

ROBERTA RÚBIA PINTO NOGUEIRA LIMA

**INTERAÇÃO *IN VIVO* ENTRE A PROTEÍNA RICA EM CISTEÍNA (CRP) DO  
*Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) E A REGIÃO PROMOTORA DO GENE  
*SNC1* DE SOJA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fitopatologia, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L732i  
2018

Lima, Roberta Rúbia Pinto Nogueira, 1992-  
Interação *in vivo* entre a proteína rica em cisteína (CRP) do  
*Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) e a região promotora do  
gene *SNC1* de soja / Roberta Rúbia Pinto Nogueira Lima. –  
Viçosa, MG, 2018.  
x, 39 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Claudine Márcia Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-36.

1. Soja - Doenças e pragas. 2. Cisteína. 3. Carlavírus.  
4. Vírus de plantas. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em  
Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.3498

ROBERTA RÚBIA PINTO NOGUEIRA LIMA

**INTERAÇÃO *IN VIVO* ENTRE A PROTEÍNA RICA EM CISTEÍNA (CRP) DO  
*Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) E A REGIÃO PROMOTORA DO GENE  
*SNC1* DE SOJA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fitopatologia, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2018.

  
Poliane Alfenas-Zerbini

  
Silvana Pinheiro Dadalto

  
Francisco Murilo Zerbini Júnior  
(Presidente da Banca)

Aos meus pais, Vilma e Roberto, e à minha irmã Vanessa,

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Vilma e Roberto, por acreditarem em mim, pelo exemplo de vida e sucesso, pelo incentivo, compreensão e todo o esforço para me ajudar a alcançar tudo o que desejo.

À minha irmã, Vanessa, por ser minha melhor metade, pela amizade e companhia mesmo distante, pelos conselhos, ajuda, grude e palavras de incentivo e carinho.

Ao Renan, pela companhia diária ao longo dessa jornada, pelo carinho, amor e por toda ajuda sempre que precisei, mesmo que fosse me dando comida ou enchendo vasos de plantas.

Ao Perry, pela companhia e amor fiel, cheio de mordidas.

Ao Handebol Feminino da LUVE, em toda sua formação, pela amizade, pelas conquistas dentro e fora de quadra, pelos churrascos e, mais importante, pelo ensinamento de trabalho em grupo. Em especial à Amanda, Brenda, Bruno, Cupim, Iara, Isadora Dale Hand, Vanessa e Victor pela amizade que se estende além do handebol.

Às atléticas Biológicas e Engenharias, pela confiança e por me proporcionarem mais um contato com o handebol e momentos de descontração e disputa saudáveis.

Aos meus amigos de curso e de vida, em especial, Isabela, Juliana, Lili, Laura, María, Horrível, Piu e Taty, por me mostrarem que as verdadeiras amizades perduram independente do tempo e distância. Amo vocês.

Ao ap 102/402 pelo convívio, risadas, amizade e por cada momento compartilhado, seja um almoço, uma cervejinha ou somente um café.

À minha família pela compreensão nos momentos ausentes e por tornarem cada encontro o mais divertido possível.

Ao Instituto Regina Pacis e à Universidade Federal de Viçosa, e todos os professores que passaram pela minha vida, agradeço pela formação pessoal e educacional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Claudine Márcia Carvalho pela oportunidade de participar do seu grupo e pela confiança.

Ao professor Francisco Murilo Zerbini Júnior pela disponibilidade, ensinamentos e ajuda valiosa.

Ao Ruan Maloni por ter me guiado durante todo o experimento, compartilhando seus conhecimentos, me ajudando a cada etapa. Sem você este trabalho não seria possível. Muito obrigada!

Aos amigos conquistados na virologia, Hermano e Tarsiane, agradeço pela imensa ajuda, pela disponibilidade, pelo carinho, pelas palavras amigas, por aguentarem minhas lamentações e pela amizade que cresceu. Não tenho palavras suficientes para vocês.

Às amigadas criadas nas longas horas passadas na FIP 102, em especial ao Huárlen, Luciana, Luísa e ao Paulo. Sem vocês as horas teriam sido mais sofridas e não haveria paracetamol para ajudar. Obrigada pelo companheirismo, ajuda e amizade. Vocês estão guardados sempre no coração.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular (LVVM), em sua antiga e atual formação, Ana Carolina P., Ana Carolina G., Angélica, Ayane, Camila, César, Diogo, Gabriela, Igor, João Paulo A., João Wesley, Josiane, Larissa, Márcio, Marcos, Monique, Murilo, Osvaldo, Patrícia, Rafaela, Ruither, Sarah, Sílvia e Tales, por toda a ajuda, opinião, conselhos, risadas, cafés e por tornarem o ambiente de trabalho sempre agradável.

À todos que contribuíram, torceram por mim e me acompanharam durante toda essa etapa, meu mais sincero obrigada.

## **BIOGRAFIA**

Roberta Rúbia Pinto Nogueira Lima, filha de Vilma Maria Pinto e Roberto Nogueira Lima, nasceu em 20 de junho de 1992 na cidade de Patrocínio, Minas Gerais, sendo criada em Sete Lagoas - MG.

Cursou o ensino fundamental e ensino médio no Instituto Regina Pacis, Sete Lagoas, MG.

No ano de 2010, ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa. Em 2013, participou do programa Ciências sem Fronteiras, cursando um ano letivo na The University of Western Ontario, London, CA. Graduiu-se em janeiro de 2016.

Em março de 2016, iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 27 de fevereiro de 2018.

## SUMÁRIO

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO .....                                                                    | ix |
| ABSTRACT .....                                                                  | x  |
| INTRODUÇÃO.....                                                                 | 1  |
| REVISÃO DE LITERATURA .....                                                     | 3  |
| A soja .....                                                                    | 3  |
| A família <i>Betaflexiviridae</i> .....                                         | 4  |
| O gênero <i>Carlavirus</i> .....                                                | 5  |
| O <i>Cowpea mild mottle virus</i> .....                                         | 6  |
| As vias moleculares de resposta a infecção viral .....                          | 8  |
| OBJETIVO .....                                                                  | 17 |
| Objetivo geral.....                                                             | 17 |
| Objetivos específicos .....                                                     | 17 |
| MATERIAL E MÉTODOS.....                                                         | 18 |
| Construções plasmidiais.....                                                    | 18 |
| Expressão transiente em protoplastos .....                                      | 18 |
| Fixação do material pra o ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) ..... | 20 |
| Padronização da fragmentação do DNA de soja.....                                | 21 |
| Lise nuclear e fragmentação da cromatina.....                                   | 21 |
| Pré-clareamento e imunoprecipitação .....                                       | 22 |

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Reversão do <i>crosslink</i> e purificação do DNA imunoprecipitado..... | 23 |
| PCR convencional.....                                                   | 24 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                            | 25 |
| Obtenção de protoplastos e contagem das células .....                   | 25 |
| Expressão da CRP em protoplastos .....                                  | 26 |
| Padronização da sonicação.....                                          | 27 |
| Amplificação de <i>SNC1</i> por PCR convencional.....                   | 28 |
| LITERATURA CITADA.....                                                  | 33 |
| APÊNDICE .....                                                          | 37 |
| Protocolo para ChIP de protoplastos de soja.....                        | 37 |

## RESUMO

LIMA, Roberta Rúbia Pinto Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Interação *in vivo* entre a proteína rica em cisteína (CRP) do *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) e a região promotora do gene *SNC1* de soja.** Orientadora: Claudine Márcia Carvalho.

Dentre as diversas doenças que atingem plantações de soja, a necrose da haste tornou-se preocupante nos últimos anos. De rápida disseminação e grande severidade, podendo levar as plantas à morte, a necrose da haste é causada pelo *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), um vírus pertencente ao gênero *Carlavirus* da família *Betaflexiviridae*. Durante o processo de infecção viral, respostas de defesa são ativadas pela planta. Essa ativação é mediada, inicialmente, pelo reconhecimento de efetores virais por proteínas receptoras do hospedeiro. Os patógenos são capazes de suprimir algumas respostas de defesa das plantas. Para o carlavírus *Chrysanthemum virus B* (CVB), foi comprovado que a proteína viral rica em cisteína (CRP) é capaz de atuar como fator de transcrição, modulando a expressão gênica do hospedeiro. Uma vez que a CRP do CPMMV se assemelha à do CVB, é possível que ela também possa atuar como fator de transcrição. Neste trabalho, primeiramente foi estabelecido um protocolo para imunoprecipitação da cromatina (ChIP) de protoplastos de soja. Em seguida, utilizando-se a técnica de ChIP foi possível confirmar a interação, *in vivo*, entre a CRP de um isolado atenuado do CPMMV e a região promotora de um gene de soja relacionado a defesa, o *SNC1*, contribuindo para a elucidação das funções da CRP no estabelecimento da infecção viral.

## ABSTRACT

LIMA, Roberta Rúbia Pinto Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. ***In vivo* interaction between the cysteine-rich protein (CRP) of Cowpea mild mottle virus (CPMMV) and the promoter region of the soybean *SNC1* gene.** Advisor: Claudine Márcia Carvalho.

Among the variety of soybean diseases, stem necrosis has become of great concern in the latest years. It is a severe disease that can lead to plant death, and is caused by *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), a member of the genus *Carlavirus* in the family *Betaflexiviridae*. During the viral infection process, a number of defense responses are activated by the plant. This activation is triggered, at first, by the recognition of viral effectors by host receptor proteins. Pathogens are capable of suppressing some of the host's defenses. It has been shown that the cystein-rich protein (CRP) from the carlavirus *Chrysanthemum virus B* (CVB) acts as a transcription factor, modulating the host's gene expression. In this work, at first, a protocol for soy protoplast chromatin immunoprecipitation (ChIP) was established. Then, using the ChIP assay, the *in vivo* interaction between the CRP from a mild isolate of CPMMV, which is structurally similar to the one from CVB, and the promoter region of a soybean defense related gene, *SNC1*, was confirmed, contributing to understand the role of this protein in the viral infection process.

## INTRODUÇÃO

Dentre os grãos cultivados no Brasil, a soja apresenta posição de destaque principalmente em termos de sua elevada produtividade e diversidade de usos. No entanto, nas últimas décadas, uma gama de doenças vem atingindo essa cultura e reduzindo o rendimento das lavouras.

A necrose da haste é uma doença viral, causada por uma espécie do gênero *Carlavirus*, o *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV). O vírus é transmitido de maneira não-persistente pela mosca branca *Bemisia tabaci* MEAM1. Diferentes isolados desse vírus podem causar, em um mesmo cultivar de soja, tanto sintomas severos como nanismo, queima do broto e necrose, como sintomas mais brandos de mosaico e clareamento de nervuras.

Por serem organismos sésseis, as plantas evoluíram de forma a ativar uma série de respostas de defesa contra os patógenos. O reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (“pathogen-associated molecular patterns”, PAMPs) ativa a imunidade inata do hospedeiro (“PAMP-triggered immunity”, PTI), sendo esta a primeira linha de defesa das plantas.

Os patógenos codificam ainda uma série de moléculas efetoras. Estas podem ser reconhecidas por proteínas NB-LRR, ativando uma segunda linha de defesa (“effector-triggered immunity”, ETI). As proteínas NB-LRR constituem uma classe de proteínas receptoras caracterizadas pela presença de um domínio central de ligação a nucleotídeos (“nucleotide binding”, NB) e de repetições ricas em leucina (“leucine-rich repeats”, LRR) na extremidade C-terminal.

O reconhecimento de efetores virais por proteínas NB-LRR ativa a síntese de ácido salicílico que, por sua vez, desencadeia uma série de respostas de defesa com o

objetivo de restringir o patógeno a seu sítio de infecção. Dentre essas respostas estão a expressão de genes relacionados a patogenicidade, síntese de espécies reativas de oxigênio e morte celular programada, denominada resposta de hipersensibilidade.

Quando o acúmulo de ácido salicílico persiste e os sinais de resposta são emitidos a tecidos distantes e não infectados, é ativada a resistência sistêmica adquirida (“systemic acquired resistance”, SAR) e a planta fica protegida contra ataques futuros do patógeno. A proteína NPR1 (“Nonexpresser of PR genes 1”) é um importante indutor da SAR, uma vez que ela se liga diretamente ao ácido salicílico. Por sua vez, a atividade de NPR1 é regulada pelo produto do gene *SNC1* (“Supressor of NPR1, constitutive 1”), uma proteína NB-LRR que naturalmente encontra-se sob regulação negativa.

Moléculas efetoras de patógenos podem atuar também como fatores de transcrição, ligando-se diretamente ao DNA do hospedeiro e modulando a expressão de determinados genes. Recentemente foi comprovado que a proteína rica em cisteína (“cystein-rich protein”, CRP) do carlavírus *Chrysanthemum virus B* (CVB) atua como fator de transcrição, regulando positivamente a expressão de um gene responsável por proliferação celular e crescimento do tecido do mesófilo.

Visto que a CRP de CPMMV assemelha-se à do CVB, é razoável supor que ela possa desempenhar funções semelhantes, atuando como um fator de transcrição. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi verificar se a CRP codificada pelo CPMMV é capaz de interagir *in vivo* com o gene *SNC1* de soja, atuando como um fator de transcrição e modulando sua atividade. O entendimento da função da CRP é importante para a compreensão do seu papel no estabelecimento da infecção viral, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias de controle para a necrose da haste.

## REVISÃO DE LITERATURA

### A soja

Originária da China, a soja (*Glycine max*) é hoje um dos grãos mais cultivados no mundo. Levada ao ocidente no século XV, era inicialmente utilizada no forrageio e apenas passou a ser cultivada para alimentação anos depois, tendo o cultivo de grãos ultrapassado o de forragem, nos Estados Unidos, apenas na década de 1940 (Embrapa, 2004).

Sua introdução no Brasil se deu em 1882, mas somente na década de 1940 o Brasil apontou como produtor no mercado internacional pela primeira vez. O crescimento vertiginoso da produção continuou durante a década de 1960, mas foi durante os anos 1970 e início da década de 1980 que a soja tornou-se a cultura mais importante do agronegócio do país, contribuindo, atualmente, com uma produção de cerca de 113,9 milhões de toneladas e movimentando U\$25,4 bilhões em exportações (Embrapa, 2017). Esse crescimento acentuado pode ser atribuído não apenas à ampliação da área de cultivo, mas também a maiores investimentos em pesquisa e tecnologia, que levaram a um maior rendimento da produção (Embrapa, 2004).

Apesar desse enorme crescimento e dos avanços tecnológicos na produção, a monocultura da soja praticada em todo o país favorece o surgimento de doenças que afetam o desenvolvimento das sementes e/ou das plantas e, conseqüentemente, a produtividade das lavouras e a qualidade das sementes (Henning *et al.*, 2014)

Desde a safra 2000/01 uma virose vem preocupando agricultores no Brasil por sua rápida disseminação e por causar perdas de até 85% da lavoura (Almeida, 2008). Conhecida como necrose da haste da soja, essa doença causa a queima do broto e a necrose das hastes e nervuras, podendo levar as plantas à morte. Pode apresentar também sintomas menos severos que não necessariamente matam a planta, como nanismo, deformações foliares e em alguns casos o mosaico (Henning *et al.*, 2014). O agente

causador da necrose da haste é o vírus *Cowpea mild mottle virus*, pertencente ao gênero *Carlavirus* da família *Betaflexiviridae* (Marubayashi *et al.*, 2010; Zanardo *et al.*, 2014a; Zanardo *et al.*, 2014b).

### **A família *Betaflexiviridae***

A família *Betaflexiviridae* é constituída por onze gêneros subdivididos em duas subfamílias: *Capillovirus*, *Chordovirus*, *Carlavirus*, *Citrivirus*, *Divavirus*, *Foveavirus*, *Prunevirus*, *Robigovirus*, *Tepovirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* (ICTV, 2016). Os vírions pertencentes a essa família são filamentosos, medem cerca de 600 x 13 nm e possuem RNA de fita simples senso positivo, com um “cap” (m<sup>7</sup>GpppG) na extremidade 5’ e uma cauda poli-A na extremidade 3’ (Adams *et al.*, 2004). Podem possuir até seis fases abertas de leitura (“open reading frames”, ORFs) traduzidas a partir de mRNAs subgenômicos (Martelli *et al.*, 2007).

A primeira ORF é a replicase viral que possui diversos domínios conservados entre os membros da família *Betaflexiviridae*: metiltransferase, RNA helicase e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), todos envolvidos na replicação viral (Martelli *et al.*, 2007). Em seguida estão as ORFs que codificam as proteínas responsáveis pelo movimento viral, tanto célula-a-célula quanto a longa distância. Nos gêneros classificados na subfamília *Quinvirinae* (*Carlavirus*, *Foveavirus* e *Robigovirus*) essas proteínas são codificadas por três ORFs (ORFs 2, 3 e 4) que formam, em conjunto, o bloco triplo de genes (“triple gene block”, TGB). Os demais gêneros, classificados na subfamília *Trivirinae*, possuem apenas uma proteína envolvida no movimento viral (Martelli *et al.*, 2007). Nos carlavírus a ORF5 é responsável por codificar a proteína capsidial (CP) (Adams *et al.*, 2004) e a ORF6, presente também nos gêneros *Trichovirus* e *Vitivirus*, codifica uma proteína rica em cisteína (CRP) que possui atividade de ligação a ácidos

nucleicos (“nucleic acid-binding protein”, NABP) (Martelli *et al.*, 2007). A CRP de alguns betaflexivírus também possui a capacidade de suprimir o silenciamento gênico, como comprovado em estudos feitos com *Potato virus M* (PVM, gênero *Carlavirus*) e *Grapevine virus A* (GVA, gênero *Vitivirus*) (Zhou *et al.*, 2006).

Apesar da extensa variedade de proteínas encontradas na família *Betaflexiviridae*, principalmente no que concerne as proteínas de movimento, a proteína capsidial e a RdRp são encontradas em todos os gêneros da família. Essas duas proteínas são utilizadas para a classificação filogenética da família e dos gêneros pertencentes a ela (Adams *et al.*, 2004).

### **O gênero *Carlavirus***

Atualmente são reconhecidas 47 espécies de vírus pertencentes ao gênero *Carlavirus*, que constitui o gênero com o maior número de representantes dentro da família *Betaflexiviridae* (Zanardo e Carvalho, 2017). São vírus filamentosos, possuindo genoma de RNA fita simples senso positivo e seis ORFs. Assim como nos demais gêneros da família *Betaflexiviridae*, o RNA viral é capeado na extremidade 5’ e poliadenilado na extremidade 3’ (King *et al.*, 2011).

Os carlavírus são transmitidos por insetos, a maioria por afídeos (King *et al.*, 2011), e são capazes de replicar nas células parenquimáticas do hospedeiro (Martelli *et al.*, 2007). Os sintomas causados nas plantas hospedeiras podem variar de brandos a severos dependendo das condições ambientais, da espécie ou estirpe de vírus e do cultivar infectado (Zanardo *et al.*, 2014a; Zanardo *et al.*, 2014b). Há também diversos casos de hospedeiros assintomáticos (Martelli *et al.*, 2007).

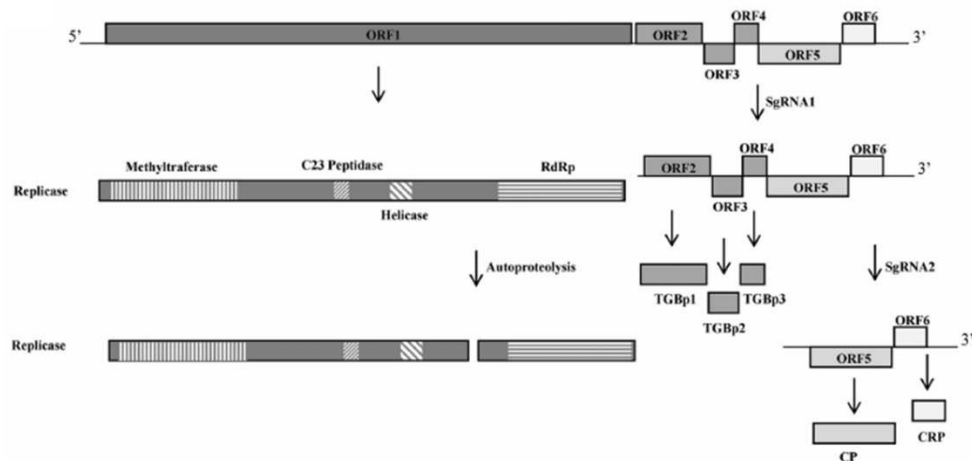
No Brasil, carlavírus já foram relatados em soja (Almeida, 2008; Zanardo *et al.*, 2014a; Zanardo *et al.*, 2014b), feijoeiro (Costa *et al.*, 1983), batata (Gaspar *et al.*, 2008),

alho (Fajardo *et al.*, 2001), couve (Gaspar *et al.*, 2008), lírio (Rivas, 2010) e melão (Nagata *et al.*, 2005).

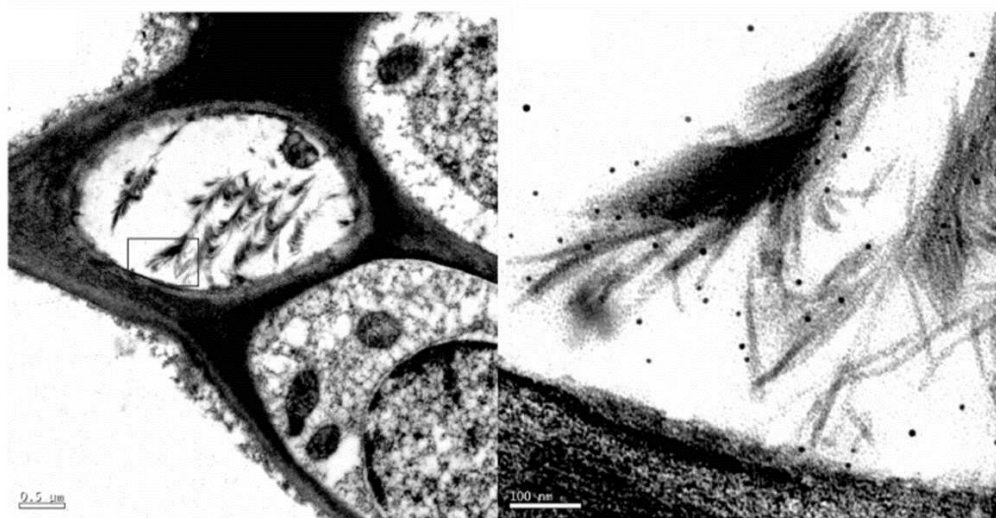
### **O *Cowpea mild mottle virus***

O *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), assim como os demais carlavírus, possui genoma composto por uma molécula de RNA fita simples senso positivo capeada na extremidade 5' e poliadenilada na extremidade 3' (Zanardo *et al.*, 2014a). Seu genoma de aproximadamente 8200 nucleotídeos é organizado em seis ORFs. A ORF1 codifica a replicase viral (223 kDa) e apresenta quatro domínios conservados: metiltransferase, peptidase, RNA helicase e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). As ORFs 2, 3 e 4 formam o bloco triplo de genes (TGB1p, 25kDa; TGB2p, 12kDa; TGB3p, 7kDa) responsáveis pelo movimento das partículas virais. A ORF5 codifica a proteína capsidial (CP, 34 kDa) e a ORF6, uma proteína rica em cisteína (CRP, 15,2 kDa) com atividade de ligação a ácidos nucleicos (NABP) (Zanardo *et al.*, 2014a). Dentre as seis ORFs, somente a ORF1 é traduzida a partir do RNA genômico, sendo as demais traduzidas a partir de RNAs subgenômicos (sg RNAs) (Zanardo e Carvalho, 2017) (Figura 1).

Medindo 600-650 x 10-15 nm, as partículas virais são encontradas nas células da epiderme, mesofilo e parênquima foliares, formando agregados em forma de feixes e inclusões tipo escova (Zanardo e Carvalho, 2017) (Figura 2).



**Figura 1.** Organização genômica do CPMMV e estratégia utilizada para expressão de proteínas. A ORF1 é a única traduzida a partir do RNA genômico, gerando uma poliproteína que é autoclivada entre os domínios RNA helicase e RdRp, sendo removido um fragmento de 30-40 kDa. As demais proteínas são traduzidas por meio de RNAs subgenômicos (sgRNAs). O sgRNA1 codifica o TGB (ORFs 2, 3 e 4) e o sgRNA2 codifica a CP (ORF 5) e a CRP (ORF 6). Reproduzido de Zanardo e Carvalho (2017).



**Figura 2.** Micrografia eletrônica de transmissão de folhas de soja cv. CD206 infectada por CPMMV 14 dias após inoculação mecânica, mostrando as inclusões em forma de escova. Reproduzido de Zanardo e Carvalho (2017).

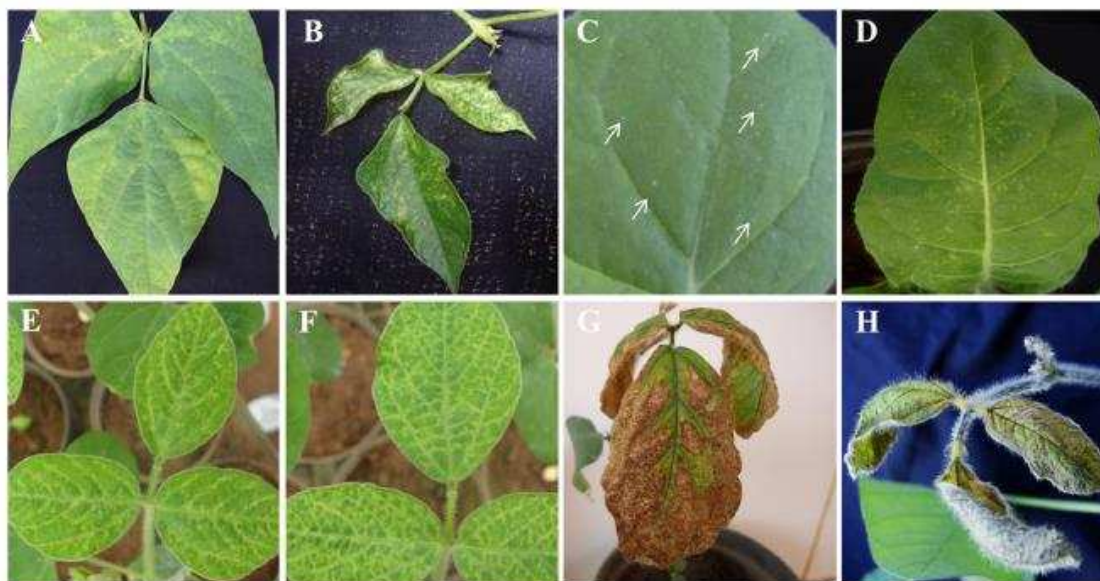
O CPMMV e o *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) são os únicos carlavírus transmitidos pela mosca branca, *Bemisia tabaci* (Almeida, 2008; Zanardo e Carvalho, 2017). O CPMMV é transmitido de forma não persistente pelo vetor e infecta naturalmente apenas hospedeiros pertencentes à família *Fabaceae*, causando sintomas muito variáveis que dependem do hospedeiro, do isolado viral e das condições ambientais (Zanardo *et al.*, 2014a; Zanardo e Carvalho, 2017).

No Brasil, o CPMMV tem se tornado uma grande preocupação, uma vez que afeta culturas como soja e o feijão comum, economicamente importantes para o país. Em cultivares de feijão Jalo, o vírus causa mosaico angular e distorções foliares. Já em soja os sintomas são altamente variáveis. Podem ser atenuados como clorose, mosaico, mosqueado e clareamento de nervuras, ou severos, como o abortamento de brotos, nanismo e necrose foliar e da haste, o que dá nome à doença: necrose da haste da soja. (Zanardo *et al.*, 2014a; Zanardo e Carvalho, 2017)

Além de seus hospedeiros naturais, o CPMMV também infecta outras espécies de plantas experimentalmente. Os sintomas observados em alguns hospedeiros experimentais, bem como em soja e feijão, estão representados na Figura 3.

### **As vias moleculares de resposta a infecção viral**

As plantas possuem diversos mecanismos de defesa contra patógenos, selecionados ao longo de sua evolução (Coll *et al.*, 2011; Gou e Hua, 2012; Maldonado *et al.*, 2014). A primeira linha de defesa é constituída pelo reconhecimento do patógeno por receptores de reconhecimento de padrões (“pattern recognition receptors”, PRRs) (Gou e Hua, 2012; Revers e Nicaise, 2014). Estes PRRs são normalmente proteínas transmembrana, cujo domínio extracelular é responsável pela percepção do patógeno (Coll *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Sintomas induzidos por isolados de *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) em diferentes hospedeiros. **a.** Mosaico em feijão comum cv. Jalo; **b.** Mosaico em caupi cv. B7 Gurguéia; **c.** Lesões locais (indicadas pelas setas brancas) em *Nicotiana benthamiana*; **d.** Lesões locais cloróticas em *N. debneyi*; **e, f.** Mosaico e clareamento de nervuras em soja cv. CD206; **g.** Necrose sistêmica em soja cv. CD206; **h.** Abortamento de broto, necrose foliar e da haste em soja cv. CD206. Reproduzido de Zanardo e Carvalho (2017).

O reconhecimento de marcadores moleculares específicos do patógeno (“pathogen-associated molecular patterns”, PAMPs) ativa a imunidade inata do hospedeiro, denominada PTI (“PAMP-triggered immunity”). Esses marcadores moleculares são bem estudados para bactérias, podendo ser, por exemplo, estruturas flagelares e ciliares (Revers e Nicaise, 2014). Nos vírus, no entanto, esses marcadores não são bem conhecidos.

Ao invadir uma célula hospedeira os vírus precisam replicar seu material genético. Por serem parasitas intracelulares obrigatórios, esses patógenos requerem a maquinaria celular do hospedeiro para realizar a replicação (Palukaitis e Carr, 2008). Durante o processo de replicação dos vírus de RNA, uma fita dupla de RNA é formada a partir do

material genético viral. Essa molécula é alvo da maquinaria de silenciamento de RNA do hospedeiro, e será clivada pela endonuclease Dicer em pequenos RNAs (“small interfering RNAs”, siRNAs). Estes siRNAs são incorporados ao complexo de silenciamento citoplasmático induzido por RNA (“RNA-induced silencing complex”, RISC) que, por sua vez, degrada os RNAs virais que possuem identidade de sequência com os siRNAs. Acredita-se que o dsRNA viral seria um possível PAMP. O reconhecimento e degradação desse PAMP possivelmente constitui a defesa inata (PTI) das plantas aos vírus (Revers e Nicaise, 2014).

A exemplo de outros patógenos, os vírus podem codificar uma gama de moléculas efetoras, ou determinantes de patogenicidade, desencadeando a resposta imune do hospedeiro (“effector-triggered immunity”, ETI) (Palukaitis e Carr, 2008; Oh e Martin, 2011). Essas proteínas efetoras são codificadas por genes de avirulência (*avr*) cujo produto é reconhecido pela proteína codificada por um gene de resistência (*R*) da planta (Oh e Martin, 2011). Em geral, os genes *R* codificam uma classe de proteínas receptoras tipo NB-LRR (“nucleotide binding-leucine-rich repeat”), que possuem um domínio central de ligação a nucleotídeos (NB) e na porção C-terminal uma região de repetições rica em leucina (LRR), que garante a especificidade da interação. Essas proteínas são subdivididas conforme a presença de um domínio “toll interleukin-1 receptor” (TIR) ou “coiled-coil” (CC) na porção N-terminal (Li *et al.*, 2001; Palukaitis e Carr, 2008; Oh e Martin, 2011; Maldonado *et al.*, 2014).

Acredita-se que os domínios presentes na região N-terminal de proteínas NB-LRR são responsáveis pelo recrutamento de cofatores envolvidos em sua ativação na presença de patógenos (Palukaitis e Carr, 2008). Embora imprescindíveis nas respostas de defesa das plantas, proteínas *R* são expressas em baixos níveis nas células, já que em excesso

podem ser prejudiciais ao crescimento das plantas, além de induzir resposta de hipersensibilidade (Gou e Hua, 2012).

As vias de defesa das plantas são também mediada por hormônios. Estes são moléculas de baixo peso molecular, sintetizadas em determinadas células e transportadas até seu sítio de ação. Em baixas concentrações, regulam a sinalização envolvida na resposta de defesa da planta (Revers e Nicaise, 2014). Dentre os vários hormônios vegetais que respondem a alterações ambientais, o ácido salicílico (AS) é conhecido por desempenhar um papel fundamental na resistência à estresses bióticos (Alazem e Lin, 2015).

Ao ocorrer o reconhecimento dos efetores virais pelas proteínas NB-LRR, a síntese de AS é ativada nas células (Alazem e Lin, 2015). A acumulação de AS induz respostas da planta que restringirão o patógeno ao seu sítio de infecção, como a produção de espécies reativas de oxigênio, a exemplo do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), síntese de proteínas relacionadas à patogênese (“pathogenesis-related”, PR), alterações na forma e tamanho dos cloroplastos, desorganização e degradação do material genético, culminando em morte celular (Alazem e Lin, 2015).

O AS pode também ser transportado através do floema para o restante da planta e ativar a resposta de defesa em tecidos mais distantes. Dessa forma, o sinal para ativar a resistência à doença é mantido em tecidos não infectados e permanece em estado funcional por mais tempo, podendo proteger as plantas de ataques futuros do patógeno. Isso é denominado resistência sistêmica adquirida (“systemic acquired resistance”, SAR) (Li *et al.*, 2001; Revers e Nicaise, 2014).

A proteína NPR1 (“nonexpressor of pathogenesis-related genes”) de *Arabidopsis thaliana* desempenha um papel importante na ativação de SAR, uma vez que ela é um receptor de AS (Wu *et al.*, 2012) e induz a expressão de genes marcadores de SAR, como

os genes *PR* (Li *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2014). Por sua vez, a atividade de NPR1 é regulada por uma outra proteína, denominada SNC1 (“supressor of NPR1, constitutive 1”).

*SNC1* é um gene de resistência (*R*) que codifica uma proteína contendo os domínios TIR-NB-LRR e encontra-se sob regulação negativa, assim como grande parte dos genes *R* (Gou e Hua, 2012). Uma vez expresso, *SNC1* induz a expressão de genes *PR*, acúmulo de AS e resistência a patógenos, embora sua expressão também cause redução no tamanho das plantas hospedeiras (Zhang *et al.*, 2003; Maldonado *et al.*, 2014).

O domínio TIR de SNC1 é um sítio de interação de um co-repressor transcricional, a proteína TRP1 (“Topless-related 1”). TRP1 associa-se à histona deacetilase 19 (HDA19) e reprime a expressão de dois genes que regulam negativamente a resposta imune nas plantas, *DND1* (“Defense no Death 1”) e *DND2* (“Defense no Death 2”). Portanto, acredita-se que SNC1 e TRP1 formam um complexo, atuando conjuntamente na regulação de respostas de defesa (Zhu *et al.*, 2010).

Além da liberação de efetores que podem ser reconhecidos por proteínas NB-LRR, bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* secretam efetores direcionados ao núcleo, onde atuam como fatores de transcrição e ligam-se diretamente à região promotora de genes do hospedeiro. Essas moléculas são denominadas “transcription activator-like effectors” (TALEs) e podem promover hipertrofia e hiperplasia de tecidos vegetais ou induzir resistência, se interagirem com a região promotora de genes de resistência (Römer *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2010; Lukhovitskaya *et al.*, 2013).

Pouco se sabe sobre a capacidade de proteínas efetoras virais atuarem como fatores de transcrição e se ligarem diretamente a regiões promotoras de genes do hospedeiro, alterando sua expressão. Entretanto, um estudo realizado por Lukhovitskaya *et al.* (2009) mostrou que a proteína p12 (CRP) codificada pelo carlavírus

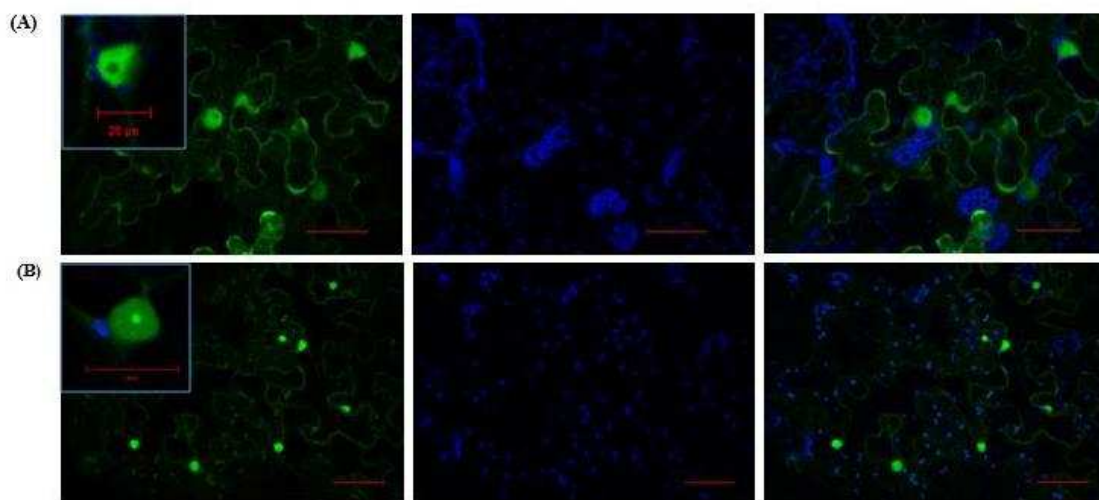
*Chrysanthemum virus B* (CVB) é capaz de induzir a expressão de genes do hospedeiro em tabaco e *N. benthamiana*. Curiosamente, e ao contrário de outros carlavírus, a CRP do CVB não é capaz de supressar o silenciamento gênico pós-transcricional (Lukhovitskaya *et al.*, 2005).

As CRPs dos carlavírus possuem dois domínios conservados, um deles contendo um motivo com sinal de localização nuclear (“nuclear localization signal”, NLS) e o outro contendo um motivo dedo de zinco (“zinc finger”, ZF) (Martelli *et al.*, 2007; Zanardo *et al.*, 2014a). Ambos foram analisados por Lukhovitskaya *et al.* (2009) com o objetivo de entender seus papéis na localização subcelular da p12 de CVB, sua propriedade de ligação a ácidos nucléicos e sua capacidade de induzir HR quando clonada e expressa em vetor PVX (*Potato virus X*). Observou-se que a p12 possui localização nuclear, determinada por seu motivo NLS, e que é capaz de interagir tanto com DNA quanto RNA, embora haja uma preferência por DNA na presença de  $Zn^{2+}$ , sendo esta característica, além da capacidade de induzir hipersensibilidade, determinadas por seu motivo ZF (Lukhovitskaya *et al.*, 2009; Lukhovitskaya *et al.*, 2013).

Como os carlavírus são vírus de RNA e, portanto, replicam no citoplasma da célula hospedeira, o papel de suas CRPs no núcleo não era bem entendido. A localização subcelular da proteína, aliada à sua propriedade de ligação a DNA, levaram os pesquisadores a sugerir que ela poderia atuar como um fator de transcrição e induzir a expressão de genes do hospedeiro (Lukhovitskaya *et al.*, 2009). Essa hipótese foi posteriormente confirmada por Lukhovitskaya *et al.* (2013), que comprovou que a p12 de CVB atua como um fator de transcrição regulando positivamente o gene *upp-L* em duas espécies de tabaco e promovendo proliferação celular e crescimento do tecido do mesófilo de folhas infectadas (Lukhovitskaya *et al.*, 2013). A CRP do CPMMV possui os mesmos

domínios conservados (NLS e ZF) presentes na p12 do CVB, portanto é razoável supor que ela também possa atuar como um fator de transcrição (Zanardo e Carvalho, 2017).

Diversos estudos vem sendo realizados com o intuito de compreender melhor as características e funções da CRP do CPMMV. Primeiramente, a localização subcelular da CRP fusionada a GFP foi confirmada por Carvalho (2016). Verificou-se que GFP-CRP possui localização nuclear (Figura 4A), enquanto CRP-GFP localiza-se no núcleo e nucléolo das células, podendo também associar-se a cloroplastos (Figura 4B). Portanto, a localização subcelular da CRP sofre interferência da posição de GFP na construção (Carvalho, 2016).



**Figura 4.** Localização subcelular da proteína CRP fusionada a GFP em *N. benthamiana*. **(A)** CRP presente no núcleo de plantas agroinfiltradas com a construção pGWB406-CRP (GFP-CRP). **(B)** CRP presente no núcleo e nucléolo de plantas agroinfiltradas com a construção pGWB405-CRP (CRP-GFP). Reproduzido de Carvalho (2016).

Além da localização subcelular da CRP de CPMMV, foi confirmada a sua capacidade de atuar como um ativador transcricional por meio de um ensaio de transativação em levedura (G.M. Ribeiro e C.M Carvalho, dados não publicados).

Paralelamente, em experimentos conduzidos por Barbosa (2016) observou-se a expressão de diversos genes relacionados a respostas de defesa em soja infectada por um isolado necrótico de CPMMV, cujo principal sintoma é a necrose das folhas. A maioria dos genes estudados encontravam-se positivamente regulados, dentre eles o gene *SNC1* (Barbosa, 2016). Entretanto, quando estudou-se a expressão desses genes em protoplastos transformados com a CRP de um isolado atenuado de CPMMV, cujo sintoma é o mosaico foliar, observou-se que dentre os 15 genes avaliados, somente *SNC1* encontrava-se regulado negativamente (G.M. Ribeiro e C.M Carvalho, dados não publicados). A partir desses dados, construiu-se a hipótese de que a CRP do CPMMV poderia atuar como fator de transcrição, reprimindo a ativação do gene *SNC1* em plantas infectadas por um isolado atenuado do vírus.

Uma vez que os fatores de transcrição são proteínas capazes de se ligar ao DNA promovendo o recrutamento da RNA polimerase, ou bloqueando seu acesso ao promotor do gene alvo (Udvardi *et al.*, 2007), o primeiro passo para comprovar a hipótese proposta foi avaliar a propriedade de ligação a ácidos nucleicos da CRP do CPMMV. Dessa forma, foi realizado um ensaio de mono-híbrido que confirmou a capacidade de interação da CRP com o promotor do gene *SNC1* de soja (Paiva, 2017).

Uma grande variedade de processos biológicos, que vão desde a replicação e reparo do DNA até a regulação da expressão gênica, são baseados em interações proteína-DNA (Gade e Kalvakolanu, 2012). No que concerne aos vírus, o processo não é diferente. Estes necessitam de proteínas por eles codificadas, ou de proteínas do hospedeiro para a replicação e transcrição do seu genoma.

Uma estratégia eficiente para identificação dessas interações proteína-DNA ocorrendo *in vivo* é a imunoprecipitação de cromatina (ChIP) (Dahl e Collas, 2007; Gade e Kalvakolanu, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017). Essa técnica é capaz de precipitar fragmentos de DNA e proteínas que estejam fisicamente associados, possibilitando assim o entendimento de uma série de mecanismos, como a participação de fatores de transcrição, cofatores e modificações em histonas na regulação da expressão gênica (Gade e Kalvakolanu, 2012; Chen *et al.*, 2017).

Diversas técnicas *in vitro*, como mobilidade eletroforética e ensaios de mono-híbrido, também podem ser utilizadas para determinar interações proteína-DNA. Entretanto, elas podem não refletir o que realmente ocorre no interior das células.

Apesar de sua extensa lista de vantagens sobre as técnicas *in vitro*, as desvantagens de ChIP recaem sobre a obrigatoriedade do uso de um anticorpo altamente específico, seu alto custo, a necessidade de se obter um alto número de células e de padronizar todas as etapas anteriormente à execução, além da significativa perda de material (Dahl e Collas, 2007; Gade e Kalvakolanu, 2012).

Visto isso e em continuidade aos trabalhos anteriormente realizados, o presente estudo teve como intuito confirmar a capacidade de interação da CRP do CPMMV com a região promotora do gene *SNC1* de soja *in vivo*, por meio de um ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) utilizando protoplastos de soja, visando o melhor entendimento das funções da CRP de CPMMV e da sua importância no desenvolvimento da doença.

## **OBJETIVO**

### **Objetivo geral**

Avaliar a capacidade de interação da proteína rica em cisteína (CRP) do CPMMV com o gene *SNC1* de soja.

### **Objetivos específicos**

1. Padronizar um protocolo para imunoprecipitação de cromatina (ChIP) em soja.
2. Avaliar a capacidade de ligação da CRP, de um isolado atenuado do CPMMV, à região promotora do gene *SNC1* de soja.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Construções plasmidiais

Com o intuito de demonstrar se a CRP do isolado CPMMV:BR:MG:9:2 interage com o promotor do gene *GmSNC1*, a sequência da ORF6 foi clonada ao vetor pGWB405 (Nakagawa *et al.*, 2007) para gerar uma fusão a GFP na porção C-terminal (construção denominada pGWB405-CRP) (Carvalho, 2016). Como controle negativo foi utilizado o vetor vazio pK7FWG2. Colônias de *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  previamente transformadas com as construções acima foram incubadas por 12 horas em meio LB contendo o antibiótico spectinomicina e utilizadas para extração de DNA plasmidial a fim de confirmar as clonagens.

### Expressão transiente em protoplastos

Folhas de soja cv. CD206 em estágio V3 a V6 foram coletadas e utilizadas para o preparo dos protoplastos. As folhas foram limpas utilizando hipoclorito de sódio 3%, seguido de água destilada, álcool 70% e, por fim, novamente lavadas com água destilada. Em seguida as folhas foram cortadas em tiras de aproximadamente 1 mm e colocadas em placas de Petri grandes (15 cm de diâmetro). Às folhas foi adicionada solução enzimática (celulase 0,01% v/v, pectoliase 0,25 mg/ml, D-manitol 600 mM e MES 200 mM, pH 5,5 ajustado com KOH) e as placas foram cobertas com papel alumínio. O sistema foi mantido sob agitação lenta (30 rpm) a 30°C por 6 h. Após esse período a solução foi filtrada em peneira de 65  $\mu$ m, transferida para tubos Falcon (50 ml) e centrifugadas por 10 min a 200 g. Os pellets obtidos foram lavados duas vezes com tampão de lavagem (D-manitol 600 mM e MES 200 mM, pH 5,5) e centrifugados nas mesmas condições acima. Em seguida os pellets foram lavados duas vezes com tampão de eletroporação (HEPES

25 mM, KCl 8,4 mM, MgCl<sub>2</sub> 32 mM e D-manitol 600 mM, pH 7,2 ajustado com KOH) e centrifugados. Antes de cada centrifugação as amostras eram concentradas, reduzindo-se o número de tubos pela metade até restar apenas um. Após a última centrifugação o sobrenadante foi descartado, deixando-se apenas um volume de 5 ml que foi incubado em gelo por 30 minutos. Uma alíquota de 20 µl foi retirada e diluída 100x para contagem do número de células em câmara de Neubauer.

Para transformação dos protoplastos foram utilizados 400 µl de tampão de eletroporação, 400 µl de solução de protoplastos, 4 µl (40 µg) de DNA de esperma de salmão (carreador) e 2 µl (aproximadamente 10 µg) do DNA plasmidial, correspondendo à construção pGWB405-CRP ou ao vetor vazio pK7FWG2. As células foram eletroporadas em cubetas de 0,4 cm a 25 µF de capacitância e 2500V.

Após a eletroporação os protoplastos foram mantidos em gelo por 15 min e depois colocados em placas de Petri contendo 8 ml de meio MS soja (D-manitol 600 mM, sacarose 87,6 mM e Murashige and Skoog Basal Salt Mixture a 2,3 mg/ml) acrescido de ampicilina. As placas foram colocadas em bandejas contendo papel toalha umedecido, cobertas com papel alumínio e mantidas por 36 h para indução da expressão da sequência inserida. Após o tempo estipulado, duas amostras (uma de protoplastos expressando a ORF6 e outra transformada com o vetor vazio) foram utilizadas para extração de RNA e confirmação da expressão, e as demais foram utilizadas no ensaio de imunoprecipitação de cromatina.

O RNA de duas amostras de protoplastos foi extraído utilizando-se o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), conforme as recomendações do fabricante. O cDNA foi sintetizando utilizando-se oligo-dT e a enzima Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) e amplificado utilizando-se GoTaq Green Master Mix (Promega) e os

oligonucleotídeos para ORF6 e GFP (Tabela 1). O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1,5%.

**Tabela 1.** Sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificação de cDNA de protoplastos e amostras de ChIP.

| Oligonucleotídeo | Sequência 5' - 3'                                  |
|------------------|----------------------------------------------------|
| TRORF6 45621 FW  | TGCTAGGAAGAGAAGGGCAAAG                             |
| TRORF6 45621 RV  | CCAACCTCGGGTAATTCAAACCA                            |
| T7 GFP FW        | ACACGTTAATACGACTCACTATAGGGTGGTGAGCAAG<br>GGCGAGG   |
| T7 GFP RV        | ACAGCAATTATGCTGAGTGATATCCCTTACTTGTACA<br>GCTCGTCCA |
| TR2promSNC1 FW   | ATACACTATGTCGTTGCAAAAA                             |
| TR2promSNC1 RV   | GCCAATATGCATGTCAATTT                               |

### **Fixação do material pra o ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP)**

O ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) foi realizado baseando-se em Yamaguchi *et al.* (2014), com as devidas alterações para protoplastos de soja.

Protoplastos mantidos em meio MS soja por 36 h foram utilizados para o processo de fixação da proteína ao DNA. O meio contendo os protoplastos foi colocado em tubos Falcon (15 ml) e centrifugado para formação de um pellet de protoplastos e eliminação do meio MS. Os pellets foram lavados com 2 ml de 1x PBS (10x PBS: NaCl 1310 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 70 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM) que, em seguida, foi substituído por 2 ml de solução de fixação contendo 1% de formaldeído em 1x PBS. Para que a solução de formaldeído infiltrasse as células vegetais, foi aplicado uma sequência de vácuos (200 Pa) de 1,5 min, 1 min e 1 min, com intervalo de 1 min entre cada vácuo. Após remoção da solução de

fixação, ao pellet foi acrescida uma solução de glicina 0,125 M e as células novamente submetidas a vácuo por 1,5 min. Em seguida, a solução de glicina foi removida, as amostras lavadas por duas vezes com 2 ml de 1x PBS e armazenadas a -80°C.

### **Padronização da fragmentação do DNA de soja**

A fragmentação do DNA é um passo crucial para a realização do ensaio de ChIP. Idealmente os fragmentos obtidos devem possuir entre 100 e 600 pares de bases (pb). Portanto, anteriormente à realização do ensaio foi necessário padronizar as condições de sonicação.

Inicialmente, protoplastos transformados e fixados com solução de formaldeído 1% foram submetidos a extração e lise nuclear. Posteriormente, a solução foi submetida a sonicação com amplitude constante de 80  $\mu$ m por 15, 25, 35, 45, 50 e 55 min. O padrão de fragmentação do DNA foi observado em gel de agarose 1,5%. Em seguida, novas amostras de protoplastos fixados foram submetidas a sonicação por 35, 40 e 50 min, e o padrão de fragmentação foi novamente analisado em gel de agarose 1,5%. O tempo de exposição às ondas sonoras escolhido para realização do experimento foi de 35 minutos.

### **Lise nuclear e fragmentação da cromatina**

As amostras fixadas foram maceradas em nitrogênio líquido e acrescidas de 400  $\mu$ l de tampão de extração nuclear (MOPS 100 mM pH 7,6,  $MgCl_2$  10 mM, sacarose 0,25 M, dextrano T-40 5%, ficoll 400 2,5%, 2-mercaptoetanol 40 mM e 1x inibidor de protease). Em seguida, o material foi submetido à centrifugação por 5 min a 12000 *g*, e o pellet ressuspenso em 75  $\mu$ l de tampão de lise nuclear (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, SDS 1%) e mantido em gelo por 30 min. Finalmente, foram adicionados 125  $\mu$ l de

tampão de diluição ChIP sem Triton (Tris-HCl 16,7 mM pH 8,0, NaCl 167 mM, EDTA 1,2 mM, SDS 0,01%).

O DNA foi fragmentado utilizando-se um sonicador, com amplitude constante de 80  $\mu$ m por aproximadamente 35 min, sendo 30 s de pulso e 30 s em repouso no gelo, para intervalos de corte entre 100 e 600 pb. À solução sonicada foram adicionados 123  $\mu$ l de tampão de diluição ChIP com Triton (Tris-HCl 16,7 mM pH 8,0, NaCl 167 mM, EDTA 1,2 mM, Triton X-100 1,1% e SDS 0,01%) e 12,30  $\mu$ l de solução de Triton X-100 22%. Uma alíquota de 20  $\mu$ l foi retirada e utilizada como “input”. Finalmente, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 4°C e 16000 *g* e o sobrenadante transferido para um novo microtubo (1,5 ml).

### **Pré-clareamento e imunoprecipitação**

Com o intuito de eliminar o máximo possível de interações inespecíficas, foram adicionados 10  $\mu$ l de esferas de proteína A-sepharose (Sigma-Aldrich) às amostras e estas foram incubadas por 1,5 h sob agitação lenta e posteriormente centrifugadas a 900 *g* por 3 min para eliminação das esferas.

Para a realização da imunoprecipitação da cromatina foram adicionados 4  $\mu$ l de anticorpo policlonal anti-GFP (Life Technologies) e 4  $\mu$ l de anti-IgG (IgG anti-camundongo produzido em coelho; Sigma-Aldrich), utilizado como um anticorpo não relacionado. As amostras foram mantidas por 12 horas a 4°C sob agitação lenta e posteriormente 40  $\mu$ l de esferas de proteína A-sepharose foram acrescentadas às amostras, que foram então incubadas por 4 h a 4°C sob agitação lenta para a captura dos complexos anticorpo-proteína-DNA.

Os pellets gerados pela imunoprecipitação foram submetidos a uma série de lavagens. As amostras foram inicialmente centrifugadas a 900 *g* por 3 min, eliminando-se o sobrenadante. Ao pellet foram acrescentados 500 µl de tampão de lavagem com baixa concentração de sal (Tris-HCl 20 mM pH 8,1, EDTA 2mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, Triton X-100 1%) e as amostras mantidas a 4°C sob agitação lenta por 5 min. Em seguida, foram novamente centrifugadas a 900 *g* por 3 min e a solução de lavagem substituída por um tampão com alta concentração de sal (Tris-HCl 20 mM pH 8,1, EDTA 2 mM, NaCl 500 mM, SDS 0,1%, Triton X-100 1%), repetindo-se o mesmo procedimento descrito acima. Na sequência, as amostras foram lavadas com Tris-HCl 10 mM pH 8,1, EDTA 1 mM, LiCl 0,25 M, IGEPAL-CA630 1%, desoxicolato 1% e finalmente lavadas com TE 0,5x (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1M).

### **Reversão do *crosslink* e purificação do DNA imunoprecipitado**

Inicialmente, ao pellet de esferas foram adicionados 50 µl de tampão de lise nuclear (tampão de eluição) e as amostras foram mantidas a 65°C por 30 min para separação dos ácidos nucleicos das esferas. O tampão de eluição foi armazenado em outro microtubo e mais 25 µl adicionados às esferas, sendo o processo de aquecimento repetido. O sobrenadante foi armazenado juntamente com o eluato anterior e as esferas descartadas. Em seguida foram adicionados 80 µl de tampão de lise nuclear aos inputs separados anteriormente à imunoprecipitação (item “Lise nuclear e fragmentação da cromatina”) e 6 µl de NaCl 5M tanto aos inputs quanto às amostras de ChIP, sendo todos incubados a 65°C por 12 horas para reversão do “crosslink”.

As amostras de ChIP foram purificadas utilizando-se o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). A cada tubo foram adicionados 550 µl de tampão PB e estes foram mantidos sob agitação por 30 min à temperatura ambiente. Na sequência, as amostras foram

transferidas para colunas de purificação QIAprep (Qiagen) e centrifugadas por 1 min a 16000 *g*. Em seguida, 750  $\mu$ l de tampão PE foram adicionados à coluna e centrifugados, e o passo repetido para a máxima eliminação de resquícios do tampão. Finalmente, as colunas foram colocadas em microtubos estéreis de 1,5 ml e as amostras eluídas em 25  $\mu$ l de tampão EB.

As amostras imunoprecipitadas foram enriquecidas utilizando o kit GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (Sigma-Aldrich), conforme as instruções do fabricante.

### **PCR convencional**

Com o intuito de confirmar se o promotor do gene *GmSNC1* foi imunoprecipitado durante o ensaio de ChIP, uma PCR convencional foi realizada utilizando os oligonucleotídeos TR2promSNC1 FW e RV (Tabela 1), específicos para o promotor do gene *SNC1*. A reação de amplificação ocorreu sob as seguintes condições: 1 min a 94°C, 35 ciclos a 94°C por 1 min, 58.2°C por 1 min e 72°C por 1 min. Após os 35 ciclos as amostras foram incubadas a 72°C por 10 min, finalizando-se a amplificação. A amplificação da banda referente ao promotor do gene *SNC1* (90 pb) foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 2%. A banda foi cortada diretamente do gel e purificada utilizando-se o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante. O produto da purificação foi enviado à Macrogen, Inc. (Coréia do Sul) para sequenciamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Obtenção de protoplastos e contagem das células

Com o intuito de verificar a interação da CRP do CPMMV com o DNA do hospedeiro de forma mais fiel ao que ocorre *in vivo*, foram utilizados protoplastos de soja transformados com a sequência codificadora da CRP (Carvalho, 2016).

Um dos parâmetros críticos do experimento de ChIP é o número de células utilizadas, uma vez que um baixo número de células pode dificultar a imunoprecipitação e resultar em baixa concentração de DNA. Portanto, é recomendado que se obtenha ao menos, uma quantidade de  $10^7$  células (Gade e Kalvakolanu, 2012).

Para confirmação do número de células presente na suspensão de protoplastos obtida, uma alíquota de 20  $\mu$ l foi retirada e diluída 100x, utilizando-se 1  $\mu$ l para contagem de células em câmara de Neubauer. A contagem confirmou um número de células igual a  $10^7$ , considerado ideal para a realização do experimento. Observou-se também a integridade e forma arredondada ou mais alongada dos protoplastos, características importantes para garantir o sucesso da eletroporação subsequente (Figura 5).



**Figura 5.** Protoplastos de soja observados ao microscópio de luz.

## Expressão da CRP em protoplastos

Após permanência dos protoplastos eletroporados em meio MS soja por 36 h, duas amostras foram utilizadas para confirmação do sucesso da transformação, da expressão da CRP em protoplastos transformados com a construção pGWB405-CRP, e da expressão de GFP nos protoplastos transformados com o vetor pK7FWG2.

O RNA total dos protoplastos foi extraído e o cDNA sintetizado e utilizado para amplificação dos fragmentos correspondentes à CRP e a GFP por meio de PCR convencional. Observou-se que nos protoplastos transformados com a construção pGWB405-CRP havia expressão da CRP, enquanto nos protoplastos transformados com o vetor pK7FWG2 houve expressão de GFP, mas não da CRP (Figura 6).

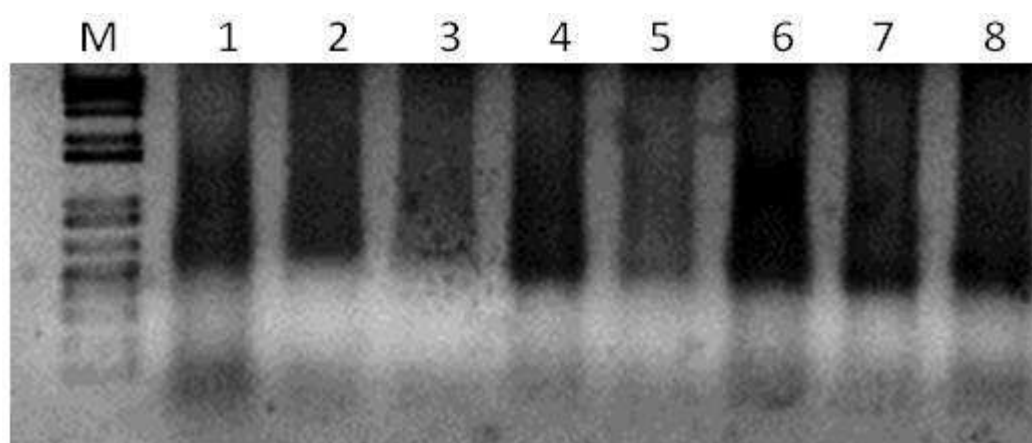


**Figura 6.** Confirmação da transformação de protoplastos e da expressão da CRP. **(M)** Marcador de comprimento (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) **(1)** Amplificação a partir de cDNA de protoplastos transformados com o vetor pK7FWG2, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a CRP. **(2)** Amplificação a partir de cDNA de protoplastos transformados com pGWB405-CRP utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos. **(3)** Amplificação a partir de cDNA de protoplastos transformados com o vetor pK7FWG2, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para GFP.

É importante ressaltar que o teste realizado permite confirmar a presença/ausência de transcritos, não sendo possível afirmar que a proteína está sendo traduzida.

### **Padronização da sonicação**

Além do número de células utilizadas, outro aspecto importante do experimento de ChIP é a fragmentação aleatória do DNA e o tamanho dos fragmentos obtidos. Estes devem estar na faixa de 100-1000 pb, com pico entre 500-600 pb (Yamaguchi *et al.*, 2014). Portanto a otimização da sonicação fez-se necessária anteriormente ao início dos procedimentos para imunoprecipitação da cromatina, e o tempo de 35 minutos de sonicação foi escolhido por apresentar um melhor padrão de fragmentação (Figura 7). Embora seja possível observar um arraste de DNA acima de 850 pb, a maior concentração de fragmentos encontra-se na faixa de 500-600 pb, ideal para a realização das etapas subsequentes.



**Figura 7.** Padrão da fragmentação das amostras de ChIP após 35 minutos de sonicação. **(M)** Marcador de comprimento (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). **(1-4)** Amostras fixadas de protoplastos transformados com o vetor pK7FWG2. **(5-8)** Amostras fixadas de protoplastos transformados com a construção pGWB405-CRP.

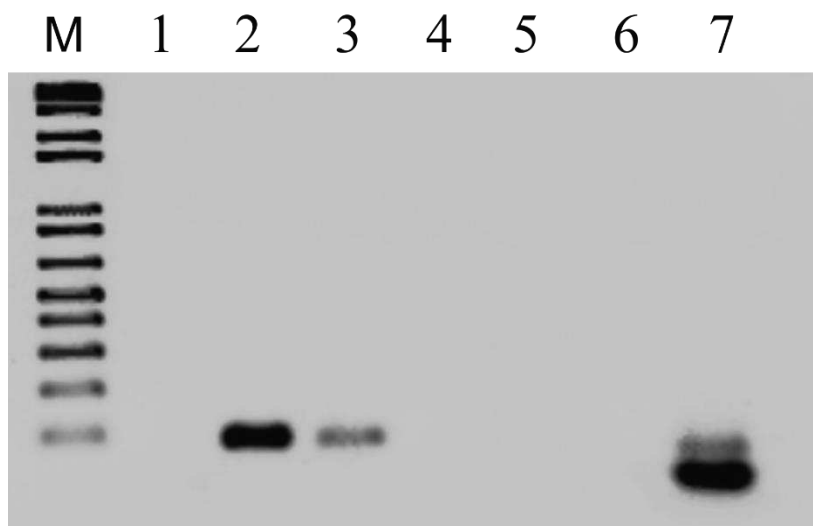
### **Amplificação de *SNC1* por PCR convencional**

Duas amostras sonicadas foram imunoprecipitadas utilizando-se um anticorpo específico para GFP, proteína que se encontra fusionada à CRP na construção pGWB405-CRP e que é expressa de forma livre a partir do vetor pK7FWG2. Outras duas amostras contendo pGWB405-CRP e pK7FWG2 foram imunoprecipitadas utilizando-se um anticorpo não relacionado, coelho-anti-IgG de camundongo. Caso a CRP seja capaz de se ligar a alguma região do DNA e portanto fixar-se a ele, o anticorpo anti-GFP reconheceria seu antígeno (GFP) fusionado a CRP, e as esferas de sepharose precipitariam os complexos anticorpo-proteína-DNA presentes na solução. Já o anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo seria incapaz de reconhecer os complexos proteína-DNA, que não seriam portanto precipitados. Em protoplastos transformados com o vetor pK7FWG2 haveria expressão de GFP livre. Como GFP não atua como fator de transcrição, não haveria ligação ao promotor do gene *SNC1*. Logo, não deveria haver precipitação de complexos DNA-proteína, mas apenas da proteína livre.

As amostras imunoprecipitadas foram utilizadas para amplificação utilizando-se os oligonucleotídeos TR2prom*SNC1* FW e RV, específicos para a região promotora do gene *SNC1* (Tabela 1). O resultado da amplificação por PCR convencional foi analisado em gel de agarose 2% (Figura 8).

Um controle positivo para a amplificação de amostras de ChIP, que seria um complexo proteína-DNA que reconhecidamente interage, é difícil de ser obtido. Portanto foram utilizados DNA genômico de soja e uma amostra “input” como controles positivos. Em ambas pode-se verificar a amplificação de um fragmento de aproximadamente 90 pb, confirmando a presença de *GmSNC1* no genoma da soja e nas amostras utilizadas no experimento de ChIP anteriormente à imunoprecipitação (Figura 9). Quanto às amostras imunoprecipitadas com o anticorpo não relacionado (anti-IgG) e a amostra contendo

pK7FWG2 imunoprecipitada com anti-GFP, não se observou amplificação de *SNC1*, conforme esperado (Figura 9).



**Figura 8.** Amplificação das amostras imunoprecipitadas utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a região promotora do gene *SNC1*. **(M)** Marcador de comprimento (1 kb DNA Ladder, Invitrogen). **(1)** Amostra sem DNA (controle negativo). **(2)** DNA genômico de soja. **(3)** Amostra “input”. **(4)** Amostra transformada com pK7FWG2 e imunoprecipitada com anti-IgG. **(5)** Amostra transformada com pK7FWG2 e imunoprecipitada com anti-GFP. **(6)** Amostra transformada com pGWB405-CRP e imunoprecipitada com anti-IgG. **(7)** Amostra transformada com pGWB-CRP e imunoprecipitada com anti-GFP. Observa-se a amplificação de uma banda com aproximadamente 90 pb correspondente ao fragmento do promotor do gene *SNC1* nas canaletas 2, 3 e 7, e a amplificação de uma banda inespecífica na canaleta 7.

Por fim, na amostra contendo pGWB405-CRP e imunoprecipitada com anti-GFP houve amplificação de uma banda de 90 pb correspondente ao promotor do gene *SNC1* (Figura 9), confirmando-se a formação de um complexo DNA-proteína entre a CRP do CPMMV e a região promotora do gene. Observou-se ainda a amplificação de uma banda inespecífica de tamanho inferior a 90 pb. Essa banda pode corresponder a outro fragmento

da região promotora, a um *cis* elemento, ou a outra região do genoma da soja com a qual a CRP interage. Sua identificação deverá ser realizada por meio de sequenciamento.

Estudos realizados anteriormente verificaram que a CRP do CPMMV possui localização nuclear (Carvalho, 2016) e capacidade de transativação (dados não publicados). Além disso, observou-se que o gene *SNC1* encontrava-se reprimido em protoplastos de soja transformados com a CRP de um isolado atenuado do vírus (dados não publicados). Em conjunto com esses resultados anteriores, a confirmação da interação *in vivo* entre a CRP e o promotor do gene *SNC1* sugere que a CRP do CPMMV é capaz de atuar como fator de transcrição possivelmente reprimindo a expressão do gene *SNC1*.

O produto da transcrição do gene *SNC1* é uma proteína R do tipo TIR-NB-LRR, cuja função está associada à percepção de patógenos e ao acúmulo de ácido salicílico, ativando vias de defesa dependentes desse hormônio. Respostas de defesa mediadas por ácido salicílico podem culminar na resposta de hipersensibilidade, caracterizada pela rápida morte celular ao redor do sítio de infecção pelo patógeno, de modo a restringir sua propagação (Alazem e Lin, 2015). Essa morte celular pode evoluir para um sintoma de necrose (Komatsu *et al.*, 2010).

Em estudos realizados por Barbosa (2016) observou-se que em plantas infectadas por um isolado do CPMMV causador de necrose havia elevada expressão do gene *SNC1*. Portanto, é razoável supor que uma vez ativado, *SNC1* possa participar de vias de defesa que levam à morte celular e restrição do patógeno ao seu sítio de infecção. Por outro lado, em plantas infectadas por um isolado atenuado do vírus, é possível que essa proteína reprima a transcrição do gene *SNC1*. Dessa forma, as vias de defesa moduladas por esse gene seriam desativadas, atenuando os sintomas induzidos pelo vírus.

Os vírus são capazes de se adaptar ao seus hospedeiros modificando o metabolismo celular de forma a suprimir as defesas desencadeadas pelo hospedeiro.

Normalmente essa adaptação é derivada de alterações no genoma do patógeno afetando o acúmulo viral ou sua transmissão (Agudelo-Romero *et al.*, 2008).

Estudos realizados com o *Tobacco etch virus* (TEV) em *Arabidopsis thaliana* verificaram uma grande diferença entre a expressão gênica do hospedeiro infectado com um isolado “ancestral” e um mais adaptado. A principal diferença observada foi a ausência de expressão de genes envolvidos em estresse e resposta ao patógeno durante infecção pelo vírus mais adaptado, sugerindo que a seleção favoreceu estratégias virais para escapar das defesas do hospedeiro (Agudelo-Romero *et al.*, 2008).

No que concerne o CPMMV, em experimento realizado por Zanardo (2017) verificou-se que após inoculações sucessivas de um isolado severo em plantas de soja ocorreu uma mudança nos sintomas, que passaram de severos para atenuados. Essa redução da virulência foi associada à polimorfismos na ORF1, embora uma relação causal não tenha sido estabelecida de forma definitiva.

Embora a CRP do CPMMV aparentemente não esteja ligada diretamente a alterações de sintomas, sua atuação como fator de transcrição pode estar relacionada a ativação e/ou desativação de determinadas vias de defesa, favorecendo a infecção viral. Para melhor compreender o papel da CRP nesse processo, alguns experimentos devem ser realizados futuramente.

Primeiramente, é necessário verificar se a CRP do isolado necrótico de CPMMV também é capaz de atuar como fator de transcrição, não sendo essa uma característica exclusiva de isolados atenuados (supostamente mais bem adaptados ao hospedeiro). A avaliação da sua capacidade de ligação ao promotor de *SNC1*, bem como de outros possíveis genes, é importante para a compreensão do seu papel na infecção viral e na ativação de vias de defesa.

Sabe-se que *SNC1* ativa a expressão de genes relacionados a patogenicidade, como *PR1*, *PR2* e *PR5*, e favorece o acúmulo de ácido salicílico (Li *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2014). Seria interessante investigar o nível de expressão desses genes em plantas infectadas pelos isolados necrótico e atenuado do vírus, bem como o acúmulo de ácido salicílico. Essas informações, aliadas ao silenciamento de *SNC1*, possibilitariam a associação das funções desse gene na ativação de vias de defesa, e também de como a sua repressão por CRP repercute na resposta da planta ao CPMMV.

Estudos realizados no Laboratório de Virologia Vegetal Molecular, na Universidade Federal de Viçosa, propõem que a CRP também possui capacidade de suprimir o silenciamento gênico desencadeado pelas plantas (S.L. Carvalho e C.M. Carvalho, dados não publicados). Novos experimentos são necessários para corroborar o seu papel como supressora de silenciamento.

Por fim, o sequenciamento das amostras de ChIP faz-se necessário, de forma a identificar outros possíveis sítios de ligação da proteína CRP do CPMMV, avaliando a sua capacidade de modular a expressão de outros genes do hospedeiro. O amplo entendimento das funções da CRP é de grande importância para a elucidação do seu papel no estabelecimento da infecção viral, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias de controle da doença.

## LITERATURA CITADA

- Adams, M.J.; Antoniw, J.F.; Bar-Joseph, M.; Brunt, A.A.; Candresse, T.; Foster, G.D.; Martelli, G.P.; Milne, R.G.; Zavriev, S.K.; Fauquet, C.M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology**, v. 149, p. 1045-1060, 2004.
- Agudelo-Romero, P.; Carbonell, P.; Perez-Amador, M.A.; Elena, S.F. Virus adaptation by manipulation of host's gene expression. **PLoS One**, v. 3, p. e2397, 2008.
- Alazem, M.; Lin, N.S. Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, p. 529-540, 2015.
- Almeida, A.M.R. Viroses da soja no Brasil: sintomas, etiologia e controle. **Embrapa Soja-Documents (INFOTECA-E)**, 2008.
- Barbosa, T.M.C. **Estudos das vias moleculares de resposta ao Cowpea mild mottle virus (CPMMV) em soja**. 2016. Monografia (Bacharelado em Bioquímica). Dep. de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 50p.
- Carvalho, S.L. **Produção de um clone infeccioso e análise da localização subcelular das proteínas codificadas pelo Bloco Triplo de Genes do Cowpea mild mottle virus**. 2016. Tese D.Sc. (Doutorado em Fitopatologia). Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 98p.
- Chen, X.; Bhadauria, V.; Ma, B. ChIP-Seq: A Powerful Tool for Studying Protein-DNA Interactions in Plants. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 27, p. 171-180, 2017.
- Coll, N.; Eppele, P.; Dangl, J. Programmed cell death in the plant immune system. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, p. 1247, 2011.
- Costa, A.; Gaspar, J.; Vega, J. Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um carlavírus transmitido pela mosca branca Bemisia tabaci. **Fitopatologia brasileira**, v. 8, p. 325-337, 1983.
- Dahl, J.A.; Collas, P. Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells. **Stem Cells**, v. 25, p. 1037-1046, 2007.
- Embrapa, S. Tecnologia de Produção de Soja-Região Central do Brasil 2004. **Londrina: Embrapa Soja**, 2004.
- Embrapa, S. Soja em números (Safrá 2016/2017). 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 12/01/2018.
- Fajardo, T.V.; Nishijima, M.; Buso, J.A.; Torres, A.C.; Ávila, A.C.; Resende, R.O. Garlic viral complex: identification of potyviruses and carlavírus in central Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 619-626, 2001.
- Gade, P.; Kalvakolanu, D.V. Chromatin immunoprecipitation assay as a tool for analyzing transcription factor activity. In: (Ed.). **Transcriptional Regulation**: Springer, 2012. p.85-104.

- Gaspar, J.; Belintani, P.; Almeida, A.; Kitajima, E. A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. **Journal of Virological Methods**, v. 148, p. 283-285, 2008.
- Gou, M.; Hua, J. Complex regulation of an R gene SNC1 revealed by autoimmune mutants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, p. 213-216, 2012.
- Henning, A.A.; Almeida, Á.M.R.; Godoy, C.V.; Seixas, C.D.S.; Yorinori, J.T.; Costamilan, L.M.; Ferreira, L.P.; Meyer, M.C.; Soares, R.M.; Dias, W.P. Manual de identificação de doenças de soja. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2016. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 16/02/2018.
- King, A.M.; Lefkowitz, E.; Adams, M.J.; Carstens, E.B. **Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier, 2011. ISBN 0123846854.
- Komatsu, K.; Hashimoto, M.; Ozeki, J.; Yamaji, Y.; Maejima, K.; Senshu, H.; Himeno, M.; Okano, Y.; Kagiwada, S.; Namba, S. Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, p. 283-293, 2010.
- Li, X.; Clarke, J.D.; Zhang, Y.; Dong, X. Activation of an EDS1-mediated R-gene pathway in the snc1 mutant leads to constitutive, NPR1-independent pathogen resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 1131-1139, 2001.
- Lukhovitskaya, N.I.; Ignatovich, I.V.; Savenkov, E.I.; Schiemann, J.; Morozov, S.Y.; Solovyev, A.G. Role of the zinc-finger and basic motifs of *chrysanthemum virus B* p12 protein in nucleic acid binding, protein localization and induction of a hypersensitive response upon expression from a viral vector. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 723-733, 2009.
- Lukhovitskaya, N.I.; Solovieva, A.D.; Boddeti, S.K.; Thaduri, S.; Solovyev, A.G.; Savenkov, E.I. An RNA virus-encoded zinc-finger protein acts as a plant transcription factor and induces a regulator of cell size and proliferation in two tobacco species. **Plant Cell**, v. 25, p. 960-973, 2013.
- Lukhovitskaya, N.I.; Solovyev, A.G.; Koshkina, T.E.; Zavriev, S.K.; Morozov, S.Y. Interaction of the *Carlavirus* cysteine-rich protein with the plant defense system. **Molecular Biology**, v. 39, p. 785-791, 2005.
- Maldonado, A.; Youssef, R.; McDonald, M.; Brewer, E.; Beard, H.; Matthews, B. Modification of the expression of two NPR1 suppressors, SNC1 and SN1, in soybean confers partial resistance to the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Functional Plant Biology**, v. 41, p. 714-726, 2014.
- Martelli, G.P.; Adams, M.J.; Kreuze, J.F.; Dolja, V.V. Family *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 73-100, 2007.
- Marubayashi, J.M.; Yuki, V.A.; Wutke, E.B. Transmissão do *Cowpea mild mottle virus* pela mosca branca *Bemisia tabaci* biótipo B para plantas de feijão e soja. **Summa Phytopathologica**, p. 158-160, 2010.

- Nagata, T.; Alves, D.; Inoue-Nagata, A.; Tian, T.-Y.; Kitajima, E.; Cardoso, J.; Avila, A. A novel melon flexivirus transmitted by whitefly. **Archives of Virology**, v. 150, p. 379-387, 2005.
- Nakagawa, T.; Suzuki, T.; Murata, S.; Nakamura, S.; Hino, T.; Maeo, K.; Tabata, R.; Kawai, T.; Tanaka, K.; Niwa, Y. Biochemistry & molecular biology-improved gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 2095-2100, 2007.
- Oh, C.-S.; Martin, G.B. Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 132-140, 2011.
- Paiva, A.C.S. **Avaliação da propriedade de ligação a ácidos nucleicos da proteína p15 rica em cisteína (CRP) do Cowpea mild mottle virus (CPMMV)**. 2017. Monografia (Bacharelado em Bioquímica). Dep. de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 31p.
- Palukaitis, P.; Carr, J.P. Plant resistance responses to viruses. **Journal of Plant Pathology**, v. 90, p. 153-171, 2008.
- Revers, F.; Nicaise, V. Plant resistance to infection by viruses. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2014.
- Rivas, E.B. Lily symptomless virus no Brasil. **Documento Técnico**, v. 4, p. 1-5, 2010.
- Römer, P.; Hahn, S.; Jordan, T.; Strauß, T.; Bonas, U.; Lahaye, T. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. **Science**, v. 318, p. 645-648, 2007.
- Römer, P.; Recht, S.; Strauß, T.; Elsaesser, J.; Schornack, S.; Boch, J.; Wang, S.; Lahaye, T. Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **New Phytologist**, v. 187, p. 1048-1057, 2010.
- Udvardi, M.K.; Kakar, K.; Wandrey, M.; Montanari, O.; Murray, J.; Andriankaja, A.; Zhang, J.-Y.; Bedito, V.; Hofer, J.M.; Chueng, F. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. **Plant Physiology**, v. 144, p. 538-549, 2007.
- Wu, Y.; Zhang, D.; Chu, J.Y.; Boyle, P.; Wang, Y.; Brindle, I.D.; De Luca, V.; Després, C. The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. **Cell Reports**, v. 1, p. 639-647, 2012.
- Yamaguchi, N.; Winter, C.M.; Wu, M.-F.; Kwon, C.S.; William, D.A.; Wagner, D. Protocol: chromatin immunoprecipitation from *Arabidopsis* tissues. **The Arabidopsis Book**, p. e0170, 2014.
- Zanardo, L.G. **New insights of Cowpea mild mottle virus (CPMMV) infection in soybean: The involvement of viral replicase in symptom induction and its interaction with host factors**. 2017. Tese D.Sc. (Doutorado em Genética e Melhoramento). Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 219p.
- Zanardo, L.G.; Carvalho, C.M. Cowpea mild mottle virus (*Carlavirus*, *Betaflexiviridae*): a review. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 417-430, 2017.

- Zanardo, L.G.; Silva, F.N.; Bicalho, A.a.C.; Castillo-Urquiza, G.P.; Lima, A.T.M.; Almeida, A.M.R.; Zerbini, F.M.; Carvalho, C.M. Molecular and biological characterization of Cowpea mild mottle virus isolates infecting soybean in Brazil and evidence of recombination. **Plant Pathology**, v. 63, p. 456-465, 2014a.
- Zanardo, L.G.; Silva, F.N.; Lima, A.T.M.; Milanesi, D.F.; Castilho-Urquiza, G.P.; Almeida, A.M.R.; Zerbini, F.M.; Carvalho, C.M. Molecular variability of *Cowpea mild mottle virus* infecting soybean in Brazil. **Archives of Virology**, v. 159, p. 727-737, 2014b.
- Zhang, Y.; Goritschnig, S.; Dong, X.; Li, X. A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. **Plant Cell**, v. 15, p. 2636-2646, 2003.
- Zhou, Z.S.; Dell'orco, M.; Saldarelli, P.; Turturo, C.; Minafra, A.; Martelli, G.P. Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of Grapevine virus A. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 2387-2395, 2006.
- Zhu, Z.; Xu, F.; Zhang, Y.; Cheng, Y.T.; Wiermer, M.; Li, X.; Zhang, Y. *Arabidopsis* resistance protein SNC1 activates immune responses through association with a transcriptional corepressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 107, p. 13960-13965, 2010.

## APÊNDICE

### Protocolo para ChIP de protoplastos de soja

#### Parte 1: Coleta e fixação do tecido vegetal para ChIP

- 1- No pellet dos protoplastos, adicionar 2 ml de PBS 1x gelado e centrifugar por 2 min a 100 g.
- 2- **Na capela**, retire o sobrenadante e adicione 2 ml de PBS 1x com 1% de formaldeído para realizar o crosslink da proteína. (**Utilizando o formaldeído a 37%, coloque 270 µl de formaldeído para 10 ml de PBS 1x**).
- 3- Infiltrar os protoplastos a vácuo (200 Pa), sem exceder o tempo máximo de 15 min de exposição ao formaldeído. O primeiro vácuo deve ser aplicado por 1,5 min (ou interrompido quando houver formação de bolhas). O segundo vácuo será aplicado por 1 min e o terceiro, também por 1 min.
- 4- Centrifugue por 2 min a 100 g e, **na capela**, retire o sobrenadante.
- 5- Adicione 2 ml de solução de glicina 0,125 M e aplicar novo vácuo por 1,5 min. O tempo de exposição a glicina deve ser de 5 min. (Adicione 1,25 ml da solução de glicina 1 M para ter 10 ml de solução a 0,125 M).
- 6- Centrifugar por 2 min a 100 g e retirar o sobrenadante na capela.
- 7- Lavar o pellet 2x com 2 ml de PBS 1x. Centrifugue e retire o sobrenadante. Coloque os tubos em nitrogênio líquido.
- 8- Guardar o tubo com o pellet a -80°C.

#### Parte 2: Isolamento nuclear e “corte” da cromatina

ADICIONAR INIBIDOR DE PROTEASE 1X E 40 mM DE 2-MERCAPTOETANOL NA SOLUÇÃO DE EXTRAÇÃO DE NÚCLEO.

RESFRIAR A CENTRÍFUGA A 4°C.

- 1- Pegar o material anteriormente fixado no -80°C e levar para bancada em nitrogênio líquido.
- 2- Macerar o pellet congelado e adicionar 400 µl do **tampão de extração nuclear** e macerar novamente **Não deixar a amostra esquentar!**
- 3- Centrifugar por 5 min a 10.000 g a 4°C. Remova o sobrenadante e ressuspensa o pellet em 75 µl de **tampão de lise nuclear**.
- 4- Mantenha a amostra no gelo por 30 min vertendo ocasionalmente. Add 125 µl de **ChIP dilution buffer SEM Triton**.
- 5- Sonicar por 35 minutos.
- 6- Adicionar ao mesmo tubo, 123 µl de ChIP dilution buffer WITH Triton X-100 e 12, 30 µl de Triton X-100 22%, para uma concentração final de Triton X-100 de 1,1%.

- 7- Centrifugar a máxima rotação (16000 g) por 5 min a 4°C. Transfira o sobrenadante para um novo tubo de 2 ml. Repita o passo novamente para remover o máximo de pellet possível. Transferir 20 µl da solução para um novo tubo e guarde a -20°C. Essa alíquota servirá como *input* para fazer uma PCR e confirmar a presença do promotor de interesse.

### Parte 3: Pré-clearing

- 8- Adicionar 10 µl de Beads A-Sepharose por tubo (na amostra original) e incubar por 1,5 h a 4°C com rotação.
- 9- Centrifugar por 3 min a 900 g e transferir o sobrenadante para um novo tubo.

### Parte 4: Imunoprecipitação incluindo passo de incubação overnight

- 10- Adicione 4 µl do anticorpo e deixe incubado **overnight** sob agitação a 4°C.
- 11- Para que a imunoprecipitação capture os complexos DNA-proteína, adicione 40 µl de Beads A-Sepharose por tubo e incube por 4h a 4°C sob rotação.

### Parte 5: Lavagens

- 12- Centrifugue os tubos a 900 g por 3 min a 4°C e remova o sobrenadante passando para outro tubo e guardando para verificar a sonicação posteriormente.
- 13- Lave o **pellet** 1x com 500 µl de **Low Salt Wash Buffer** gelado com rotação por 5 min a 4°C.
- 14- Centrifugar a 900 g por 3 min e descarte o sobrenadante.
- 15- Lave o pellet uma vez com 500 µl de **High Salt Wash Buffer** gelado e mantenha sob rotação por 5 min a 4°C.
- 16- Centrifugue a 900 g por 3 min e descarte o sobrenadante.
- 17- Lave o pellet 1x com 500 µl de solução de **Cloreto de Lítio 250mM** e mantenha sob rotação por 5 min a 4°C.
- 18- Centrifugue a 900 g por 3 min e descarte o sobrenadante.
- 19- Lave uma vez com 200 µl de **TE 0,5M** gelado, rotacionando por 5 min a 4°C.
- 20- Centrifugue a 900 g por 3 min e descarte o sobrenadante.
- 21- Adicione ao pellet 50 µl de **Nuclei Lysis Buffer** e incube por 30 min a 65° para separar a amostra das beads.
- 22- Centrifugue a 900 g por 3 min, remova o sobrenadante e **guarde-o** em outro tubo.
- 23- Sobre o pellet, adicione 25 µl do tampão de eluição (**Nuclei Lysis Buffer**) e incube novamente por 30 min a 65°C.
- 24- Centrifugue a 900 g por 3 min, remova o sobrenadante e junte com o sobrenadante do passo 22. O pellet é todo de beads agora.

### Parte 6: Reversão do crosslinking

- 25- Adicione 80 µl de Nuclei Lysis Buffer ao input reservado para PCR no passo 7 (parte 2) para um total de 100 µl.

26- Adicione 6  $\mu$ l de NaCl 5 M ao input e as amostras do ChIP. Mantenha incubado overnight a 65°C para reversão do crosslink.

#### **Parte 7: Purificação de DNA (Kit QIAprep Spin Miniprep - Qiagen)**

27- Adicione 550  $\mu$ l de Buffer PB em cada tubo.

28- Coloque as amostras no shaker por 30 min a temperatura ambiente.

29- Transfira a amostra para uma coluna de purificação de DNA e centrifugue por 1 min a 16000 g.

30- (Opcional) Repasse a amostra na coluna e centrifugue novamente. Descarte o filtrado.

31- Adicionar 750  $\mu$ l de Buffer PE na coluna e centrifugar por 1 min a 16000 g.

32- Descartar o filtrado e centrifugar novamente por 1 min a 16000 g para remover todo o restante de Buffer PE.

33- Coloque a coluna em um tubo novo de 1,5 ml e adicione aproximadamente 25  $\mu$ l de água (“boa e quente”), deixe por 5min e centrifugue por 1 min a 16000 g.

34- (Opcional) Repasse o líquido pela coluna e centrifugue novamente.

35- **Mantenha o eluato e guarde a -20°C por até um mês.** Não dilua antes de guardar.