, M. The helper component-proteinase of the *Zucchini yellow mosaic virus* inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity *in vitro*. *Journal of General Virology*, v. 92, p. 2222-2226, 2011.
- KONDO, T., FUJITA, T. Complete nucleotide sequence and construction of an infectious clone of Chinese yam necrotic mosaic virus suggest that macluraviruses have the smallest genome among members of the family Potyviridae. *Archive Virology*, v. 157, p. 2299–2307, 2012.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., TAMURA, K. Mega X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, p. 1547-1449, 2018.
- LABEREKE, N.V., ENGLER, G., HOLSTERS, M., VAN DEN ELSACKER, S., ZAENEN, I., SCHILPEROORT, R.A., SCHELL, J. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, v. 252, p. 169-170, 1974.
- LAIN, S., RIECHMANN, J.L., GARCIA, J.A. The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research*, v. 13, p. 157-172.
- LI, W., HILF, M. E., WEBB, S. E., BAKER, C. A., ADKINS, S. Presence of P1b and absence of HC-Pro in Squash vein yellowing virus suggests a general feature of the genus *Ipomovirus* in the family Potyviridae. *Virus Research*, v. 135, p. 213-219, 2008.
- MBANZIBWA, D. R., TIAN, Y., MUKASA, S. B., VALKONEN, J. P. Cassava brown streak virus (Potyviridae) encodes a putative Maf/ HAM1 pyrophosphatase implicated in reduction of mutations and a P1 proteinase that suppresses RNA silencing but contains no HC-Pro. *Journal of Virology*, v. 83, p. 6934-6940, 2009.
- MERITS, A., GUO, D., JARVEKULG, L., & SAARNA, M. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A Potyvirus -encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology*, v. 263, p. 15-22, 1999.
- MOLLOV, D., LOCKHART, B., ZLESKAK, D. Complete nucleotide sequence of rose yellow mosaic virus, a novel member of the family *Potyviridae*. *Archive Virology*, v. 158, p. 1917-1923, 2013.

NAKAHARA, K. S., MASUTA, C., YAMADA, S., SHIMURA, H., KASHIHARA, Y., WADA, T. S., et al. Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*, v. 109, p. 10113-10118, 2012.

PASIN, F., SIMON-MATEO., & GARCIA, J.A. The hypervariable amino-terminus of P1 protease modulates potyviral replication and host defense responses. *PLoS Pathogens*, v. 10, e1003985, 2014.

POQUE, S., WU, H.W., HUANG, C. H., CHENG, H. W., HU, W.C., YANG. D.W., YEH. S. D. Potyviral Gene-Silencing Suppressor HCPro Interacts with Salicylic Acid (SA)-Binding Protein 3 to Weaken SA-Mediated Defense Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 31, p. 86-97. 2018.

RAJAMAKI, M. L., STRENG, J., & VALKONEN, J. P. T. Silencing suppressor protein VPg of a *Potyvirus* interacts with the plant silencing-related protein SGS3. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 27, p. 1199-1210, 2014.

REVERS, F., & GARCÍA, J. A. Molecular Biology of Potyvirus es. *Adv. Virus 581 Res*, v. 92, p. 101-199, 2015.

RODAMILANS, B., VALLI, A., & GARCIA, J.A. Mechanistic divergence between P1 proteases of the family Potyviridae. *Journal General Virology*, v. 94, p. 1407–1414, 2013.

RODAMILANS, B., VALLI, A., MINGOT, A., LEON, S. D., LOPEZ-MOYA, J. J., & GARCIA, J.A. An atypical RNA silencing suppression strategy provides a snapshot of the evolution of sweet potato-infecting Potyvirus es. *Scientific Reports*, v.8, 15937, 2018.

ROUDET-TAVERT, G., MICHON, T., WALTER, J., DELAUNAY, T., REDONDO, E., & LE GALL, O. Central domain of a Potyvirus VP gis involved in the interaction with the host translation initiation factor Eif4e and the viral protein HCPro. *Journal of General Virology*. v. 88, p. 1029-1033, 2007.

SAMBROOK, J. RUSSELL, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SEO, J. K., VO PHAN, M. S., KANG, S. H., CHOI, H. S., & KIM, K. H. The charged residues in the surface-exposed C-terminus of the *Soybean mosaic virus* coat protein are critical for cell-to-cell movement. *Virology*, v. 446, p. 95-101, 2013.

SHEN, W., YAN, P., GAO, L., PAN, X., WU, J., & ZHOU, P. Helper component-proteinase (HCPro) protein of *Papaya ringspot virus* interacts with papaya calreticulin. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, p. 335-346, 2010.

TATINENI, S., QU, F., LI, R., MORRIS, T. J., FRENCH, R. Triticum mosaic poacevirus enlists P1 rather than HC-Pro to suppress RNA silencing-mediated host defense. *Virology*, v. 433, p. 104-115, 2012.

- TAUTZ, D., RENZ, M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Analytical Biochemistry*, v. 132, p. 14-19, 1983.
- URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A.L., & BERNARDI, F. Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Research*, v. 74, p. 157-175, 2001.
- VALLI, A. A., GALLO, A., RODAMILANS, B., LOPEZ-MOYA, J.J, GARCIA, J.A. The HCPro from *Potyviridae* family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have. *Molecular Plant Pathology*, v. 19, p. 744-763, 2018.
- VALLI, A.; LOPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family *Potyviridae*. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 1016-1028, 2007.
- VALLI, A.; MARTIN-HERNANDEZ, A. M.; LOPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of Cucumber vein yellowing Ipomovirus, a member of the family Potyviridae that lacks the cysteine protease HC Pro. *J. Virol.*, v. 80, p. 10055-10063, 2006.
- WANG, M.B., MASUTA, C., SMITH, N. A., SHIMURA, H. RNA Silencing and Plant Viral Diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 25, p. 1275-1285, 2012.
- WATERHOUSE, A.M., PROCTER, J.B., MARTIN, D.M.A., CLAMP, M., BARTON, G.J. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics Applications*, v. 25, p. 1189-1191, 2009.
- WYLIE, S.J., ADAMS, M., CHALAM, C., KREUZE, J., LOPEZ-MOYA, J.J., OHSHIMA, K., PRAVEEN, S., RABENSTEIN, F., STENGER, D., WANG, A. AND MURILO ZERBINI, F. ICTV virus taxonomy profile: Potyviridae. *Journal General Virology*, v. 98, p. 352–354, 2017.
- YOU, Y., SHIRAKO, Y. Bymovirus reverse genetics: requirements for RNA2-encoded proteins in systemic infection. *Mol Plant Pathol*, v. 11, p. 383-394, 2010.
- YOUNG, B. A., STENGER, D. C., QU, F., MORRIS, T. J., TATINENI, S., FRENCH, R. Tritimovirus P1 functions as a suppressor of RNA silencing and an enhancer of disease symptoms. *Virus Research*, v. 163, p. 672- 677, 2012.
- ZHAO, J. H., HUA, C. L., FANG, Y. Y. & GUO, H. S. The dual edge of RNA silencing suppressors in the virus-host interactions. *Curr. Opin. Virol*, v. 17, p. 39-44, 2016.
- ZILIAN, E., & MAISS, E. Detection of plum pox potyviral protein-protein interactions in planta using an optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system. *Journal of General Virology*, v. 92, p. 2711-2723, 2011.