

FERNANDA BARREIRO BRITO

Estudo do Papel de Arginil t-RNA Transferase na
Resistência a Vírus de Plantas



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2020

Trabalho a ser realizado no Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Maite Vaslin de Freitas Silva.

FICHA CATALOGRÁFICA

(Montada pela bibliotecária Ana Paula)

CIP - Catalogação na Publicação

BB862e Barreiro Brito, Fernanda
Estudo do Papel de Arginil t-RNA Transferase na Resistência a Vírus de Plantas / Fernanda Barreiro Brito. -- Rio de Janeiro, 2020.
62 f.

Orientador: Maite Vaslin de Freitas Silva.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2020.

1. ATE. 2. qPCR. 3. Resistência Vegetal. 4. Virose Vegetal. I. Vaslin de Freitas Silva, Maite , orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores brasileiros que buscam produzir conteúdo científico de qualidade no país.

AGRADECIMENTOS

Em um país estratificado economicamente e socialmente como o Brasil, o incentivo à educação desde a infância é o maior determinante para o futuro dos jovens brasileiros. Na esfera social em que fui criada, é perceptível a diferença entre aqueles que tiveram a oportunidade de ter um ensino básico de qualidade e os que precisaram traçar outros caminhos. Tive a sorte de ter a minha mãe, Maria Cristina Barreiro, sempre presente. Ela me fez enxergar o poder que a busca por informação pode ter em nossas vidas, e isso me fez acreditar e sonhar que poderia estudar e exercer o que amo. Sou imensamente grata por todos os ensinamentos e por todo zelo que recebi.

Agradeço ao Rodney Telmo Brito por além de ser meu pai, ser meu grande amigo. Ele me ensina todos os dias a importância do autocuidado, elemento essencial para que o presente trabalho fosse construído. O seu amor e suporte me fazem ser uma pessoa e uma profissional melhor.

Aos meus amigos, Ester Palermo Maia, Matheus de Carvalho, Clara Viana, Jessika Ferreira, Ana Lourenço, Kimberly Ramos e Aline Rezende, minha eterna gratidão por cada uma das inúmeras vezes em que foram motivos do meu sorriso e pelo amparo concedido. Vocês estarão para sempre nesse trabalho e no meu coração.

Por todos os sentimentos bons que me faz sentir, por toda compreensão e pelo auxílio e afeto que recebo, gostaria de agradecer à minha namorada Larissa Matheus. Grande parte desse trabalho foi escrito enquanto eu escutava as nossas músicas.

A graduação é um momento de descobertas. No Laboratório de Virologia Molecular Vegetal, tive a oportunidade de amadurecer tecnicamente e de descobrir uma linha de pesquisa que tenho apreço e orgulho. Nada disso teria sido possível sem a ajuda da minha equipe. Portanto, agradeço a cada um, em especial ao Alex Moura, Anna Karoline Fausto e Caroline Montebianco. É um prazer trabalhar ao lado de vocês.

Agradeço à minha orientadora, Maite Vaslin de Freitas Silva, por ter acreditado em mim para participar desse trabalho que possui tanta história. Sua orientação, paciência e o seu incentivo foram peças fundamentais durante a minha formação.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPERJ e a UFRJ, por apoiarem a ciência no Brasil.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES /
UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS
DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Fernanda Barreiro Brito**
DRE: 117039998

BANCA EXAMINADORA: Profa. Luciana Jesus da Costa (Presidente)
Profa. Adriana Flores Fusaro
Prof. Régis Lopes Corrêa
Profa. Iranaia Assunção Miranda (Suplente)

Título da Monografia: **“Estudo do papel de arginil t-RNA transferase na resistência a vírus de plantas”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/ijg-wpxx-vse>
Data e hora de início: **18 de dezembro de 2020 às 15:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,00 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 18 de Dezembro de 2020.

NOTA	Banca Examinadora:
___ 10 ___	Profa. Luciana Jesus da Costa
___ 10 ___	Profa. Adriana Flores Fusaro
___ 10 ___	Prof. Régis Lopes Corrêa
_____	Profa. Iranaia Assunção Miranda

Presidente da banca _____

Profa. Luciana Jesus da Co... 

Aluno: _____



Fernanda Barreiro Brito

Orientador: _____



Profa. Maite Vaslin de Freitas Silva

Coordenador
de TCC _____



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

RESUMO

FERNANDA BARREIRO BRITO

ESTUDO DO PAPEL DE ARGINIL T-RNA TRANSFERASE NA RESISTÊNCIA A VÍRUS DE PLANTAS

Orientador: Maite Vaslin de Freitas Silva

A resistência vegetal é um dos mecanismos de defesa observados em plantas frente ao surgimento de patógenos. Em estudos sobre variedades de algodão comercial (*Gossypium hirsutum*) resistentes a infecção pelo *Cotton Leafroll Dwarf Virus* (CLRDV), nosso grupo identificou as ORFs *CBD1* e *CBD2* entre os marcadores moleculares para o locus de resistência presente nessa planta. A proteína codificada pelo gene *CBD2* possui homologia com Arginil t-RNA Transferase (ATE) de *Arabidopsis thaliana*, que atua na via *N-end-rule* promovendo a ubiquitinação e degradação de proteínas via proteassoma. Durante ensaios de infecção com CLRDV, foi possível observar que *CBD2* é superexpresso nas variedades de *G. hirsutum* resistentes a esse vírus. Em contrapartida, nas variedades suscetíveis foi observada a diminuição de sua expressão. Quando *A. thaliana* que superexpressam ATE-1 (*35S:ATE1*) foram submetidas à infecção por esse vírus, houve uma repressão do acúmulo de RNA viral quando comparado com o observado nas plantas *wild type*. Logo, o presente trabalho busca analisar se a superexpressão de ATE torna a planta modelo *A. thaliana* resistente a outros patógenos vegetais, como *Potato virus X* (PVX) e *Tobacco rattle virus* (TRV), que são espécies amplamente utilizadas no ramo da biotecnologia. Como resultados, foi possível analisar que os genes das proteínas de PVX e TRV são reprimidos sistemicamente nas plantas *35S:ATE1*, sustentando a hipótese de que ATE pode estar relacionada com a inibição do espalhamento de outros vírus além do CLRDV.

Palavras-chave: ATE, CLRDV, PVX, qPCR, Resistência Vegetal, TRV.

ABSTRACT

FERNANDA BARREIRO BRITO

STUDY OF THE ROLE OF ARGINYL T-RNA TRANSFERASE IN RESISTANCE TO PLANT VIRUSES

Advisor: Maite Vaslin de Freitas Silva

Plant resistance is one of the defense mechanisms observed in plants against the emergence of pathogens. In studies on commercial cotton varieties (*Gossypium hirsutum*) resistant to infection by the *Cotton Leafroll Dwarf Virus* (CLRDV), our group identified the *CBD1* and *CBD2* ORFs among the molecular markers for the locus of resistance present in this plant. The protein encoded by the *CBD2* gene has homology with Arginyl t-RNA Transferase (ATE) from *Arabidopsis thaliana*, which acts on the *N-end-rule* pathway promoting ubiquitination and protein degradation via the proteasome. During tests of infection with CLRDV, it was possible to observe that *CBD2* is overexpressed in varieties of *G. hirsutum* resistant to this virus. In contrast, in susceptible varieties, a decrease in their expression was observed. When *A. thaliana* that overexpress ATE-1 (35S: *ATE1*) was subjected to infection by this virus, there was a repression of the accumulation of viral RNA when compared to that observed in wild type plants. Therefore, the present work seeks to analyze if the ATE overexpression makes the *A. thaliana* model plant resistant to other plant pathogens, such as *Potato virus X* (PVX) and *Tobacco rattle virus* (TRV), which are species widely used in the field of biotechnology. As a result, it was possible to analyze that the genes of the PVX and TRV proteins are repressed systemically in the 35S: *ATE1* plants, supporting the hypothesis that ATE may be related to the inhibition of the spread of viruses other than CLRDV.

Key-words: ATE, CLRDV, PVX, qPCR, TRV, Vegetable Resistance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATE - Arginil T-RNA transferase

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tools*

CBD - *Cotton blue disease*

cDNA - DNA complementar

CP - Capsídeo

DA - Doença Azul do algodoeiro

dNTP - Desoxirribonucleico trifosfato

DNA - Ácido desoxirribonucleico

d.p.i - Dias após a infecção

GFP – *Green Fluorescent Protein*

h.p.i - Horas após a infecção

Kb - Quilobase

ORF - *Open Reading Frame*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pb – Pares de bases

RdRp - RNA polimerase RNA dependente

Wt – *Wild type* (selvagem)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Subunidades do proteossoma 26S de *S. cerevisiae* indicado por uma estrutura Cryo-EM (Aufderheide et al., 2015).

Figura 2 - Via *N-end rule* induzida por Arginil t-RNA transferase (ATE).

Figura 3 - Expressão relativa do gene CBD2 em *Gossypium hirsutum* cultivares FM966 e Delta Opal durante infecção pelo CLRDV.

Figura 4 - Expressão relativa dos genes *ATE1* e *ATE2* durante infecção por CLRDV em linhagens de *A. thaliana* wt e *35S:ATE1*.

Figura 5 - Esquema do genoma do CLRDV. A linha superior indica o RNA genômico, constituído pelas ORFs 0, ORF1, ORF2, ORF3a, ORF3, ORF4 e ORF5.

Figura 6 - Alguns dos sintomas provocados pela doença azul do algodoeiro.

Figura 7 - Esquema do cromossomo 11 de *G. raimondii*.

Figura 8 - Esquema do genoma de *Potato virus X* contendo cinco *Open Reading Frames* (ORF).

Figura 9 - Alguns dos sintomas das viroses causadas por *Potato virus X* e *Tobacco rattle virus* em *Nicotiana benthamiana*.

Figura 10 - Esquema do genoma bipartido de *Tobacco rattle virus*.

Figura 11 - Esquema da construção de PVX clonado em vetor binário de *A. tumefaciens*.

Figura 12 - Esquema das construções de TRV (TRV1/RNA1 e TRV2/RNA2) clonadas em vetores binários de *A. tumefaciens*.

Figura 13 – Folhas inoculadas através de ensaio de agroinfiltração para infecção de *N. benthamiana* com *Potato virus X*.

Figura 14 – Ensaio de infecção com *Potato virus X* em *Nicotiana benthamiana*.

Figura 15 - Resultado da PCR para PVX em gel de agarose a 1,5% revelado em luz ultravioleta.

Figura 16 – *Arabidopsis thaliana* infectadas com PVX por agroinfiltração.

Figura 17 – *Arabidopsis thaliana* com 44 dias de crescimento em substrato visualizadas em luz visível.

Figura 18 – *Arabidopsis thaliana* infectadas por PVX-GFP com 6dpi sob luz visível e luz ultravioleta.

Figura 19 – *Arabidopsis thaliana* infectadas por TRV-GFP com 6dpi sob luz visível e luz ultravioleta.

Figura 20 - Expressão do gene de TGB2 em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* infectadas por Potato virus X (PVX).

Figura 21 - Expressão do gene *Atate1* em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* durante infecção por *Potato virus X* (PVX).

Figura 22 - Expressão do gene *Atate1* em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* durante infecção por *Potato virus X* (PVX).

Figura 23 - Expressão do gene de CP em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* durante infecção por *Tobacco rattle virus* (TRV).

Figura 24 - Expressão do gene *Atate1* em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* durante infecção por *Tobacco rattle virus* (TRV).

Figura 25 - Expressão do gene *Atate1* em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* durante infecção por *Tobacco rattle virus* (TRV).

Figura 26 - Níveis do acúmulo do RNA de TRV em linhagens selvagens (*Wild type* - wt) e que superexpressam ATE-1 (*35S:ATE1*) em *Arabidopsis thaliana*.

Figura 27 - Níveis de expressão dos genes ATE em linhagens que superexpressam ATE1 (*35S:ATE1*) de *A. thaliana* sob infecção pelo CLRDV.

Figura 28 - Expressão dos genes ATE1 em plantas selvagens (*Wild type* – Wt) e *35S:ATE* de *A. thaliana* inoculadas com pulgões *Aphis gossypii* virulíferos.

Figura 29 - Níveis do acúmulo do RNA de TRV em linhagens selvagens (*Wild type* - wt) e que superexpressam ATE-1 (*35S:ATE1*) em *Arabidopsis thaliana*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes de resistência dominantes e recessivos descritos na literatura.

Tabela 2 – Alvos da amplificação e os oligonucleotídeos correspondentes.

Tabela 3 – Pares de oligonucleotídeos forward (F) e reverse (R) dos genes *Atate1*, *Atate2*, *AtFBox* e *AtEF1a*.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Resistência a Vírus em Plantas	1
1.2 Proteassoma	4
1.3 Arginil t-RNA Transferase	7
1.4 <i>Cotton leafroll dwarf virus</i> e a Doença Azul do Algodoeiro	11
1.5 <i>Potato virus X</i> e <i>Tobacco rattle virus</i>	14
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Material Vegetal	20
4.2 Inóculos Virais por Agroinoculação	20
4.2.1 Cepas de Agrobactérias	20
4.2.2 Ensaio de Infecção com <i>Potato virus X</i> e <i>Tobacco rattle virus</i>	22
4.3 Extração de RNA e Transcrição Reversa	23
4.4 Análise da Expressão dos Genes das Proteínas de PVX e TRV por qPCR	23
4.5 Análise da Expressão de Arginil t-RNA Transferase por qPCR	24
4.6 Análise Estatística	25
5 RESULTADOS	26
5.1 Ensaio de Infecção em <i>Arabidopsis thaliana</i> com <i>Potato virus X</i> e <i>Tobacco rattle virus</i>	26
5.2 Avaliação da suscetibilidade de plantas <i>35S:ATE1</i> ao PVX	35
5.3 Avaliação da suscetibilidade de plantas <i>35S:ATE1</i> ao TRV	39

6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÕES	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXO A - Amostras de folhas de <i>A. thaliana wild type</i> (wt) e <i>35S:ATE1</i> (SE) inoculadas com PVX e TRV e sistêmicas	47
ANEXO B - Resultado das quantificações dos RNAs de <i>A. thaliana</i> wt e SE (folhas inoculadas e sistêmicas) infectadas com PVX	47
ANEXO C - Resultado das quantificações dos RNAs de <i>A. thaliana</i> wt e SE (folhas inoculadas e sistêmicas) infectadas com TRV	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resistência a Vírus em Plantas

Durante seu processo evolutivo, as plantas selecionaram mecanismos de reconhecimento e combate aos fitopatógenos que constituem atualmente a imunidade vegetal. No momento da interação patógeno-planta, há dois tipos de respostas que podem ser desencadeadas pelo organismo hospedeiro: PTI (*PAMP-Triggered Immunity*) e ETI (*Effector-Triggered Immunity*). Durante PTI, ocorre o reconhecimento de elicitores do patógeno denominados PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) ou MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Pattern*) através de receptores membranares conhecidos como PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Normalmente essa resposta induz sinais sistêmicos que provêm do sítio infeccioso (Marone et al., 2013). Em contrapartida, durante ETI ocorre o reconhecimento de efetores secretados pelos patógenos por meio de receptores intracelulares. Esses receptores intracelulares são conhecidos como proteínas de resistência (R), codificadas pelos genes *R*, e promovem a detecção dos efetores de forma direta ou indireta. A resposta por ETI gera uma resistência duradoura quando comparada com PTI.

O gene *N* de *Nicotiana glutinosa* foi o primeiro gene *R* identificado, conferindo resistência ao *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Holmes, 1938). Já o gene *Rx* presente nas batatas (*Solanum tuberosum*) é o melhor caracterizado e codifica uma proteína do tipo CC-NBS-LRR (domínio N-terminal *coiled-coil* (CC), domínio sítio de ligação central ao nucleotídeo (NBS) e domínio C-terminal rico em repetições de leucina (LRR)) que reconhece efetores polimórficos de patógenos, tornando possível inviabilizar a infecção por *Potato virus X* (PVX) (Dangl & Jones, 2001). A maioria dos genes *R* descritos até o momento codifica proteínas do tipo NBS-LRR ou CC-LRR. As respostas associadas a ativação das proteínas *R* geralmente estão envolvidas, dentre diversos mecanismos, com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), acúmulo de hormônios como ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA) e reprogramação transcricional com consequente indução de genes associados à defesa. Normalmente a resposta de hipersensibilidade (HR) acaba sendo desencadeada por essas proteínas, gerando a morte celular das células infectadas e das adjacentes para o confinamento do patógeno em um sistema de defesa local. Entretanto, a defesa sistêmica também pode ser estimulada através destas, levando

ao desenvolvimento de sinalizações para sítios distantes ao da infecção em um evento denominado SAR (*Systemic Acquired Resistance*) (Calil & Fontes, 2017).

Além da resistência mediada pelos genes dominantes *R*, há também a resistência determinada por genes recessivos. Estes não codificam receptores imunes envolvidos na detecção via ETI, mas atuam sobre o ciclo biológico viral como, por exemplo, regulando fatores de iniciação traducional de eucariotos (eIF4E e eIF4G) (Calil & Fontes, 2017). Exemplos de genes *R* e os respectivos patógenos a que estão associados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Genes de resistência dominantes e recessivos descritos na literatura. Nome do gene, proteína alvo do mecanismo de resistência, espécie hospedeira e vírus indutor da resposta. Adaptado de Galvez et al., 2014; Sanfaçon, 2015; Boualem et al., 2016; Fausto, 2016; Moura, 2018, com modificações.

Genes de Resistência	Proteína Relacionada	Espécie	Vírus	Referência
<i>sbm2</i> - recessivo	eIF4E	<i>P. sativum</i>	PSbMV	GAO et al., 2004
<i>cyv1/cyv2</i> – recessivo	eIF4E	<i>P. sativum</i>	CIYVV	CHOI et al., 2012
<i>pvr1</i> - recessivo	eIF4E	<i>S. lycopersicum</i>	TEV	KANG et al., 2007
<i>pvr1/pvr2</i> – recessivo	eIF4E	<i>C. annuum</i>	PVY, TEV	RUFFEL et al. 2002; KANG et al., 2005; PEREZ et al., 2012
<i>eIF4E</i> mutante – recessivo	eIF4E	<i>S. tuberosum</i>	PVY	CAVATORTA et al., 2011
<i>pot-1</i> - recessivo	eIF4E	<i>S. lycopersicum</i>	PVY, TEV	RUFFEL et al., 2005
<i>mo11/mo12</i> – recessivo	eIF4E	<i>L. sativa</i>	LMV	NICAISE et al., 2003
<i>sbm1</i> - recessivo	eIF4E	<i>P. sativum</i>	PsbMV, BYMV	GAO et al., 2004; BRUUNRASM USSEN et al., 2007
<i>rym4/5</i> – recessivo	eIF4E	<i>H. vulgare</i>	BaMMV	KANYUKA et al., 2005; STEIN et al., 2005
<i>rymv1</i> – recessivo	eIFiso4G	<i>O. sativa</i>	RYMV	ALBAR et al., 2006
<i>Nsv</i> - recessivo	eIF4E	<i>C. melo</i>	MNSV	NIETO et al., 2006

<i>pvr2/pvr6-recessivo</i>	eIF4E e eIFiso4E	<i>C. annuum</i>	PVY, TEV	RUFFEL et al., 2006
<i>bc-3 - recessivo</i>	eIF4E	<i>P. vulgaris</i>	CIYVV	HART & GRIFFITHS, 2013
<i>rym7 - recessivo</i>	eIFiso4E	<i>H. vulgare</i>	BaMMV	YANG et al., 2013
<i>CMR1 – dominante</i>	TIR-NLR	<i>P. vulgaris</i>	CMV	SEO et al., 2006
<i>TuR3 – dominante</i>	TIR-NLR	<i>B.campestris</i>	TuMV	MA et al., 2010
<i>TuRB 07 – dominante</i>	CC-NLR	<i>Brassica rapa</i>	TuMV	JIN et al., 2014
<i>CYR1 – dominante</i>	CC-NLR	<i>Vigna mungo</i>	MYMV	MAITI et al., 2012
<i>Pvr1-2 – dominante</i>	TIR-NLR	<i>C. melo</i>	PRSV	BROTMAN et al., 2013
<i>Vat - dominante</i>	CC-NLR	<i>C. melo</i>	PRSV	DOGIMONT et al., 2014
<i>I - dominante</i>	TIR-NLR	<i>P. vulgaris</i>	<i>Potyvirus</i>	VALLEJOS et al., 2016
<i>Ctv - dominante</i>	CC-NLR	<i>Poncirus trifoliata</i>	CTV	RAI et al, 2006
<i>Rsv1 – dominante</i>	CC-NLR	<i>G. max</i>	SMV	WEN et al., 2013
<i>L1/L2/L3/L4 – dominante</i>	CC-NLR	<i>C. annuum</i>	<i>Tobamovirus</i>	TOMITA et al., 2008
<i>Tm-2 – dominante</i>	CC-NLR	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Tobamovirus</i>	LANFERMEIJER et al., 2005
<i>RCY1 – dominante</i>	CC-NLR	<i>A. thaliana</i>	CMV	TAKAHASHI et al., 2002
<i>RTM3 – dominante</i>	Proteína não caracterizada com domínio MATH	<i>A. thaliana</i>	TEV	COSSON et al., 2010
<i>JAX1 – dominante</i>	Lectin Like Protein	<i>A. thaliana</i>	PLAMV	YAMAJI et al., 2012
<i>VTT1 – dominante</i>	TIR-NLR	<i>P. vulgaris</i>	BDMV	SEO et al., 2007
<i>Tm-1 – dominante</i>	Proteína não caracterizada	<i>S. lycopersicum</i>	TMV, ToMV	WATANABE et al., 1987; ISHIBASHI et al., 2007; ISHIBASHI & ISHIKAWA, 2013
<i>RT4-4 – dominante</i>	TIR-NBSLRR	<i>P. vulgaris</i>	CMV	SEO et al., 2007
<i>RTM2- dominante</i>	Heat Shock Protein	<i>A. thaliana</i>	TEV	WHITHAM et al., 2000
<i>RTM1 –</i>	Lectin Like	<i>A. thaliana</i>	TEV	CHISHOLM et

<i>dominante</i>	Protein			al., 2000
<i>Tm2-2 – dominante</i>	CC-NLR	<i>S. lycopersicum</i>	TMV, ToMV	LANFERMEIJE R et al., 2003
<i>RCY1 – dominante</i>	CC-NLR	<i>A. thaliana</i>	CMV	TAKAHASHI et al., 2002
<i>Y1 - dominante</i>	TIR-NLR	<i>S. tuberosum</i>	PVY	VIDAL et al., 2002
<i>HRT – dominante</i>	CC-NLR	<i>A. thaliana</i>	TCV	COOLEY et al., 2000
<i>N - dominante</i>	TIR-NLR	<i>N. tabacum</i>	TMV, ToMV	WHITHAM et al., 1994
<i>Rx1 - dominante</i>	CC-NLR	<i>S. tuberosum</i>	PVX	BENDAHDAN E et al., 1999; BAURÈS et al., 2008

Nomes dos vírus: *Barley yellow mosaic virus* (BaMMV); *Bean yellow mosaic virus* (BYMV); *Clover yellow vein virus* (CIYVV); *Lettuce mosaic virus* (LMV); *Melon necrotic spot virus* (MNSV); *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV); *Potato virus Y* (PVY); *Rice yellow mottle virus* (RYMV) e *Tobacco etch virus* (TEV); *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV); *Citrus tristeza virus* (CTV); *Cucumber mosaic virus* (CMV); *Groundnut ringspot virus* (GRSV); *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV); *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV); *Papaya ringspot virus* (PRSV); *Potato virus X* (PVX); *Potato virus Y* (PVY); *Soybean mosaic virus* (SMV); *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV); *Turnip crinkle virus* (TCV); *Tobacco etch virus* (TEV); *Tomato mosaic virus* (ToMV); *Tobacco mosaic virus* (TMV); *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Turnip mosaic virus* (TuMV). eIF4E - fator de iniciação da tradução eucariótica; eIFiso4E – isoforma do fator de iniciação da tradução eucariótica. CC - coiled-coil; TIR - Receptor Toll/interleukin 1; nd - Não descrito; CP - capsídeo; MP - proteína do movimento; Pol - Replicase ou Polimerase.

Outros mecanismos de defesa que ocorrem após o contato e reconhecimento de vírus pela planta são o silenciamento de RNA ou RNAi (RNA interferente) e a degradação pelo proteossoma. Durante o silenciamento de RNA, ocorre o processamento da dupla fita de RNA intermediária gerada pela replicação do vírus por meio da enzima DCL (*DICER-Like*), vsRNAs (*viral small interference RNAs*). vsRNAs maduros são incorporados ao complexo enzimático RISC (*RNA-induced silencing complex*) do qual faz parte a enzima AGO (argonauta). Nesse fenômeno, ocorre a degradação do RNA viral alvo após o reconhecimento pelo vsRNA presente no complexo RISC (Llave, 2010). Já na defesa viral mediada pelo proteossoma, normalmente a infecção é contida pela proteólise das proteínas virais.

1.2 Proteossoma

O proteassoma é uma via proteolítica dependente de ATP presente em eucariotos, arqueas e em algumas bactérias. Nos organismos eucariontes, o proteassoma 26S presente é composto pela subunidade central 20S, que possui domínio protease, e pelo quepe 19S das extremidades, que consiste em um complexo composto de um anel proteico de seis subunidades (*Rpt ATPasering*) pelo qual a proteína-alvo é translocada até chegar à porção 20S (Figura 1). As proteínas que constituem essa estrutura anelada são denominadas ‘proteínas AAA’ e têm como função promover a desnaturação por meio da reação de desespiralização direcionada por hidrólise de ATP. O substrato se mantém ligado ao proteassoma até o final do seu processamento em pequenos peptídeos, diferente do que ocorre durante a proteólise por outras proteases (Alberts et al., 2017).

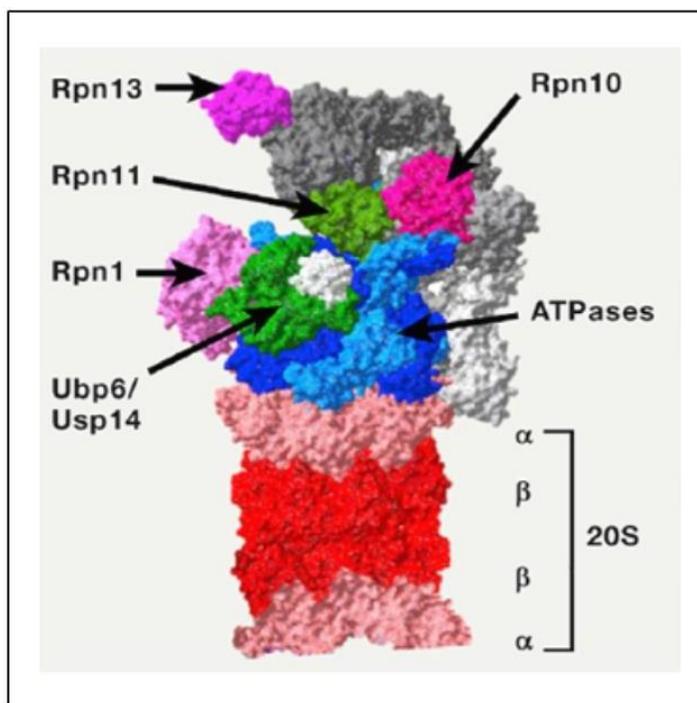


Figura 1 - Subunidades do proteassoma 26S de *S. cerevisiae* indicado por uma estrutura Cryo-EM (Aufderheide et al., 2015). As subunidades Rpn1, Rpn10, e Rpn13 consistem em sítios de ligação para a ubiquitina, Ubp6/Usp14 promove a remoção da ubiquitina e ativação da porção 19S e Rpn11 efetua a remoção final de Ub. As ATPases estão presentes no quepe 19S e a porção 20S é constituída pelas subunidades alfa (região de entrada do substrato) e beta (promove a proteólise). Adaptado de Collins et al., 2017.

No meio intracelular, o proteassoma é encontrado no citosol e no núcleo celular. Essa proteína constitui cerca de 1% das proteínas celulares e possui funções essenciais para a manutenção da homeostase, sendo a maior maquinaria de degradação em condições de oxidação (Deshmukh et al., 2019). Dentre suas funções, a principal é a capacidade de degradar proteínas que foram enoveladas erroneamente por conta de mutações, erros transcripcionais, erros durante o *splicing* do RNA ou durante o processo traducional. Para que a degradação via proteassoma ocorra, os substratos precisam ser ubiquitinados para que seja possível a passagem destes pelo quepe 19S (Alberts et al., 2017).

A ubiquitinação consiste na ligação covalente entre a proteína-alvo e uma cadeia de proteínas ubiquitinas promovida pela enzima E3 Ub-ligase. A ligação entre ubiquitina e proteassoma depende de receptores proteicos conhecidos como UBPs. Alguns exemplos desses receptores são Rpn1, Rpn10 (presente em fungos), Rpn13 (presente em fungos e mamíferos) e Rpn10/S5a (presente em mamíferos) (Figura 1) (Collins & Goldberg, 2017). Os UBPs possuem domínios de ligação denominados UBDs, que normalmente consistem em uma ou mais α -hélices que se ligam às regiões hidrofóbicas específicas da ubiquitina (Grice & Nathan, 2016).

A proteólise via proteassoma também pode ter como alvos proteínas que perderam suas estruturas pelo envelhecimento ou por danos oxidativos, tornando-se potencialmente citotóxicas (Deshmukh et al., 2019). Outras funções são a degradação de proteínas aberrantes que chegam ao retículo endoplasmático (RE) e a determinação de uma vida curta às proteínas normais cuja concentração deve ser alterada rapidamente em resposta ao estado celular. No caso das proteínas aberrantes presentes no RE, há um sistema de vigilância nessa organela que retrotransloca essas moléculas para o citosol para que possam ser degradadas pelo proteassoma (Alberts, 2017). Já no processo proteolítico das proteínas que devem ter suas concentrações modificadas, há diversos mecanismos de regulação. Um desses mecanismos é a criação de um sinal de degradação proteico em resposta a sinais ambientais, promovendo uma rápida ubiquitinação. O estabelecimento de alterações na extremidade N-terminal das proteínas-alvo é um exemplo desse processo, já que estas serão reconhecidas pela E3 Ub-ligase como resíduo N-terminal desestabilizador.

Recentemente diversos estudos vêm demonstrando a contribuição do Sistema Ubiquitina-Proteassoma (UPS) para a imunidade vegetal local e sistêmica. As plantas codificam em seus

genomas um extenso número de representantes desse sistema, como é o caso dos mais de 1.400 genes que codificam E3 ligases em *Arabidopsis* (Verchot, 2016).

Durante a interação vírus:hospedeiro, o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) normalmente é manipulado para que os níveis de proteínas virais necessários para o estabelecimento da infecção sejam alcançados, já que esse sistema também age eliminando esses componentes virais e inviabilizando a replicação do patógeno. O UPS é capaz de atuar frente às infecções por vírus de mamíferos, como é o caso da regulação que promove no ciclo do HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus-1*) (Rojas e Park, 2019) e do reconhecimento seletivo de proteínas de HBV (*Hepatitis B Virus*) (Kong et. al, 2019). Da mesma forma, também atua como mecanismo de defesa hospedeira sobre as viroses vegetais. A inibição do proteassoma em papaia pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV), por exemplo, leva ao aumento desse vírus no hospedeiro, acelerando o desenvolvimento dos sintomas da doença. Já durante a infecção de plantas do gênero *Brassica* por *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), componentes da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) viral são degradados pelo UPS, inibindo a replicação do vírus (Verchot, 2016). Estudando mecanismos associados à resistência de *Gossypium hirsutum* ao *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV), nosso grupo identificou a presença de uma arginil t-RNA transferase (ATE), proteína da via de degradação proteica *N-end rule* do proteassoma, no locus de resistência (Fausto, 2016; Fausto et al., em redação). Nessa via, as proteínas-alvo são marcadas para degradação através do proteassoma em função de seus aminoácidos N-terminais. Estudando ATE durante a infecção observou-se que para ter sucesso na infecção o vírus precisa de alguma forma inibir a expressão de ATE.

1.3 Arginil t-RNA Transferase

A arginil t-RNA transferase é uma proteína que atua na via *N-end-rule*, sendo capaz de promover a degradação de proteínas-alvo por meio do proteassoma. Para isso, age de forma pós-traducional fazendo a inserção do aminoácido arginina (Arg ou R) na porção N-terminal de proteínas que apresentam ácido aspártico (Asp ou D), ácido glutâmico (Glu ou E) ou cisteína oxidada (Cys ou C*) no N-terminal (Domitrovic et al., 2017).

Assim como os aminoácidos N-terminais K, H, F, G, W, Y e I, a arginina funciona como resíduo desestabilizador primário (denominados *N-degrons*) que é reconhecido em animais, fungos e plantas pelas E3 Ub Ligases (denominadas *N-recognins*). Em plantas, exemplos de E3 ligases dessa classe de proteínas ubiquitinas são a PRT1 e PRT6. Com o reconhecimento, as ubiquitinas são acrescentadas sequencialmente em lisinas (K) que se encontram a uma certa distância da porção N-terminal. Em seguida, ocorre o direcionamento dessas proteínas-alvo ubiquitinadas para a degradação via proteassoma 26S (Figura 2).

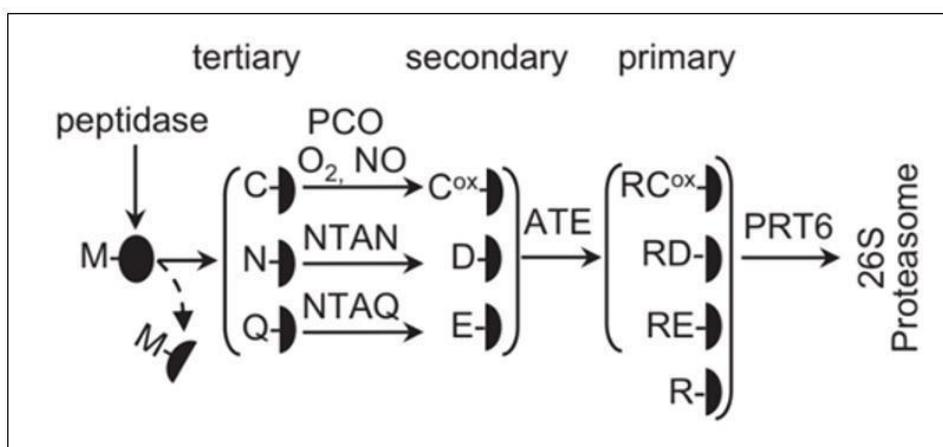


Figura 2 - Via *N-end rule* induzida por Arginil t-RNA transferase (ATE). Proteínas com ausência de metionina (M) na porção N-terminal normalmente são desestabilizadas ao exporem resíduos como C, N e Q. Estes sofrem modificações e passam a possuir resíduos como C^{ox}, D e E, sendo alvos de ATE. Após o reconhecimento, o aminoácido arginina é acrescentado, sendo possível a ubiquitinação por PRT6 e degradação via proteassoma 26S. Adaptado de Vicent et al., 2019.

No genoma da planta modelo *Arabidopsis thaliana* são encontrados os genes *AtATE1* e *AtATE2* que codificam para ATE. Em estudos com *A. thaliana* mutantes para esses genes, foi possível visualizar que estão relacionados ao atraso de senescência foliar e com a dominância apical, a alongação do caule e a regulação da morfologia foliar (Graciet et al., 2009). Além disso, também estão envolvidos com o descontrole da germinação das sementes dessas plantas mutantes por atuarem na sensibilidade ao ácido abscísico (Graciet et al., 2009, Graciet & Wellmer, 2010) e são modulados em situação de hipóxia (Gibbs et al., 2011, Licausi et al., 2011). Um trabalho de

2016 mostrou que ATE tem papel importante na indução de resistência a bactérias e fungos (Marchi et al., 2016).

Nosso grupo buscou avaliar a expressão de GhATE durante a infecção viral pelo CLRDV com o intuito de entender melhor o papel dessa proteína na resistência ao vírus. Para isso, foram utilizados cultivares de algodão suscetíveis (FM966) e resistentes (Delta-Opal) ao vírus. Nesse experimento, foi visto que a expressão relativa de GhATE nas folhas sistêmicas que tiveram contato com o pulgão sem vírus não sofre variações, como ocorre nas folhas que tiveram contato com o pulgão virulífero. Em 24 horas após o contato com o CLRDV, é possível visualizar a repressão do gene na cultivar FM966 e a sua indução em Delta-Opal (Figura 3) (Fausto, 2016).

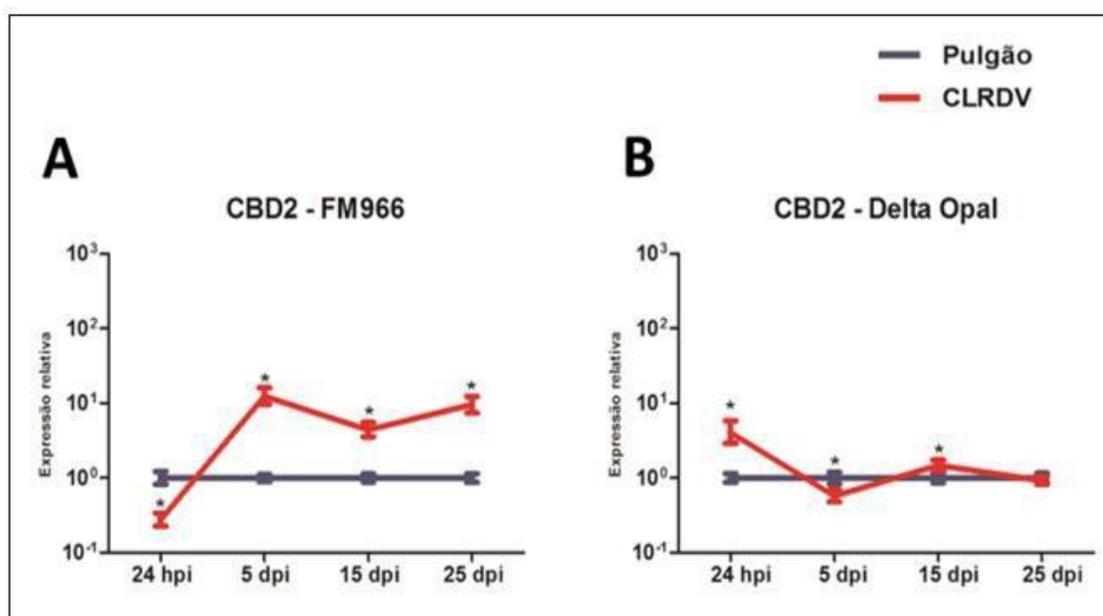


Figura 3 - Expressão relativa do gene CBD2 em *Gossypium hirsutum* cultivares FM966 e Delta Opal durante infecção pelo CLRDV. Os dados foram normalizados com os genes constitutivos GhmiR390 e GhPP2a e estão apresentados em escala logarítmica de base 10. Para cada ponto foram avaliados dois -pools de 5 plantas cada. *Teste -t-student| $p < 0.05$. Adaptado de Fausto, 2016.

Um estudo semelhante foi feito utilizando a planta modelo *A. thaliana* para a análise da expressão dos genes *ATE1* e *ATE2* durante a infecção por CLRDV. Plantas selvagens (wt) e transgênicas superexpressando ATE (*35S:ATE1*) foram infectadas e coletadas com 12hpi, 24hpi e

5dpi. Foi possível observar que nas plantas selvagens, suscetíveis a infecção pelo CLRDV, houve uma grande repressão de ambos os genes *ATE* em 12 hpi e indução apenas em 5 dpi, corroborando com os resultados obtidos em algodão (Figura 4). Já as plantas *35S:ATE1* apresentaram o inverso para o gene *ATE1*, sendo este induzido com 12 hpi e reprimido com 5 dpi (Moura, 2018; Fausto et al., em redação). Portanto, pode-se afirmar que arginil t-RNA transferase parece estar envolvida em mecanismos de resistência relacionados ao polerovírus CLRDV tanto em algodão quanto em arabidopsis, possivelmente induzindo a degradação de proteínas virais via proteossoma.

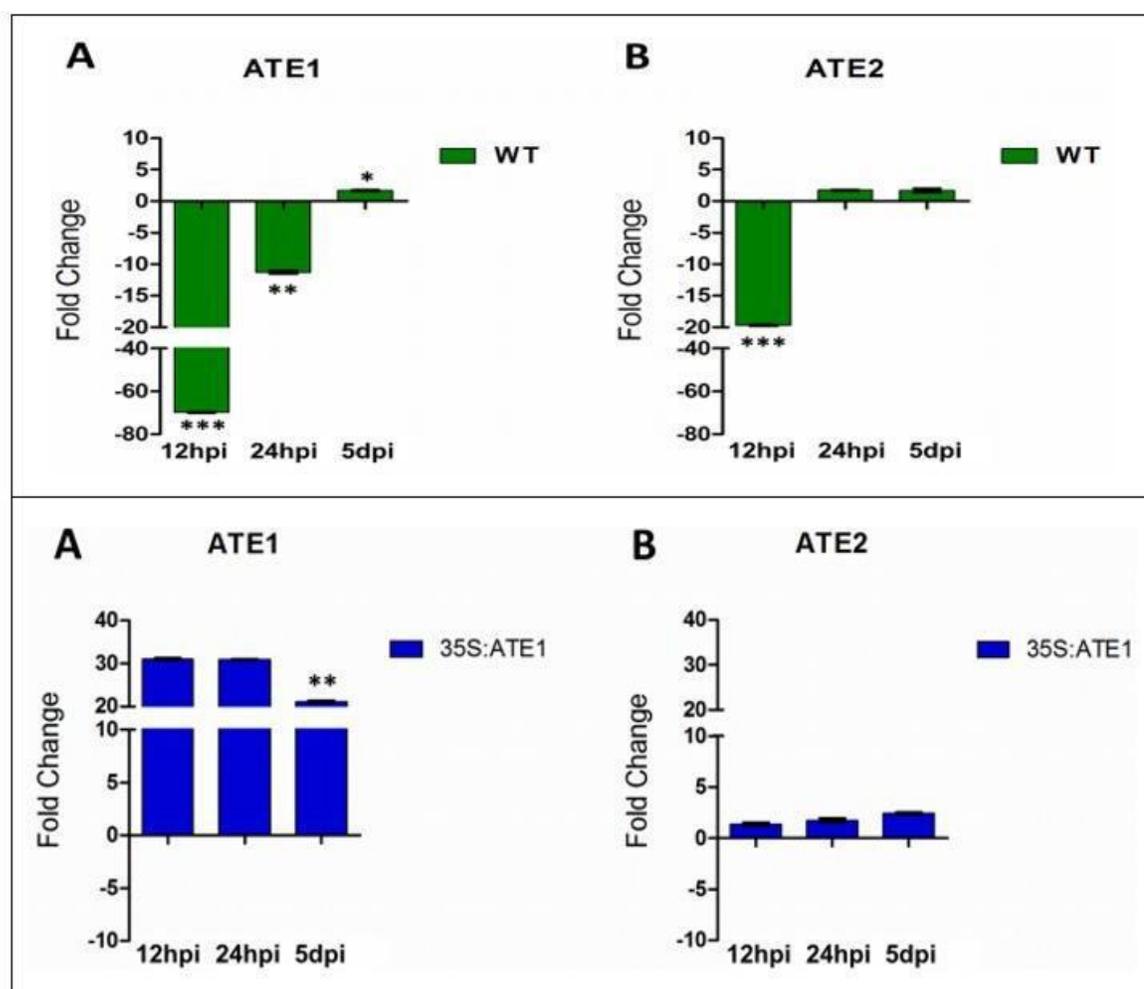


Figura 4 - Expressão relativa dos genes *ATE1* e *ATE2* durante infecção por CLRDV em linhagens de *A. thaliana* wt e *35S:ATE1*. O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizado para análise da expressão, representada em fold change segundo Schmitgen & Livak (2008). O controle utilizado foram amostras de *A. thaliana* inoculadas com pulgões sem vírus. Os resultados mostram a média e desvio padrão de três replicatas biológicas, sendo cada uma composta por um pool

de 4 plantas individuais. As expressões desses genes foram normalizadas com os genes constitutivos *AtEF1* e *AtFbox*. Adaptado de Moura, 2018.

1.4 *Cotton leafroll dwarf virus* e a Doença Azul do Algodoeiro

O algodão comercial, denominado *Gossypium hirsutum*, é uma eucotiledônea, pertence à família *Malvaceae* e é adaptado aos climas árido e semi-árido. É dividido em arbóreo, onde as fibras são longas e o cultivo é permanente, e herbáceo, que corresponde a mais de 99% do algodão comercializado, com fibras mais curtas e cultivo anual (Oosterhuis & Cothren, 2012).

O gênero *Gossypium* é composto por 52 espécies divididas em monofiléticas ou aloletraplóides. Dentre as monofiléticas, há oito grupos de genoma diplóide (com 13 pares de cromossomos) classificados de A - G e K. Já nos aloletraplóides, há um grupo de cinco espécies que contêm ambos os genomas diplóides A e D (com 26 pares de cromossomos) designados como (AD)¹ até (AD)⁵, incluindo o *G. hirsutum* ((AD)¹). A espécie do algodão comercial resulta do cruzamento de 5 - 10 milhões de anos atrás (Wendel et al., 2009) entre as espécies *G. herbaceum* (genoma A) e *G. raimondii* (genoma D), originárias da África e América (Novo Mundo), respectivamente (Paterson et al., 2012).

O Brasil é o quinto maior produtor mundial de algodão, atrás apenas da Índia, China, Paquistão e Estados Unidos (Abrapa, 2016). Atualmente, a cotonicultura brasileira se concentra no Mato-Grosso, com 63,6% do Valor Bruto da Produção (VBP) em 2018, e no Oeste da Bahia, com 25% do VBP em 2018 (Severino et al., 2019). Segundo o IMEA (Instituto Mato-Grossense de Economia Agropecuária), no ano de 2019 o estado Mato-Grosso bateu recorde na produção de algodão, atingindo uma safra de 1,11 milhão de hectares.

Tendo em vista a grande relevância econômica da cotonicultura, os estudos sobre as fitopatogênias que atingem as produções de algodão se tornam importantes. No território brasileiro, a principal virose vegetal que atinge as plantações de *G. hirsutum* é a Doença Azul do Algodoeiro, ou “Cotton Blue Disease”, causada pelo *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV). Esse vírus pertence à família *Luteoviridae*, sendo transmitido através do pulgão *Aphis gossypi* e de replicação estrita ao floema da planta, é do gênero *Polerovirus* e possui capa protéica icosaédrica não-envelopada. Seu genoma é de RNA fita-simples polaridade positiva (ssRNA+), possui um

tamanho de aproximadamente 6 Kb, não há presença de cauda de poliadenina e apresenta seis ‘Open Reading Frames’. A ORF 0 corresponde ao gene que codifica a proteína P0, responsável pela supressão do silenciamento pós-transcricional (Pfeffer et al., 2002) que impede a defesa antiviral por silenciamento de RNA. As ORFs 1 e 2 codificam as proteínas P1 e P2 que estão vinculadas a replicação viral e, caso sejam traduzidas juntas, codificam uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Reutenauer et al., 1993). A ORF3 origina a proteína do capsídeo viral (CP), enquanto a ORF 3a codifica uma proteína de movimento a longa distância que induz infecções sistêmicas e não é iniciada pelo start códon AUG (Smirnova et al., 2015). A ORF 4 codifica uma proteína de movimento disseminadora de vírions para as células adjacentes e a ORF 5 codifica a proteína *readthrough-protein*, capaz de viabilizar a transmissão viral pelo afídeo. As ORFs 3a, 3, 4 e 5 originam proteínas a partir da formação de RNA subgenômico, que é guiado por elementos regulatórios presentes na região intergênica (Tacke et al., 1991) (Figura 5).

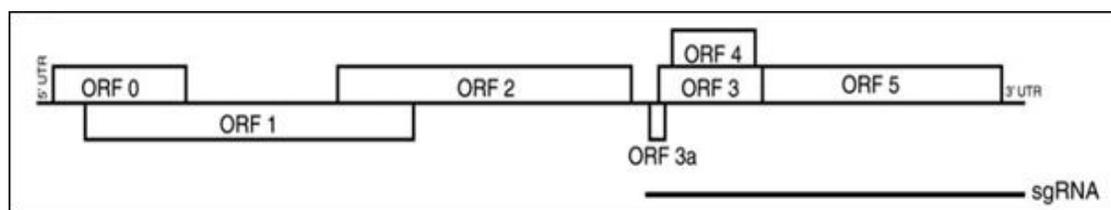


Figura 5 - Esquema do genoma do CLRDV. A linha superior indica o RNA genômico, constituído pelas ORFs 0, ORF1, ORF2, ORF3a, ORF3, ORF4 e ORF5. A linha inferior indica o RNA subgenômico, que permite a síntese das proteínas codificadas pelas ORFs 3a, 3, 4 e 5 (Rodrigues, 2019).

Com o estabelecimento da replicação viral no floema vegetal, o algodão começa a apresentar os sintomas da Doença Azul em aproximadamente 18 dias após o contato com o afídeo. Dentre esses sintomas, são descritos a rugosidade, encurtamento dos entrenós, nanismo, clareamento das nervuras e escurecimento das folhas mais velhas (Figura 6). Pode ocorrer ainda o avermelhamento foliar. Quanto a gravidade da sintomatologia, a intensidade da infecção varia de acordo com o estado fisiológico da planta, mostrando ser mais severo quando o algodão é infectado em estágios iniciais de crescimento (Costa, 1998).



Figura 6 - Alguns dos sintomas provocados pela doença azul do algodoeiro. (A) Encurtamento dos internódios, levando ao nanismo. (B) Rugosidade e curvatura para baixo dos bordos foliares. Adaptado de docplayer e fitopatologiaifmt, respectivamente.

A espécie de algodão comercial *G. hirsutum* apresenta variantes (cultivares) suscetíveis e resistentes à DA. Apesar do atual uso preferencial das variedades resistentes, as suscetíveis ainda são utilizadas por possuírem um alto potencial produtivo (Santos, 1999). Devido a relevância da variedade resistente à DA para a cotonicultura, foram feitos estudos para a identificação de marcadores moleculares deste fenótipo e Fang e colaboradores em 2010 definiram a localização do locus R que condiciona o fenótipo resistente. Foram identificados marcadores do tipo microsatélite/ SSR e, posteriormente, marcadores do tipo SNP. Os SNP's flanquearam o locus alvo com precisão de aproximadamente 100%, sendo esse denominado *Rghv1* ou *Cbd* (Junior et al., 2008). Essa região foi mapeada no cromossomo 10 de *G. hirsutum*.

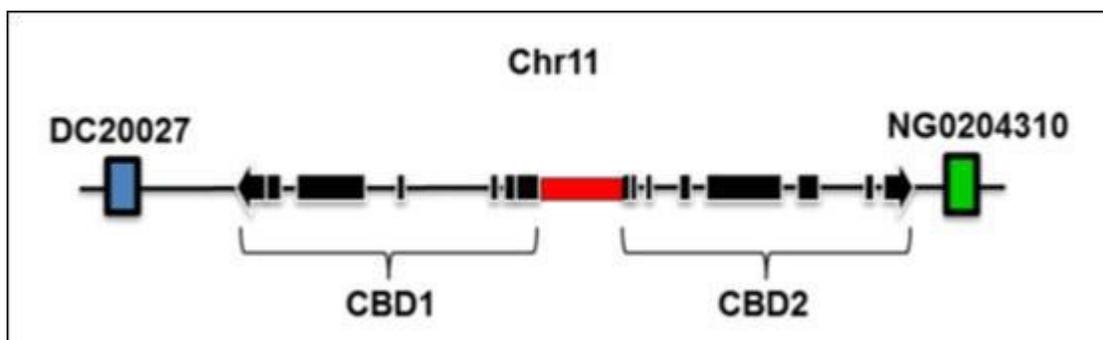


Figura 7 - Esquema do cromossomo 11 de *G. raimondii*. Nas extremidades, os marcadores DC20027 e NG0204310 flanqueando os genes *CBD1* e *CBD2* que são regulados pelo mesmo promotor (caixa em vermelho). As linhas correspondem aos íntrons e as caixas pretas correspondem aos éxons. Adaptado de Rodrigues, 2019.

Com o sequenciamento do genoma de *G. raimondii*, que é parental de *G. hirsutum*, nosso grupo identificou a presença de duas ORFs na região do locus *Cbd*, que nessa espécie se encontra no cromossomo 11 (Figura 7). Essas duas ORFs, denominadas *CBD1* e *CBD2*, compartilham uma mesma região promotora que permite a transcrição de ambas em orientações opostas. Através de buscas por sequências correspondentes à essas ORFs em bancos de dados, foi possível analisar que o gene *CBD1* não apresentava domínios conservados. Porém, em uma pesquisa no programa BLAST NCBI (National Center for Biotechnology Information), foi feito o alinhamento com 100% de cobertura, 98% de identidade e e-value de 0.0 desta com uma proteína receptora de lipoproteína de baixa densidade (LDL) presente no locus de resistência à DA de *G. arboreum*. Já o gene *CBD2* apresentou dois domínios da proteína arginil t-RNA transferase (ATE).

1.5 Potato virus X e Tobacco rattle virus

O fitopatógeno *Potato virus X* (PVX) pertence à família *Alphaflexiviridae* e ao gênero *Potexvirus*, é transmitido mecanicamente e tem como hospedeiro natural a batata (*Solanum tuberosum*). Possui simetria helicoidal, não é envelopado e tem um genoma de RNA fita-simples com polaridade positiva (ssRNA+) de aproximadamente 6,4Kb. Esse genoma viral possui um cap na extremidade 5', cauda poli A na extremidade 3' e apresenta cinco ORFs (Figura 8). A ORF1

(RdRp) codifica a RNA polimerase e a ORF2 (TGB1) codifica a proteína do movimento e de supressão do silenciamento. As ORFs 3 (TGB2) e 4 (TGB3) também correspondem à proteína do movimento, enquanto a ORF5 (CP) codifica a proteína do capsídeo viral. Apenas a ORF1 é expressa por meio de RNA genômico, sendo as demais expressas através da síntese de RNAs subgenômicos, além de TGB3 ser expressa através de um “leaky scanning” do mRNA subgenômico de TGB2. Portanto, por ser estruturalmente conhecido, além de facilmente manipulável, esse vírus tem sido utilizado no desenvolvimento de diversos vetores de expressão viral no ramo da biotecnologia (Lico, et al., 2015).

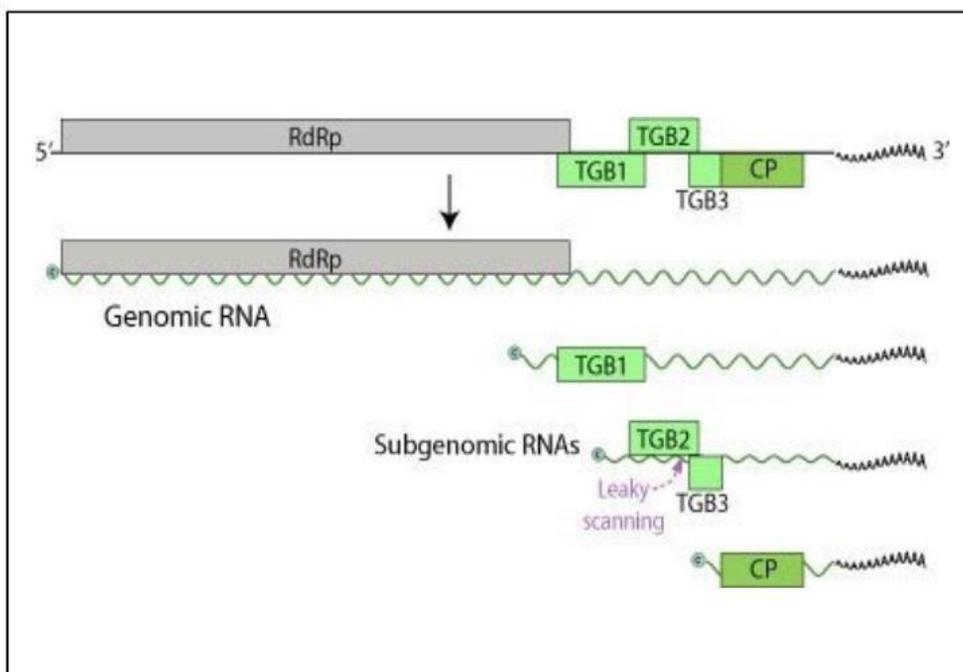


Figura 8 - Esquema do genoma de *Potato virus X* contendo cinco *Open Reading Frames* (ORF). A ORF1 corresponde à RdRp e as ORFs 2, 3 e 4 correspondem à TGB1, TGB2 e TGB3, respectivamente. Por fim, a ORF5 corresponde à CP. Adaptado de Viralzone.

A batata é o quarto alimento mais importante do mundo. Esse vegetal é atingido por viroses como, por exemplo, a provocada por PVX, que tem como sintomas o mosaico suave, necrose, enrugamento e atrofiamento (Figura 9). Quando em sinergia com *Potato virus Y* (PVY),

esses sintomas são agravados e podem causar perdas acima de 50% da produção (Silva et al., 2005). Entretanto, há genes que condicionam o fenótipo de resistência ao PVX em cultivares de *S. tuberosum* e, de acordo com a interação entre os mecanismos de defesa e o vírus, são determinados os grupos das estirpes virais (Cruz & Baulcombe, 1995). Sendo assim, o gene *Nb* induz resistência contra os grupos 1 e 2, enquanto o gene *Nx* induz contra os grupos 1 e 3 (Silva et al., 2005). O grupo 4 não ativa os genes *N* de hipersensibilidade, mas promove a ativação do gene *Rx* através de CP (Verchot-Lubicz et al., 2007). No locus *Rx1* está localizado o gene que codifica uma proteína CC-NBS-LRR, responsável por gerar a redução desses vírus nas folhas e protoplastos (Bendahmane et al., 2015).

Assim como PVX, *Tobacco rattle virus* (TRV) é utilizado na área da biotecnologia como vetor de expressão viral (Macfarlane, 2010). Esse vírus pertence à família *Virgaviridae*, gênero *Tobravirus* e é capaz de infectar mais de 400 espécies vegetais. É naturalmente transmitido por meio de vetores nematóides da família *Trichodoridae*, mas também é passível a transmissão mecânica e através de sementes. Os sintomas causados por essa virose variam de acordo com o hospedeiro, podendo ser graves em diversas plantas ornamentais e hortaliças, mas normalmente incluem manchas e necroses locais e sistêmicas (Figura 9). Seu genoma é bipartido, composto de dois RNA fita-simples polaridade positiva (ssRNA+), denominados RNA-1 e RNA-2 (Figura 10). No RNA-1 são codificadas a RNA polimerase (RdRp), a proteína do movimento (MP) e uma proteína rica em cisteína (VSR) de função ainda não identificada. Já no RNA-2, são codificadas a proteína do capsídeo viral (CP) e duas proteínas não-estruturais (P40 e P32) (Zaidi & Mansoor, 2017). As proteínas MP, VSR, P40 e P32 são expressas por meio de RNAs subgenômicos. Além disso, a RNA polimerase é traduzida através da supressão de finalização da ORF1.



Figura 9 - Alguns dos sintomas das viroses causadas por *Potato virus X* e *Tobacco rattle virus* em *Nicotiana benthamiana*. (A) Mosaico suave causado por PVX. Adaptado de Aguilar et. al, 2016. (B) Mosaico e necrose causados por TRV. Adaptado de Ephytia.

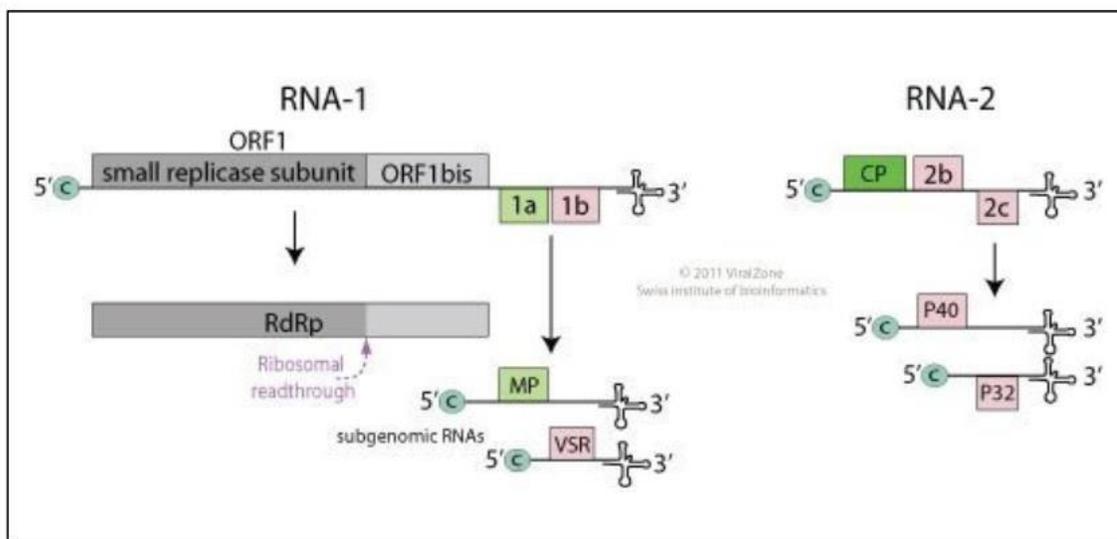


Figura 10 - Esquema do genoma bipartido de *Tobacco rattle virus*. Este é dividido em RNA-1, contendo as ORFs que expressam as proteínas RNA polimerase (RdRp), MP e VSR, e em RNA-2, contendo as ORFs que expressam as proteínas CP, P40 e P32. Adaptado de Viralzone.

2 JUSTIFICATIVA

A resistência frente aos fitopatógenos é um processo fisiológico vegetal amplamente estudado e que comporta diversos mecanismos. Entender os mecanismos e vias envolvidos na resistência a vírus pode contribuir para a mitigação de severas perdas agrícolas associadas a estes patógenos. Nosso grupo tem realizado estudos com o intuito de compreender o mecanismo de resistência de algodoeiro ao CLRDV. Durante um pós-doutorado no nosso laboratório em 2012, o Dr. Elisson Romanel localizou os marcadores moleculares determinados por Fang e colaboradores (2010) no genoma de *G. raimondii* e no de *G. hirsutum*. Esse feito possibilitou a identificação do locus de resistência *Cbd* e dos genes *CBD1* e *CBD2*. Com isso, após a amplificação, sequenciamento e alinhamento desses genes, foi descrito por Fausto (2016) que a proteína codificada em *CBD2* possui homologia com a arginil t-RNA transferase (ATE) presente na planta *Arabidopsis thaliana*. A indução de ATE em *Arabidopsis* foi relatada em ensaios de infecção por bactéria e fungos, levando à ativação de vias de defesas mediadas pelo JA e por glucosinolatos (Marchi et al., 2016).

Após a identificação da presença de ATE no locus de *R* à *DA*, estudos do nosso grupo mostraram que a repressão de ATE está associada à susceptibilidade de algodão ao CLRDV. Além disto, plantas de *Arabidopsis 35S:ATE* superexpressando ATE são resistentes ao CLRDV (Fausto 2016; Moura 2018; Fausto et al., em redação).

Tendo em vista os dados obtidos acerca da expressão de ATE durante a infecção por CLRDV, é possível afirmar que essa proteína está relacionada ao estabelecimento da resistência frente a este vírus. Sendo ATE membro da via *N-end rule* de degradação pelo proteassoma, ela pode participar de um potencial mecanismo de defesa antiviral em plantas ainda desconhecido. Portanto, se torna relevante estudar se a via mediada por ATE pode estar relacionada a resistência a outros vírus vegetais ou está restrita apenas a interações com o CLRDV.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho busca avaliar se a superexpressão de arginil t-RNA transferase (ATE) torna a planta modelo *Arabidopsis thaliana* resistente à infecção por outros vírus ou é restrita ao *Cotton leafroll dwarf virus*.

Objetivos específicos:

- a) Infectar plantas de *Arabidopsis* wt (selvagens) e transgênicas *35S:ATE1*, superexpressando ATE, com PVX e TRV;
- b) Avaliar se PVX e TRV apresentam espalhamento sistêmico nas plantas *35S:ATE1* e/ou nas plantas selvagens;
- c) Avaliar os níveis de replicação de PVX e TRV em *Arabidopsis 35S:ATE1* e selvagem por RT-qPCR;
- d) Avaliar se os níveis de expressão de *AtATE1* se alteram durante a infecção pelo PVX e pelo TRV em plantas de *Arabidopsis* selvagens.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

As sementes de *A. thaliana* transgênicas para a superexpressão do gene *AtATE1* (*35S:ATE1*) foram obtidas através da colaboração com a Dra. Emannelle Graciet (Trinity College Dublin, Irlanda). As plantas *35S:ATE1* foram chamadas de SE. Além dessas, foram utilizadas sementes selvagens de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia Col-0 (wt).

Para a esterilização das sementes, estas foram submetidas ao álcool 70% por cinco minutos sob agitação. Posteriormente, foram colocadas em álcool 100% por aproximadamente um minuto em modo estático.

As sementes de *A. thaliana* wt e *35S:ATE1* foram germinadas em meio de cultura sólido MS (Murashige & Skoog Salt Mixture, Sigma Co.). Esse meio é rico em sais minerais, sendo um indutor da morfogênese vegetal. Para a quebra de dormência das sementes, a placa ficou em câmara escura a 4°C por três dias, seguido de uma semana a 22°C em dias curtos (8 h de luz/16 h de escuro) com lâmpada LED Full Spectrum 600w. Após a germinação, as plântulas foram transplantadas para substrato _‘MecPlant‘_:vermiculita, onde ficarão por 30 dias a 22°C em condições de luminosidade de dias curtos.

4.2 Inóculos virais por agroinoculação

4.2.1 Cepas de Agrobactérias

Para os ensaios de infecção com *Potato virus X* (PVX) e *Tobacco rattle virus* (TRV) foram utilizadas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* contendo vetores binários com os genomas de ambos os vírus. As agrobactérias que expressam PVX foram cedidas em colaboração com o Dr. Cristiano Lacorte, Embrapa Cenargen, DF.

No processo de transformação genética de plantas podem ser empregados dois tipos de vetores - os binários e os co-integrados. No sistema binário, os genes de interesse presentes na região-T são clonados em plasmídeos independentes do plasmídeo Ti. Já no sistema co-integrado, é feito um processo de recombinação para que os genes de interesse se integrem ao plasmídeo Ti

(Sartoretto et al., 2008). Os vetores que foram utilizados no presente estudo são do tipo binário e os genomas dos vírus estão conjugados à proteína verde fluorescente (‘Green Fluorescent Protein’ – GFP), sendo esta expressa na célula vegetal junto a replicação viral após o estabelecimento da transformação transiente nestas células.

Os mapas dos T-DNAs mostrando as construções de PVX e TRV constam nas figuras 11 e 12, respectivamente. Devido ao fato do genoma do TRV ser bipartido, os vetores com os dois segmentos genômicos (RNA-1 e RNA-2) foram inseridos em cepas distintas e inoculadas em proporção 1:1 no momento da agroinfiltração.

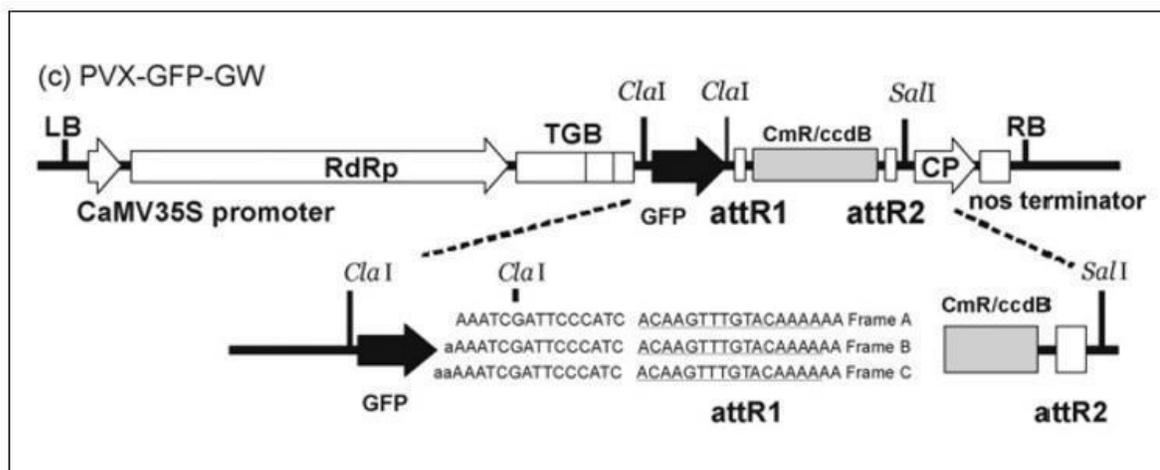


Figura 11 - Esquema da construção de PVX clonado em vetor binário de *A. tumefaciens*. Nesse vetor, há a região promotora (CaMV35S), o gene que codifica a RNA polimerase (RdRp), o gene que codifica a proteína de movimento (TGB), as extensões ClaI, o gene para GFP, as sequências attR e o gene que codifica a proteína do capsídeo viral (CP). LB e RB são bordas esquerda e direita do T-DNA, região que será inserida no genoma da célula vegetal transformada. Adaptado de Lacorte (2009).

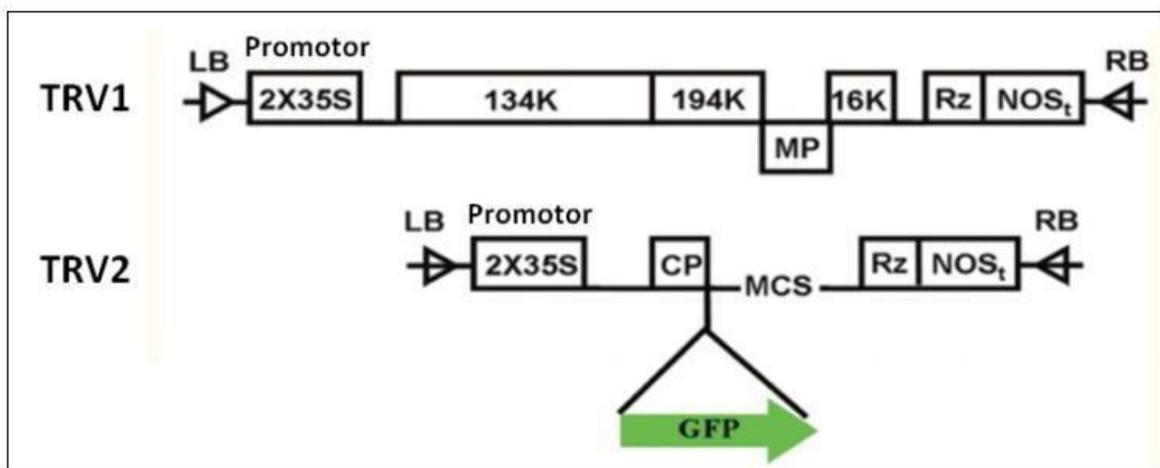


Figura 12 - Esquema das construções de TRV (TRV1/RNA1 e TRV2/RNA2) clonadas em vetores binários de *A. tumefaciens*. Em TRV1, há a região promotora (2X35S, aonde o promotor 35S de CaMV está duplicado), as ORFs que codificam a replicase pela transcrição *read-through* (134Kb e 194Kb), a ORF que codifica a proteína do movimento (MP), a região que codifica a proteína supressora do silenciamento (16Kb), o gene de resistência (Rz) e a porção terminal (NOS_t). Em TRV2, também há a região promotora (2X35S), o gene da proteína do capsídeo viral (CP) com GFP conjugado e uma região para possível inserção de genes (MCS). LB e RB são bordas esquerda e direita do T-DNA, região que será inserida no genoma da célula vegetal transformada. Adaptado de Moura (2018).

4.2.2 Ensaio de Infecção com *Potato virus X* e *Tobacco rattle virus*

Os ensaios de infecção em *N. benthamiana* e *A. thaliana* com *Potato Virus X* (PVX) e *Tobacco rattle virus* (TRV) foram feitos através da técnica de agroinfiltração, utilizando as cepas de *Agrobacterium tumefaciens* descritas no tópico 4.2.1.

A proteína p19 é uma supressora do silenciamento gênico e por isso promove um melhor espalhamento viral. Sendo assim, agrobactérias contendo a sequência codificadora dessa proteína também foram agroinfiltradas em proporção 1:1 com as bactérias contendo os construtos para PVX e TRV.

O protocolo de agroinfiltração utilizado consiste, primeiramente, em semear por esgotamento em meio LB sólido (Luria Bertani) o inóculo de células bacterianas transformadas. Nesse meio de cultivo, haviam os antibióticos para a marca de seleção, sendo eles Rifampicina (2µl/mL), Canamicina (1µl/mL) e Gentamicina (1µl/mL) para a cepa de *A. tumefaciens* contendo a sequência de p19 e apenas Rifampicina para a que contém a sequência de PVX. Após

incubação de 48 h a 28°C, as colônias isoladas selecionadas foram coletadas com o auxílio de uma alça de transferência e inoculadas por 24 h, 28°C a 200rpm em meio LB líquido contendo os antibióticos anteriormente relatados. Para a averiguação da densidade óptica (DO) a 600nm, esses cultivos foram centrifugados por quinze minutos a 4.000 rpm e os pellets formados ressuspensos com 5 mL de tampão de agroinfiltração (MES 1M, MgCl₂ 1M, acetoseringona 150 µM e água *Milli-Q*®). Em seguida, 1 mL dessa solução foi adicionada em uma cubeta e direcionada ao espectrofotômetro. Considerando que o branco é determinado pelo tampão de agroinfiltração puro, a DO (ajustada para 600 nm) foi igual a 1 com desvio aceito de até 0,5. Por fim, as culturas ficaram em contato com o tampão por no mínimo 2 horas e máximo 24 horas antes da agroinoculação.

Três folhas por plantas wt e transgênicas *35S:ATEI*, com 30 dias, foram agroinfiltradas. Com 6 dpi, as plantas foram visualizadas em luz ultravioleta para o acompanhamento do espalhamento viral através da expressão de GFP. Logo após, as folhas inoculadas e sistêmicas foram coletadas separadamente e colocadas imediatamente no nitrogênio líquido. Por fim, estas foram armazenadas no freezer -80 °C até o momento da extração de ácido nucléico.

4.3 Extração de RNA e Transcrição Reversa (RT)

Para a extração de RNA total das amostras coletadas, estas foram maceradas em nitrogênio líquido em contato com TRIZOL (Ambiom, Life Technologies Co.) seguindo o protocolo comercial do reagente. Aspectos como grau de pureza, concentração das moléculas por µl e a qualidade da extração de RNA foram analisados utilizando o NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific Co.). Ainda, para que fosse avaliada a qualidade do RNA, este foi submetido à corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

A transcrição reversa (RT) de RNA para a formação de c-DNAs foi realizada com a enzima SuperScript IV (Invitrogen). Para a RT nas amostras infectadas por PVX e TRV foi utilizado 100 µM do primer Oligo dT.

4.4 Análise da Expressão dos Genes das Proteínas de PVX e TRV por qPCR

O produto da transcrição reversa (c-DNA) foi usado para a amplificação de genes específicos correspondentes aos vírus que foram utilizados no presente estudo. Sendo assim, o diagnóstico de PVX e TRV foi feito por meio de PCR em tempo real. O par de primers (tabela 2) para PVX se anela a uma região da ORF 3 do genoma desse vírus (correspondente a proteína TGB2), resultando em um amplicon de 132 bp. Os primers para TRV anelam em uma região do gene que codifica a proteína do capsídeo viral, gerando um amplicon de 400 bp. Esse gene está presente no c-DNA proveniente do RNA-2.

Tabela 2 – Alvos da amplificação e os oligonucleotídeos correspondentes.

Alvo	Sequência
PVX F	5'-ATTTGGGACCAGCAACAGAG-3'
PVX R	5'-ATGCTGATTTTCGGTACTCC-3'
TRV-2 CPF	5'-CTGGCTTACTAGCGGCACTGAATA-3'
TRV-2 CPR	5'-TCCACCAAACCTTAATCCCGAATAC-3'

F – Forward, R – Reverse.

4.5 Análise da Expressão de Arginil t-RNA Transferase por qPCR

Para a amplificação por PCR em Tempo Real do gene *Atate1*, foi utilizado o kit Maxima™ SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix (Fermentas Co.) e as reações foram feitas em placas de 96 poços. O termociclador utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems Co.). Além disso, os pares de oligonucleotídeos para o gene *Atate1* constam na tabela 3, assim como os dos genes constitutivos *AtFBox* (codifica a proteína da família F-Box) e *AtEF1a* (codifica o Fator de Elongação 1a). A qPCR foi feita através do método comparativo de C_T , $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Schmittgen & Livak, 2008).

Tabela 3 – Pares de oligonucleotídeos forward (F) e reverse (R) dos genes *Atate1*, *AtFBox* e *AtEF1a*.

Gene	Sequência
<i>Atate1</i> F	5'-TAAAACGTGTTGCCCTCCTT-3'
<i>Atate1</i> R	5'-TTGCCATCCAAGAACCTTTC-3'
<i>AtFBox</i> F	5'-GGCTGAGAGGTTTCGAGTGTT-3'
<i>AtFBox</i> R	5'-GGCTGTTGCATGACTGAAGA-3'
<i>AtEF1a</i> F	5'-CACCACTGGAGGTTTTGAGG-3'
<i>AtEF1a</i> R	5'-TGGAGTATTTGGGGGTGGT-3'

4.6 Análise Estatística

As curvas de *melting* das reações de qPCR foram analisadas com o auxílio do programa 7500 Fast Real Time qPCR, além dos programas Excel e PRISM 8 para auxiliar na análise dos dados. As expressões gênicas por RT-qPCR foram analisadas usando os testes comparativos Two-Way Anova e Tukey. O nível de significância estabelecido foi de 95% ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de Infecção em *Arabidopsis thaliana* com *Potato virus X* e *Tobacco rattle virus*

Afim de infectar as plantas de *Arabidopsis thaliana*, foram feitos inicialmente testes onde estas foram submetidas à infecção mecânica de PVX utilizando folhas de *Nicotiana benthamiana* infectadas com o vírus. Para isso, três folhas de cada uma das duas *N. benthamiana* utilizadas no experimento como fonte de PVX foram agroinfiltradas por PVX-GFP por meio do método citado no tópico 4.2.2. Com 6 dpi, as plantas foram observadas em luz ultravioleta (UV), sendo possível visualizar o espalhamento do vírus nas folhas agroinoculadas por meio da expressão de GFP (figura 13). Após o estabelecimento do espalhamento sistêmico (figura 14), as folhas foram coletadas e utilizadas em um macerado de 1g de folha para 9 mL de tampão fosfato como fonte de inóculo de *A. thaliana*. Três folhas de cada *Arabidopsis thaliana* wt e SE foram infectadas mecanicamente com 30 dias de crescimento em substrato, sendo submetidas ao abrasivo e, em seguida, ao macerado. As plantas foram visualizadas em luz UV com 6, 9 e 14 dpi mas não foi possível visualizar a expressão de GFP.



Figura 13 – Folhas de *N. benthamiana* inoculadas através de ensaio de agroinfiltração para infecção com *Potato virus X* (PVX-GFP). As plantas foram visualizadas em luz visível (primeira e terceira linhas) e em luz ultravioleta (UV) (segunda e quarta linhas). Na presença da luz UV, é possível observar o espalhamento viral (sinalizado pela seta amarela) nas folhas agroinfiltradas (halo da inoculação sinalizado pela seta vermelha) por conta da presença da GFP conjugada ao genoma do vírus.

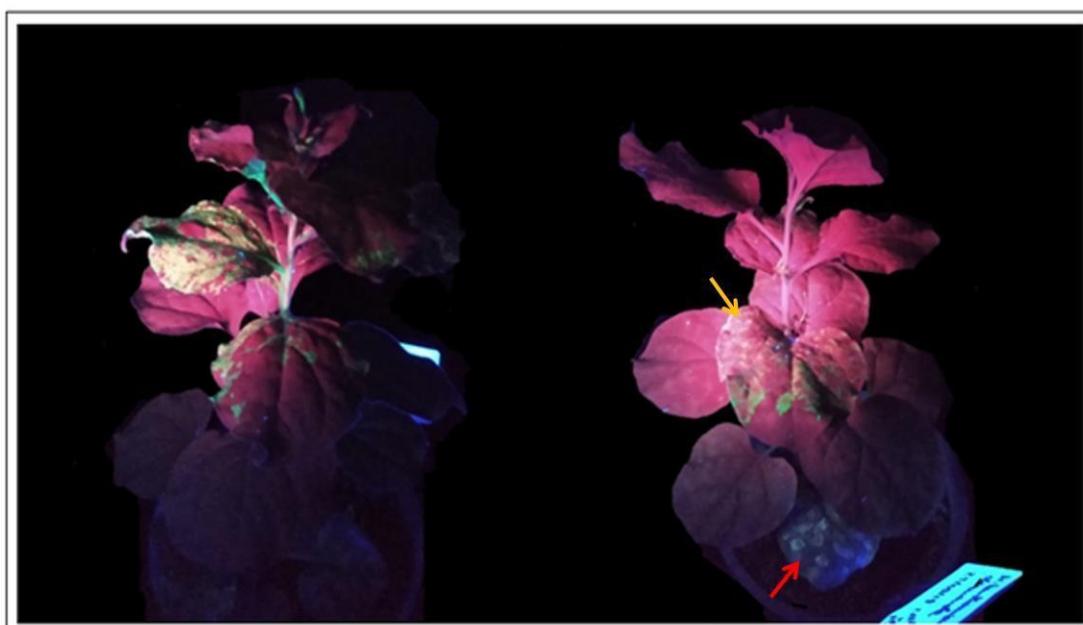


Figura 14 – Ensaio de infecção com *Potato virus X* em *Nicotiana benthamiana*. Na presença de luz ultravioleta, é possível visualizar o espalhamento viral sistêmico (sinalizado pela seta amarela) por conta da GFP conjugada ao genoma do vírus. A seta vermelha sinaliza uma folha inoculada.

Após 14 dias de infecção, mesmo com a ausência da expressão de GFP, as folhas de *A. thaliana* inoculadas e sistêmicas foram coletadas e armazenadas no freezer -80 °C. Posteriormente, foi feita a extração de RNA e RT-PCR. O cDNA obtido foi submetido a duas amplificações pela PCR. Na primeira, foram utilizados oligonucleotídeos para amplificar o gene que codifica a proteína F-box, sendo essa constitutiva da planta. Na segunda reação, foram utilizados primers específicos para PVX, descritos na tabela 2. Os produtos das duas amplificações foram submetidos à corrida de eletroforese em gel de agarose 1,5%. O controle positivo da PCR para F-box foi uma amostra de cDNA de *A. thaliana* que já havia dado positivo para esse gene. Já o controle positivo usado na PCR para PVX foi o cDNA da *N. benthamiana* que expressou GFP. O amplicon esperado na reação da PCR para F-box é de 400 bp, enquanto o da amplificação de PVX é de 132 bp. O controle negativo utilizado foi água Milli-Q® autoclavada. Como resultado, houve amplificação de F-box (dados não mostrados) mas não de PVX (figura 15), confirmando que a infecção mecânica de *Arabidopsis* com PVX-GFP a partir de folhas de *N. benthamiana* infectadas não foi bem sucedida.

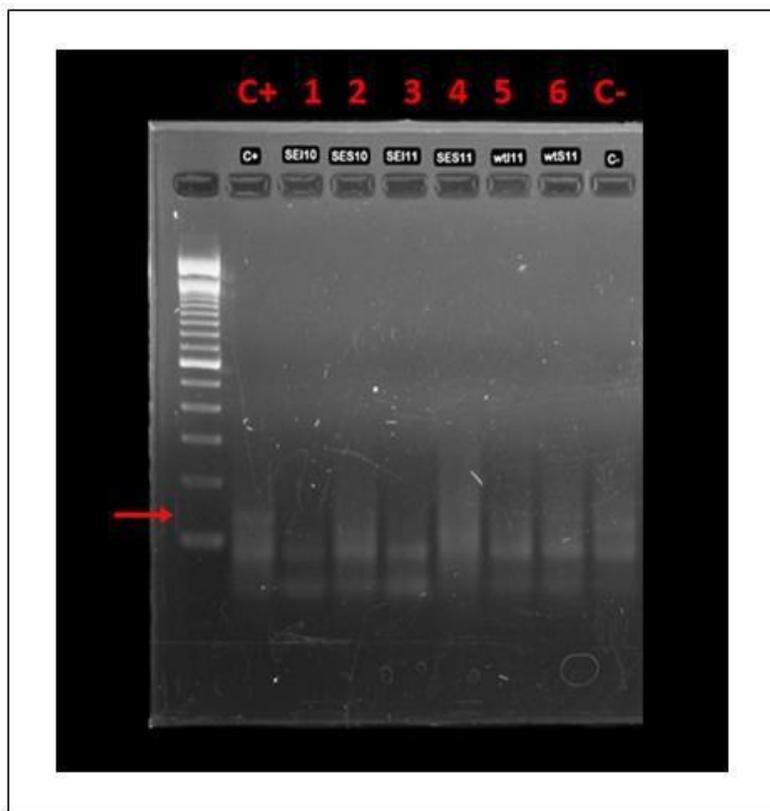


Figura 15 - Resultado da PCR para PVX em gel de agarose a 1,5% revelado em luz ultravioleta. A seta vermelha sinaliza o amplicon de 132 bp da PCR para PVX, que foi positivo apenas para a amostra de *N. benthamiana* agroinoculada com o vírus citado, sendo essa utilizada como controle positivo (C+). Como controle negativo (C-) da reação, foi usada água *Milli-Q*® autoclavada. Amostras 1 - SE I 10, 2 - SE S 10, 3 - SE I 11, 4 - SE S 11, 5 - wt I 11 e 6 - wt S 11. O padrão molecular utilizado foi de 100 bp (Thermo Scientific Co.).

Mediante aos resultados negativos da infecção mecânica, foi empregado o protocolo de agroinfiltração de PVX diretamente em arabidopsis que consta no tópico 4.2.2. Com 6 dpi, as plantas foram visualizadas em luz UV e as selvagens (wt) apresentaram fluorescência emitida por GFP tanto nas folhas agroinoculadas como nas folhas sistêmicas, indicando que o PVX conseguiu se replicar e espalhar pela planta (figura 16). Nas plantas SE, entretanto, apenas foi possível visualizar GFP nas folhas inoculadas, indicando que aparentemente o PVX não está conseguindo se espalhar sistemicamente nestas plantas.

Foram coletadas folhas sistêmicas e inoculadas de 6 plantas SE e wt e seus RNAs foram extraídos e armazenados no freezer -80 °C. Posteriormente, as amostras SE S 1-3, SE I 1-3, wt I 1-3 e wt S 1-3 foram submetidas à transcrição reversa e às amplificações. Entretanto, não foi obtida amplificação do fragmento TGB de PVX em nenhuma destas amostras. Da mesma

forma, não foi obtida amplificação do gene endógeno F-box utilizando-se os c-DNA obtidos (dados não mostrados). Isto indica que os RNAs apresentavam baixa qualidade. Foram realizados protocolos para limpeza dos RNAs, e em seguida novas amplificações. Porém ainda assim não ocorreu amplificação nem de F-box e nem de PVX.

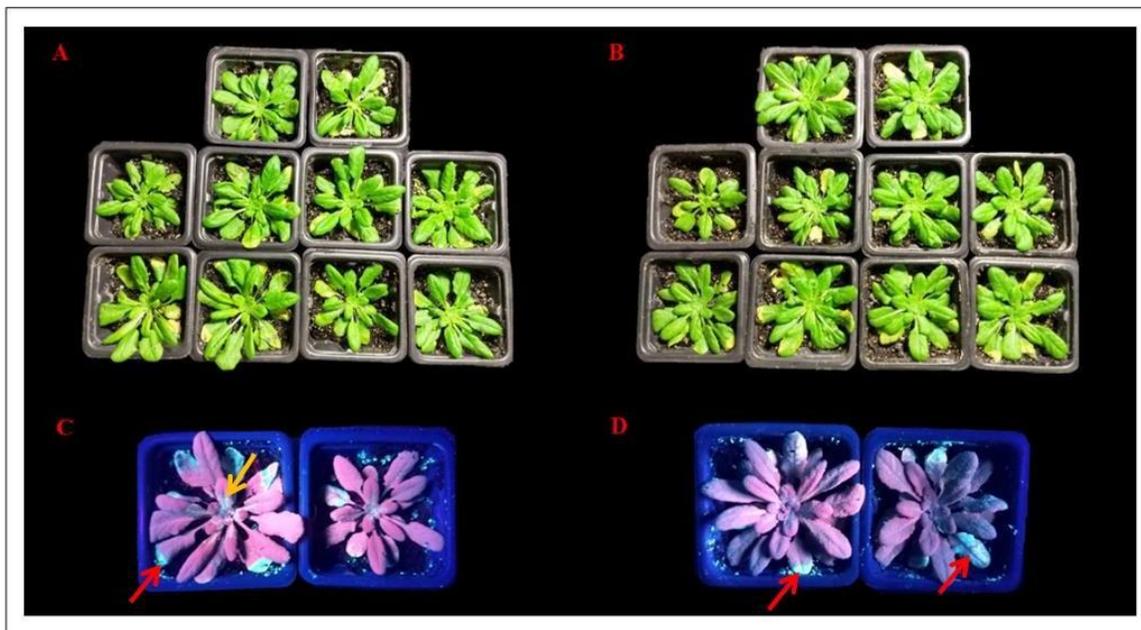


Figura 16 – *Arabidopsis thaliana* infectadas com PVX por agroinfiltração. (A) Plantas wt com 6 dpi visualizadas em luz visível. (B) Plantas SE com 6 dpi visualizadas em luz visível. (C) Plantas wt visualizadas em luz UV. As regiões em vermelho correspondem à clorofila, enquanto as regiões em verde provêm da expressão de GFP. (D) Plantas SE visualizadas em luz UV. As regiões em vermelho correspondem à clorofila, enquanto as regiões em verde provêm da expressão de GFP. A seta amarela sinaliza o espalhamento viral sistêmico, enquanto as setas vermelhas sinalizam para folhas inoculadas.

Foi feito um novo experimento de agroinfiltração de PVX em *Arabidopsis* wt e SE. Além disso, também foi feita a agroinoculação de TRV, seguindo a metodologia mencionada no tópico 4.2.2.

Foram crescidas 18 *Arabidopsis* wt e 16 *Arabidopsis* SE (figura 17), sendo metade de cada variante agroinfiltrada com PVX e a outra metade com TRV após 44 dias de crescimento em substrato. Com 6 dpi, as plantas foram visualizadas em luz UV. Tanto as plantas wt como as plantas SE apresentaram expressão de GFP nas folhas inoculadas e sistêmicas, indicando que a

agroinoculação de ambos os vírus teve sucesso (figuras 18 e 19). Apesar de ser possível observar espalhamento sistêmico tanto de PVX quanto de TRV nas plantas SE, este não era tão evidente quanto o observado nas plantas selvagens. As folhas inoculadas e sistêmicas de todas as plantas foram coletadas e armazenadas separadamente no freezer -80 °C e posteriormente submetidas à extração de RNA.



Figura 17 – *Arabidopsis thaliana* com 44 dias de crescimento em substrato visualizadas em luz visível. (A) *A. thaliana* wt. (B) *A. thaliana* SE.

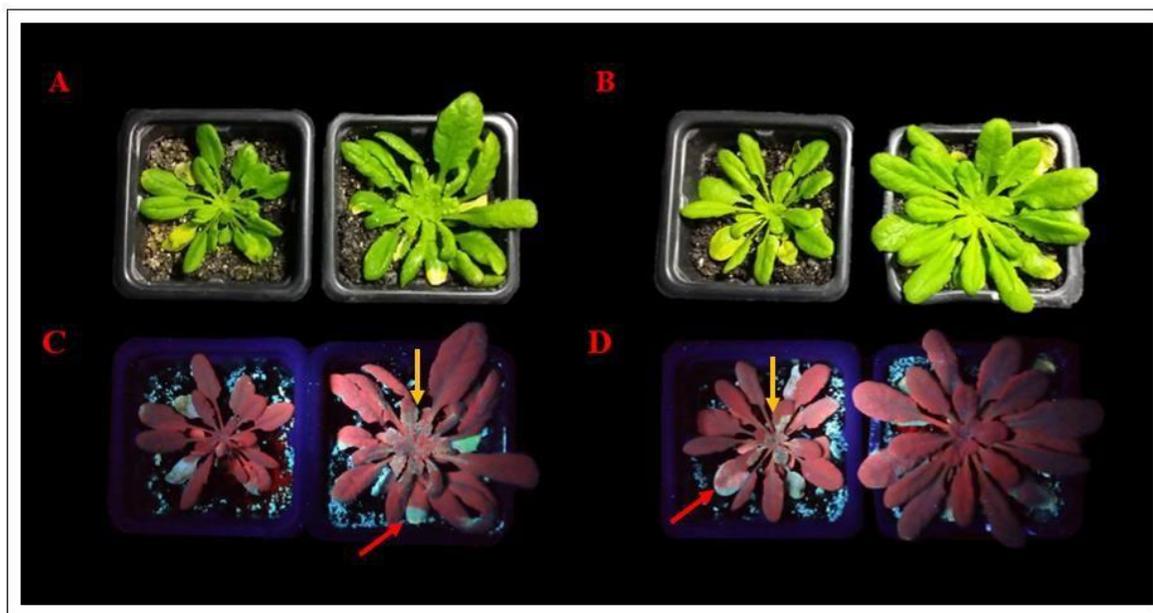


Figura 18 – *Arabidopsis thaliana* infectadas por PVX-GFP com 6dpi sob luz visível e luz ultravioleta. Em A e B, *A. thaliana* wt e SE, respectivamente, infectadas e visualizadas em luz normal. Em C e D, *A. thaliana* wt e SE, respectivamente, infectadas e visualizadas em luz UV. É possível observar a presença do vírus através das regiões em verde fluorescente por conta da GFP conjugada ao genoma viral. As setas em vermelho correspondem ao espalhamento local do vírus, onde este foi agroinoculado. As setas em amarelo correspondem ao espalhamento sistêmico.



Figura 19 – *Arabidopsis thaliana* infectadas por TRV-GFP com 6dpi sob luz visível e luz ultravioleta. Em A e B, *A. thaliana* wt e SE, respectivamente, infectadas e visualizadas em luz normal. Em C e D, *A. thaliana* wt e SE, respectivamente, infectadas e visualizadas em luz UV. É possível observar a presença do vírus através das regiões em verde fluorescente por conta da GFP conjugada ao genoma viral. As setas em vermelho correspondem ao espalhamento local do vírus, onde este foi agroinoculado. As setas em amarelo correspondem ao espalhamento sistêmico.

Os RNAs provenientes das amostras vegetais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. A intensidade de fluorescência dos rastros de RNA no gel foi o fator determinante para a escolha das triplicatas biológicas, que foram divididas conforme consta no anexo A. Estas foram quantificadas através do NanoDrop™ (Thermo Scientific Co.) (anexos B e C) e utilizadas para a formação de cDNAs que foram submetidos à amplificação por PCR em Tempo Real (qPCR).

5.2 Avaliação da suscetibilidade de plantas *35S:ATE1* ao PVX

Para a avaliação inicial de suscetibilidade das plantas transgênicas *35S:ATE1* ao *Potato virus X*, foi realizada uma qPCR em triplicatas biológica e técnica a fim de quantificar o acúmulo do vírus nas plantas. Os resultados das amplificações do gene da proteína TGB2 de PVX nas folhas inoculadas e sistêmicas de *Arabidopsis* constam na figura 20.

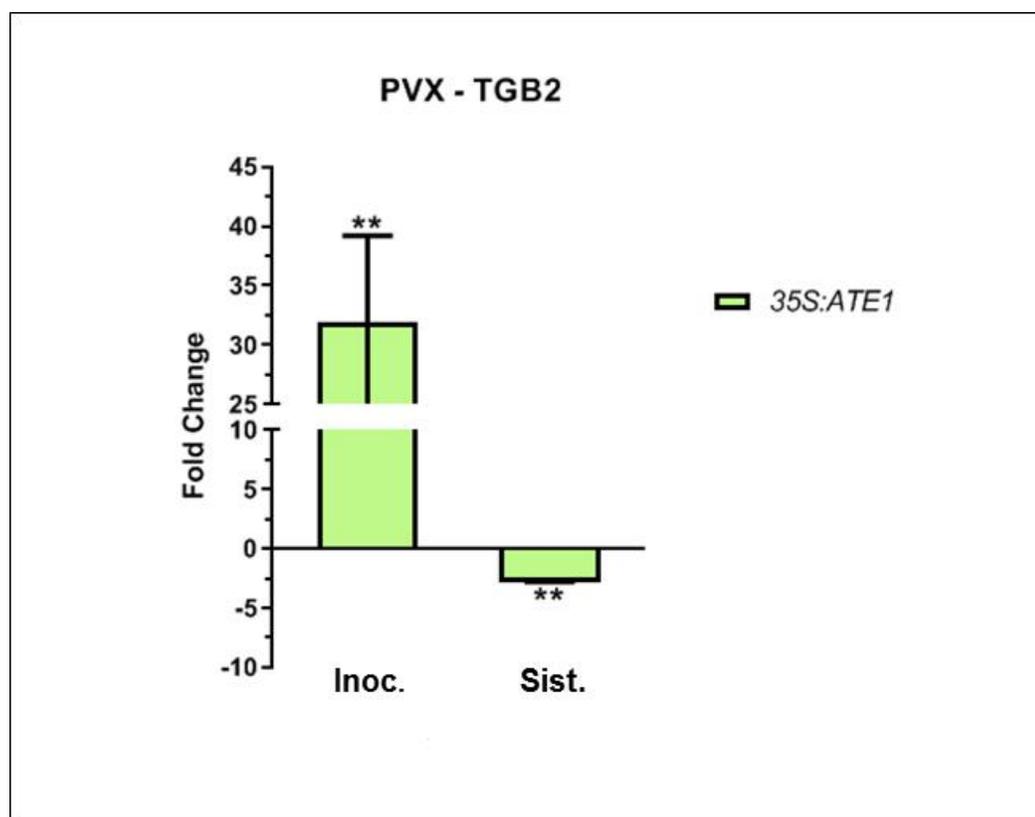


Figura 20 - Expressão do gene de TGB2 em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* infectadas por *Potato virus X* (PVX). As folhas inoculadas (Inoc.) e sistêmicas (Sist.) foram coletadas com 6dpi. A análise da expressão foi feita pelo

método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ comparando os níveis de acúmulo de PVX nas plantas SE com os níveis nas plantas wt infectadas. Os resultados estão representados em *fold change* segundo SCHMITGEN e LIVAK (2008). Análise estatística foi realizada utilizando Two-way ANOVA e teste de Tukey com $p < 0.05$. ** = $p < 0,01$.

As plantas selvagens (wt) infectadas foram utilizadas como os controles do método comparativo. Sendo assim, é possível observar que em relação às folhas inoculadas wt há um aumento de aproximadamente 32x da expressão do gene da proteína TGB2 de PVX nas amostras inoculadas transgênicas SE. Entretanto, foi observado o fenômeno oposto nas folhas sistêmicas da planta *35S:ATE1*, que apresentaram uma repressão de 2,5x na expressão desse gene viral.

Logo, os resultados indicam que a replicação de *Potato virus X* é maior em plantas que superexpressam ATE-1 do que nas plantas selvagens, porém ela parece ser inibida sistemicamente.

Com o intuito de avaliar se ocorre variação na expressão de *Atate1* durante a infecção por esse vírus, as amostras inoculadas e sistêmicas infectadas também foram submetidas a qPCR para a amplificação desse gene. Nesse caso, as plantas wt infectadas também foram utilizadas como controle. Os resultados constam na figura 21.

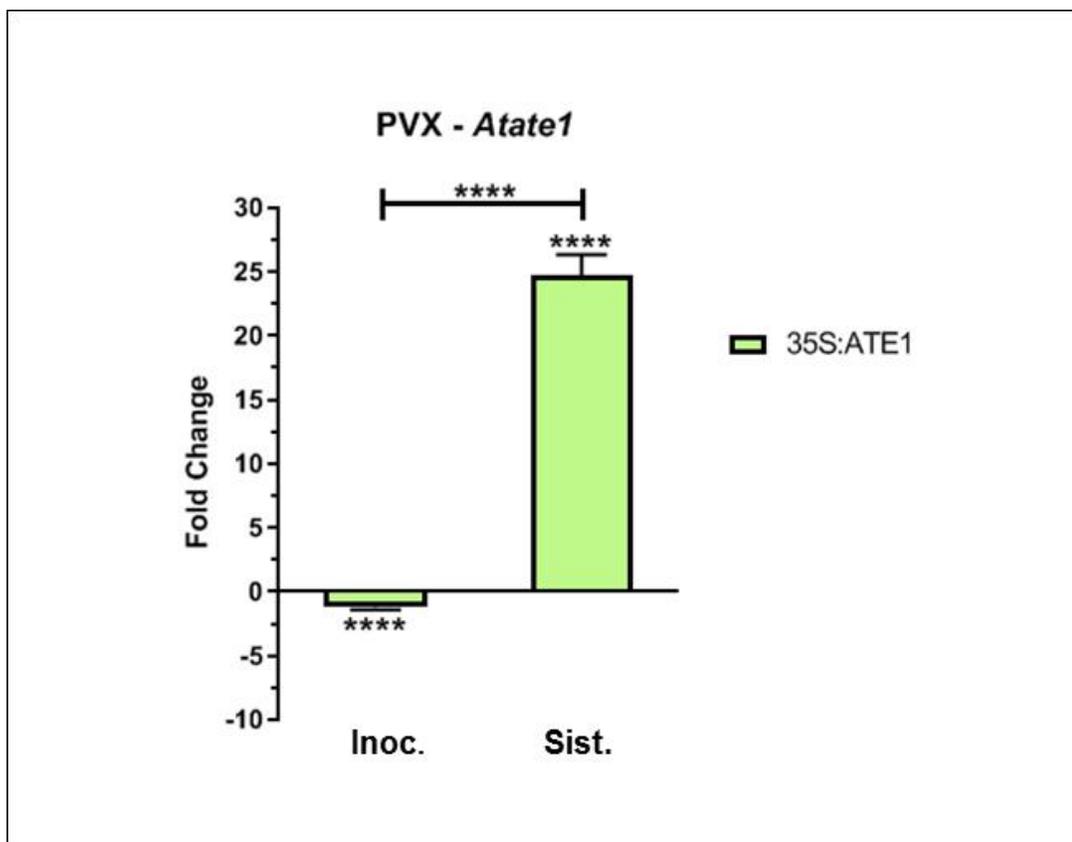


Figura 21 - Expressão do gene *Atate1* em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* infectadas por esse vírus. As folhas inoculadas (Inoc.) e sistêmicas (Sist.) foram coletadas com 6dpi. A análise da expressão foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ comparando os níveis de acúmulo de ATE-1 nas plantas SE com os níveis nas plantas wt infectadas. Os resultados estão representados em *fold change* segundo SCHMITGEN e LIVAK (2008). Análise estatística foi realizada utilizando Two-way ANOVA e teste de Tukey com $p < 0.05$.

Nas folhas submetidas a inoculação viral, o gene *Atate1* sofreu uma repressão de aproximadamente 1,5x quando comparado com as folhas selvagens inoculadas. Porém, ele foi induzido mais de 20x nas folhas sistêmicas. Curiosamente, este resultado mostra uma relação inversa ao que ocorre para o gene da proteína de PVX nessas mesmas condições de coleta. Aparentemente esta forte indução de *ate* parece ser impeditiva da replicação viral.

Tendo em vista que as plantas *35S:ATE1* apresentam normalmente uma maior expressão de *Atate1*, foi feita uma análise desse gene utilizando como controle amostras de *A. thaliana* wt e transgênicas não infectadas obtidas pelo grupo anteriormente (figura 22). Nestas, as folhas

foram coletadas com 5 dias e a separação entre inoculadas e sistêmicas não foi realizada.

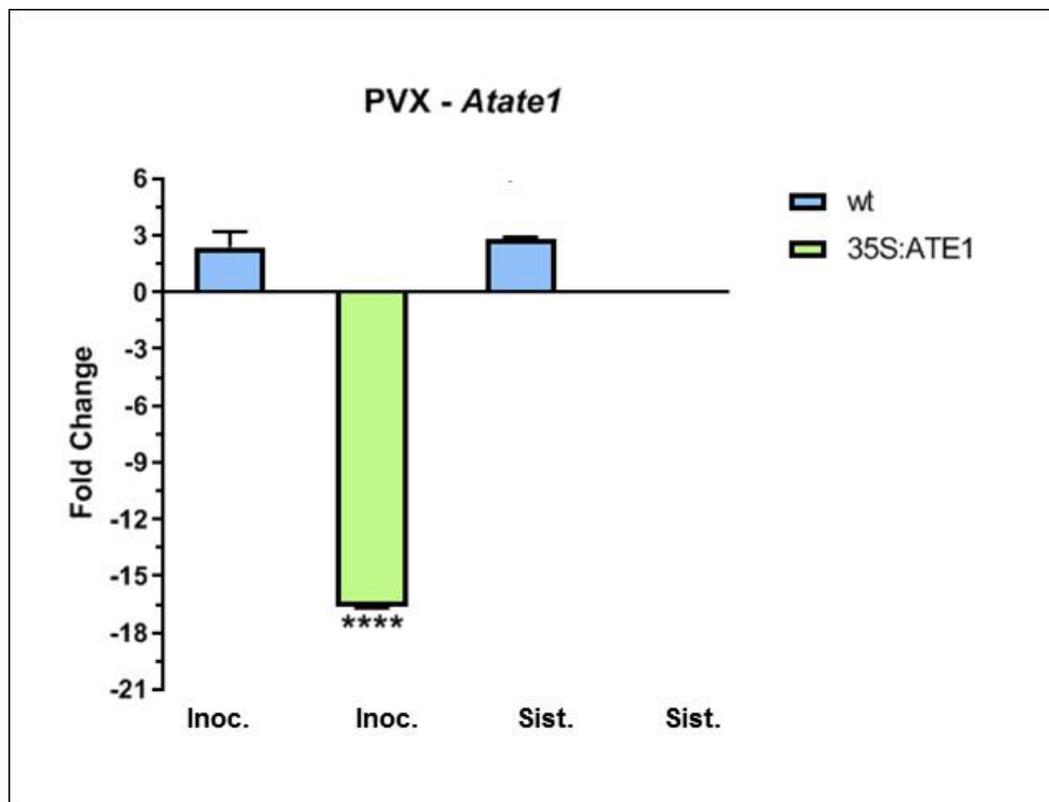


Figura 22 - Expressão do gene *Atate1* em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* durante infecção por *Potato virus X* (PVX). As folhas inoculadas (Inoc.) e sistêmicas (Sist.) foram coletadas com 6dpi. A análise da expressão foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando plantas wt e SE não infectadas como controle. Os resultados estão representados em *fold change* segundo SCHMITGEN e LIVAK (2008). *Testes ‘Two-way ANOVA’ e ‘Tukey’ $p < 0.05$.

As amostras wt infectadas inoculadas e sistêmicas não apresentaram variações significativas na expressão do gene. Já nas folhas inoculadas *35S:ATE1*, foi possível observar uma repressão de 17,5x de *Atate1*, o que corrobora com os resultados apresentados na figura 21. Isso indica que apenas nas plantas *35S:ATE1* ocorre aumento da transcrição de *Atate1* na infecção pelo PVX. Entretanto, a expressão desse gene nas folhas sistêmicas da planta transgênica teve como resultados média e desvio padrão iguais a zero e por isso seu *fold change* não está representado neste gráfico.

5.3 Avaliação da suscetibilidade de plantas *35S:ATE1* ao TRV

Um resultado semelhante ao encontrado na figura 20 foi observado na análise de expressão do gene da proteína do capsídeo (CP) de *Tobacco rattle virus* durante infecção em *A. thaliana* wt e *35S:ATE1* (figura 23).

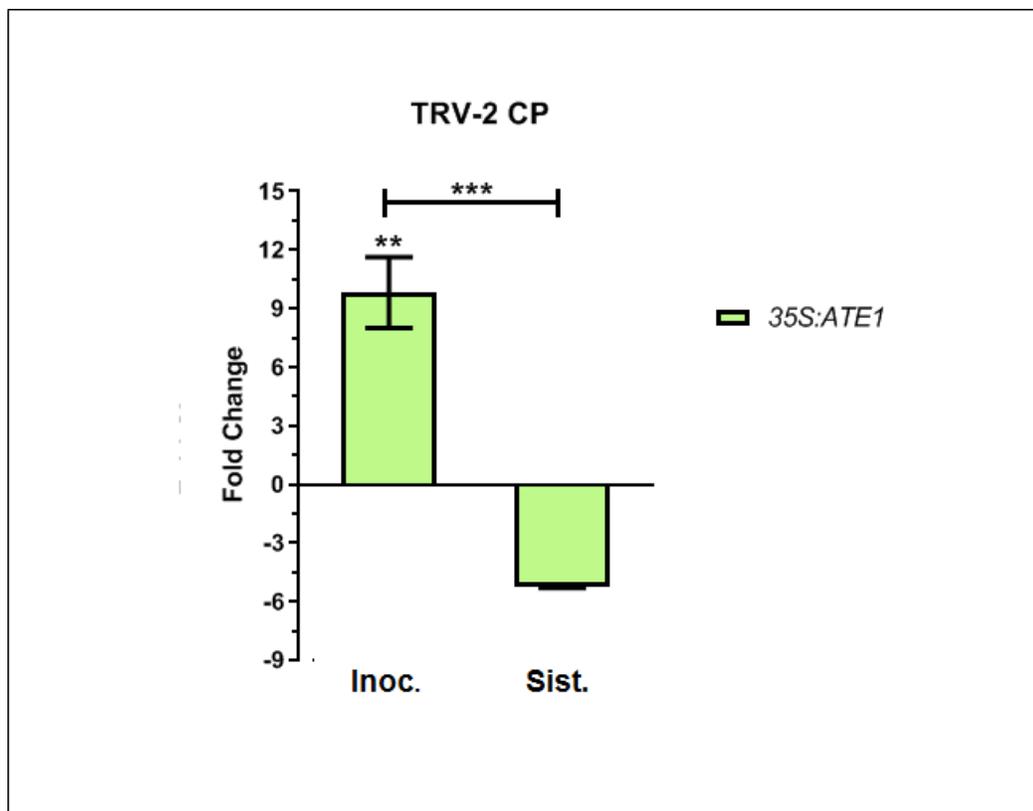


Figura 23 - Expressão do gene de CP em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* durante infecção por *Tobacco rattle virus* (TRV). As folhas inoculadas (Inoc.) e sistêmicas (Sist.) foram coletadas com 6dpi. A análise da expressão foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando as plantas wt infectadas como controle. Os resultados estão representados em *fold change* segundo SCHMITGEN e LIVAK (2008). *Testes = “Two-way ANOVA” e “Tukey” p<0.05.

Nos resultados correspondentes às amostras *35S:ATE1* há uma indução de 10x do gene de CP nas folhas inoculadas. Assim como durante a infecção por PVX, o oposto desse fenômeno é visualizado na condição sistêmica, onde houve repressão de aproximadamente 5x da expressão do gene da proteína viral.

Portanto, é possível afirmar que CP de *Tobacco rattle virus* em *Arabidopsis* que

superexpressam ATE-1 teve sua replicação induzida nas folhas inoculadas com o vírus, mas reprimida sistemicamente.

Com relação a análise da expressão do gene *Atate1* durante infecção por TRV em plantas *35S:ATE1*, este foi induzido 5x mais nas folhas sistêmicas quando comparadas com as folhas inoculadas (figura 24). Resultados semelhantes foram observados durante a infecção por PVX no tópico 5.2.

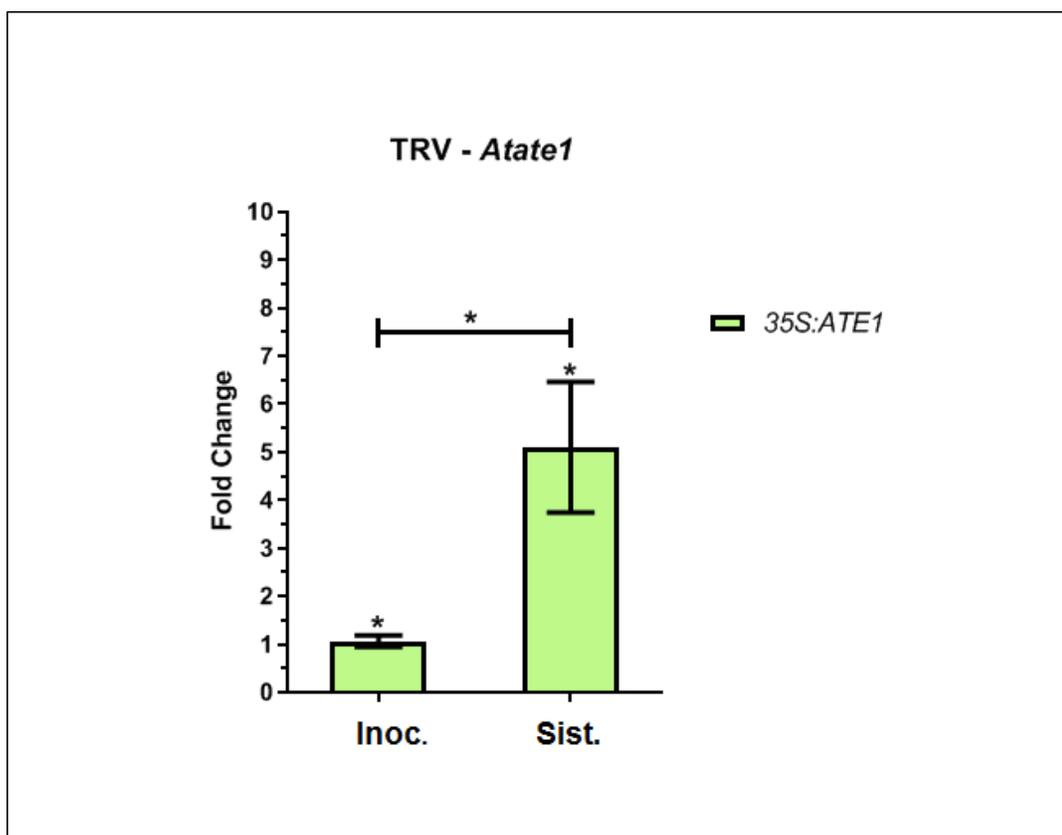


Figura 24 - Expressão do gene *Atate1* em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* durante infecção por *Tobacco rattle virus* (TRV). As folhas inoculadas (Inoc.) e sistêmicas (Sist.) foram coletadas com 6dpi. A análise da expressão foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando plantas infectadas como controle. Os resultados estão representados em *fold change* segundo SCHMITGEN e LIVAK (2008). *Testes “Two-way ANOVA” e “Tukey” $p < 0.05$.

Quando *Atate1* é analisado tendo como controle as plantas wt não infectadas, há indução desse gene de mais de 10x nas folhas inoculadas e mais de 4x nas sistêmicas das plantas wt infectadas. Ou seja, a infecção por TRV induz a expressão de ATE-1 nas folhas inoculadas e

sistêmicas. Porém, quando as plantas transgênicas não infectadas foram comparadas com as transgênicas infectadas, as médias e desvios foram iguais a zero (figura 25).

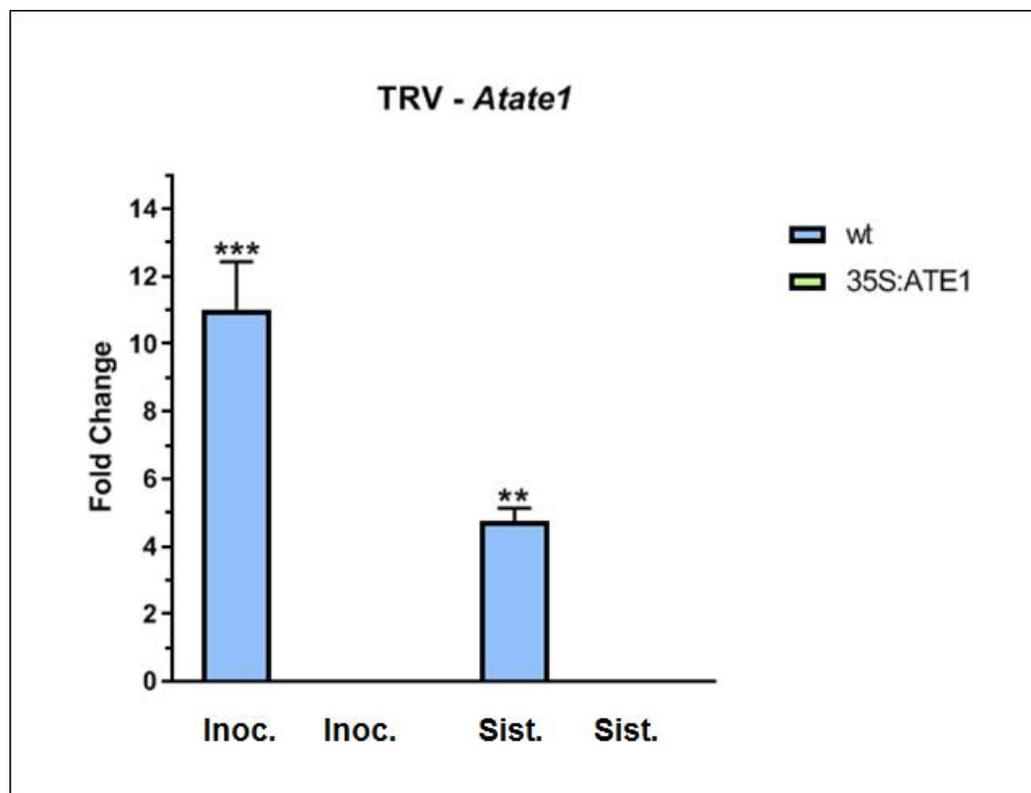


Figura 25 - Expressão do gene *Atate1* em plantas *35S:ATE1* de *A. thaliana* durante infecção por *Tobacco rattle virus* (TRV). As folhas inoculadas (Inoc.) e sistêmicas (Sist.) foram coletadas com 6dpi. A análise da expressão foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando plantas wt e SE não infectadas como controle. Os resultados estão representados em *fold change* segundo SCHMITGEN e LIVAK (2008). *Testes “Two-way ANOVA” e “Tukey” $p < 0.05$.

6 DISCUSSÃO

As medidas de controle das viroses em plantas são majoritariamente preventivas, já que não há formas efetivas e econômicas de tratamento para as plantas infectadas. Logo, se torna necessário identificar os agentes causais dessas doenças e seus mecanismos de infecção.

No Brasil, a Doença Azul do Algodoeiro é a principal virose a acometer a cotonicultura. Nosso grupo identificou o vírus causador dessa doença, o *Cotton Leafroll Dwarf Virus* (CLRDV), e desde então vem estudando os mecanismos de resistência a esse patógeno observado em cultivares como a Delta Opal. A identificação dos genes *CBD1* e *CBD2* presentes no locus de resistência de *Gossypium hirsutum* tornou possível os estudos sobre o provável mecanismo de inibição do vírus nas variedades resistentes, já que a proteína codificada em *CBD2* possui homologia com Arginil t-RNA Transferase (ATE) de *Arabidopsis thaliana*, capaz de degradar proteínas através do proteossoma pela via *N-end-rule*. Quando analisado o acúmulo do RNA de CLRDV em *A. thaliana*, foi possível observar que esse vírus é reprimido nas plantas que superexpressam *Atate1*. Logo, sendo a degradação via proteossoma induzida por ATE um possível mecanismo de defesa vegetal anti-viral, torna-se importante observar se tal fenômeno de repressão se repete na presença de outros vírus.

Em 2018, foi relatado por Moura que o acúmulo do RNA de *Tobacco rattle virus* (TRV) em plantas *35S:ATE1* parece ser maior nas folhas inoculadas quando comparadas com as selvagens inoculadas (figura 29). Porém, há uma diminuição desse RNA viral nas folhas sistêmicas que superexpressam ATE. Esses resultados corroboram com os obtidos no presente estudo, onde foi avaliado acúmulo de TRV sob a superexpressão de ATE-1.

O mesmo padrão foi observado durante a infecção por *Potato virus X* (PVX) apresentada no tópico 5.2. Em plantas *35S:ATE1* inoculadas, foi possível visualizar que TGB de PVX foi induzido quando comparado com as plantas wt também inoculadas. Porém, na condição sistêmica, houve repressão do vírus nas plantas transgênicas em relação às amostras selvagens. Esses resultados sustentam a hipótese de que ATE pode estar relacionada com a inibição do espalhamento de outros vírus além do CLRDV.

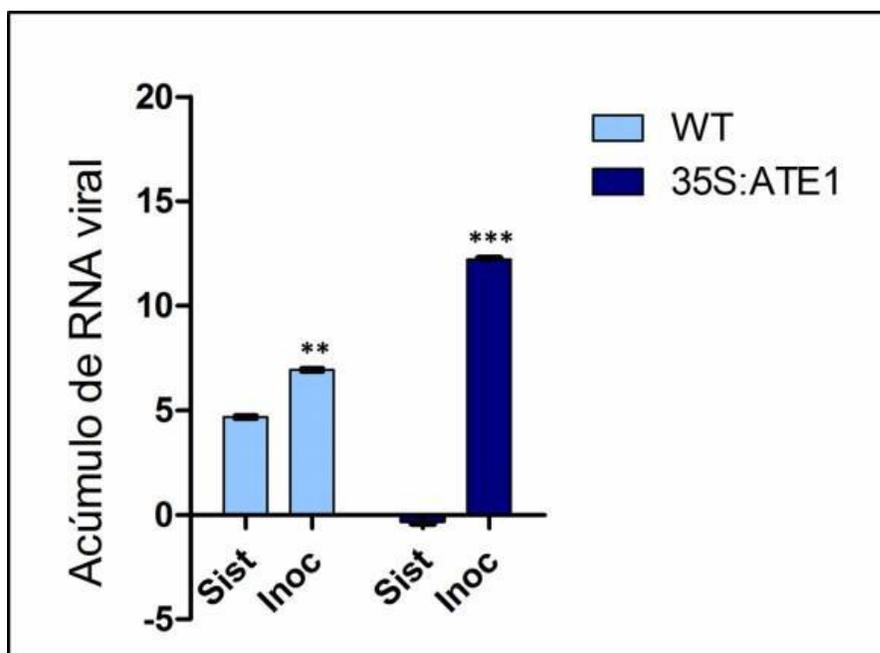


Figura 29 - Níveis do acúmulo do RNA de TRV em linhagens selvagens (*Wild type* - wt) e que superexpressam ATE-1 (*35S:ATE1*) em *Arabidopsis thaliana*. Para a análise da expressão foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A expressão das desses genes foram normalizadas com os genes constitutivos *AtEF1* e *AtFbox*, previamente identificados como bons normalizadores para a condição de infecção viral (FAUSTO et al, 2012). Resultados mostram a média e desvio padrão de 3 replicatas biológicas, cada uma composta por um pool de 4 plantas individuais. Sist: folhas sistêmicas; Inoc: folhas inoculadas. *Teste $-t$ -student $p < 0.05$. Adaptado de Moura, 2018.

Com relação a expressão de ATE-1, foi visto que durante a infecção por CLRDV as plantas *35S:ATE1* apresentam um aumento da expressão dessa proteína (Moura, 2016) (Thomeny, 2019). Porém, no presente estudo, foi observado que ATE-1 foi reprimida nessas plantas durante infecção por TRV e PVX quando comparadas com os controles de amostras vegetais wt não infectadas. Esses resultados não se aplicaram quando a análise foi feita comparando plantas wt e *35S:ATE1* infectadas por ambos os vírus. Logo, o experimento deve ser refeito, já que as amostras controle obtidas pelo grupo apresentavam condições de coleta diferentes das utilizadas no presente trabalho.

Além disso, é possível que a presença do vírus reprima a expressão de ATE-1 depois de determinado tempo de infecção. Como pode ser observado nas figuras 30 e 31, há uma diminuição de *Atate1* em 5dpi. Logo, é necessário analisar o efeito da presença de PVX e TRV sobre a expressão desse gene em pontos de coleta após os 6 dias de infecção utilizados neste estudo.

7 CONCLUSÕES

- Embora a planta *Arabidopsis thaliana* não seja o hospedeiro natural dos vírus *Potato virus X* e *Tobacco rattle virus*, já havia sido relatado na literatura que ambos são capazes de infectar essa espécie vegetal. No presente estudo, PVX e TRV foram inoculados através da técnica de agroinfiltração e a infecção viral foi estabelecida;
- Por meio da expressão de GFP conjugada aos genomas virais, foi observado que os vírus apresentaram espalhamento local e sistêmico nas plantas *wild type* e *35S:ATE1*. Porém, a ocorrência do espalhamento sistêmico foi maior nas plantas selvagens;
- Através da análise da expressão dos genes TGB2 de PVX e CP de TRV, foi possível observar que as duas espécies virais tiveram sua replicação e/ou espalhamento reprimido sistemicamente nas plantas que superexpressam a proteína ATE-1 (*35S:ATE1*);
- Por fim, os níveis de expressão de *Atate1* durante infecção por PVX e TRV apresentaram alterações. Quando comparadas com as plantas wt infectadas, as amostras *35S:ATE1* infectadas mostraram uma indução desse gene sistemicamente. Porém, quando a comparação foi feita tendo como controle plantas wt e SE não infectadas, *Atate1* parece ter sido reprimido nas folhas transgênicas sistêmicas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO. Números do Algodão. Disponível em: <<http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas>>. Acesso em: 27 de maio de 2020.

Adams, E. H. G. & Spoel, S. H. The Ubiquitin-Proteasome System as a Transcriptional Regulator of Plant Immunity. (2018). *J Exp Bot.* 31;69(19):4529-4537.

Aguilar, E.; del Toro, F. J.; Chung, B.; Canto, T. & Tenllado, F. (2016). Infection of *Nicotiana benthamiana* Plants with *Potato Virus X* (PVX). *Bio-protocol* 6(24): e2063.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; Wilson, J. & Hunt, T. O proteossomo é uma protease compartimentalizada com sítios ativos sequestrados. In: *Biologia Molecular da Célula*. 6ª Ed., (Porto Alegre, Artmed), pp. 357–358.

Bendahmane, A.; Köhn, B. A.; Dedi, C. & Baulcombe, D. C. (2015). The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato. *Plant J.* 8(6):933-41.

Boualem, A.; Dogimont, C. & Bendahmane, A. (2016). The battle for survival between viruses and their host plants. *Current Opinion in Virology*, 17, 32–38, 2016.

Calil, I. P. & Fontes, E. P. B. (2017). Plant Immunity Against Viruses: Antiviral Immune Receptors in Focus. In: *Annals of Botany*. Vol. 119. pp. 711–723.

Cheng, C. L.; Li, Y. & Hochstrasser, M. (2017). Proteasome Structure and Assembly Lauren Budenholzer. *J Mol Biol.* 10; 429(22): 3500–3524.

Collins G. A. & Goldberg, A. L. The Logic of the 26S Proteasome. (2017). *Cell.* 169(5):792–806.

Cruz, S. S. & Baulcombe, D. (1995). Analysis of potato virus X coat protein genes in relation to resistance conferred by the genes Nx, Nb and Rx1 of potato. *J Gen Virol.* 76 (Pt 8):2057-61.

Dangl, J.L., Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411:826-833, 2001.

Deshmukh, F. K.; Yaffe, D.; Olshina, M. A.; Ben-Nissan G. & Sharon, M. (2019). The Contribution of the 20S Proteasome to Proteostasis. *Biomolecules.* 16;9(5):190.

Domitrovic, T., Fausto, A. K., Silva, T., Romanel, E. & Vaslin, M. (2016). Plant arginyltransferases (ATEs). *Genetics and Molecular Biology*, 2016.

Ephytia (2013). *Tobacco rattle virus* (TRV). Disponível em <<http://ephytia.inra.fr/en/C/10903/Tobacco-Tobacco-rattle-virus-TRV>>. Acesso em 27 de Maio de 2020.

Fausto, A.K.S. (2016). Identificação e análise funcional do gene de resistência associado à doença azul do algodoeiro. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) -Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Grice, G. L. & Nathan, J. A. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. (2016). *Cell Mol Life Sci.* 73: 3497–3506.

- Galvez, L. C.; Banerjee, J.; Pinar, H. & Mitra, A. (2014). Engineered plant virus resistance. *Plant Science*, v. 228, p. 11–25, 2014.
- Gibbs, D.J; Conde, J.V; Berckhan, S; Prasad, G; Mendiondo, G.M & Holdsworth, M.J. (2015). Group VII Ethylene Response Factors Coordinate Oxygen and Nitric Oxide Signal Transduction and Stress Responses in Plants. *Plant Physiol* 169:23– 31, 2015.
- Gibbs, D.J; Lee, S.C; Isa, N.M; Gramuglia, S.; Fukao, T; Bassel, G.W; Correia, C.S; Corbineu, F; Theodoulou, F.L; Bailey-Serres, J. & Holdsworth, M.J. (2011). Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* 479:415–418, 2011.
- Graciet, E.; Walter, F.; Maoiléidigh, D. O.; Pollmann, S.; Meyerowitz, E. M.; Varshavsky, A. & Wellmer, F. (2009). The N-end rule pathway controls multiple 55 functions during Arabidopsis shoot and leaf development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 32, p. 13618–23, 2009.
- Graciet, E. & Wellmer, F. (2010). The plant N-end rule pathway: structure and functions. *Trends in Plant Science*, v. 15, n. 8, p. 447–453, 2010.
- Holmes, F. O. (1938). Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco. *Phytopathology*, 28, 553–561, 1938.
- Kong, F., You, H., Kong, D., Zheng, K., Tang, R. (2019). The Interaction of Hepatitis B Virus With the Ubiquitin Proteasome System in Viral Replication and Associated Pathogenesis. *Virology* 2019 May 30;16(1):73.
- Lacorte, C.; Ribeiro, S. G.; Lohuis, D.; Goldbach, R. & Prins, M. (2010). Potato virus X and Tobacco mosaic virus-based vectors compatible with the Gateway™ cloning system. *J Virol Methods*. 164(1-2):7-13.
- Lico, C.; Benvenuto, E. & Baschieri, S. (2015). The Two-Faced Potato Virus X: From Plant Pathogen to Smart Nanoparticle. *Front Plant Sci*. 17;6:1009.
- Licausi, F; Kosmacz, M; Weits, D.A; Giuntoli, B; Giorgi, F.M; Voesenek, L.A; Perata, P. & Vandongen, J.T. (2011). Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 479: 419-422, 2011.
- Lico, C.; Benvenuto, E. & Baschieri, S. (2015). The Two-Faced Potato Virus X: From Plant Pathogen to Smart Nanoparticle. *Front Plant Sci*. 17;6:1009.
- Llave, C. (2010). Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant – virus interactions. *Trends in Plant Science*, v. 15, n. 12, p. 701–707, 2010.
- Macfarlane, S. A. (2010). Tobraviruses—plant pathogens and tools for biotechnology. *Mol Plant Pathol*. 11(4):577-83.
- Meinke D. W.; Cherry, J. M.; Dean, C.; Rounsley, S. D. & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis Thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, 23;282(5389):662, 679-82.

Moura, M. O. (2018). Avaliação do papel da Arginil t-RNA Transferase na interação planta-vírus tendo como modelo *Arabidopsis*:CLRDV. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Notícias Agrícolas (2019). Produção de Algodão de MT em 2019 é Recorde em Área e Volume, Afirma IMEA. Disponível em <https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/algodao/249324-producao-de-algodao-de-mt-em-2019-e-recorde-em-area-e-volume-afirma-imea.html#Xs_xfVVKjIU>. Acesso em 27 de Maio de 2020.

Pfeffer, S.; Dunoyer, P.; Heim, F.; Richards, K. E.; Jonard, G. & Ziegler-Graff, V. (2002) P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of Post transcriptional gene silencing. *Journal of virology*, 76, 6815–6824.

Quisen, R. C. & Angelo, P. C. S. (2008). Cultura de tecidos vegetais – conceitos e aplicações. In: Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Embrapa Documentos 61, 13 p.

Rong, J.; Wang, X.; Schulze, S. R.; Compton, R. O.; Williams-Coplin, T. D.; Goff, V.; Chee, P. W. & Paterson, A. H. (2010). Types, levels and patterns of lowcopy DNA sequence divergence, and phylogenetic implications, for *Gossypium* genome types. *Heredity*, v. 108, n. 5, p. 500–6, 2012.

Sanfaçon, H. (2015). Plant Translation Factors and Virus Resistance. *Viruses*, 7, 7, 3392–3419, 2015.

Sartoretto, L. M.; Saldanha, C. W. & Corder, M. P. M. (2008). Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Cienc. Rural* vol.38 no.3.

Schmittgen, T. D & Livak, K. J. (2008). Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative C(T) Method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.

Severino, L. S.; Rodrigues, S. M. M.; Chitarra, L. G.; Lima Filho, J. R.; CONTINI, E.; Mota, M. M.; Marra, R. & Aragão, A. A. (2019). Algodão - Parte 01: Caracterização e desafios tecnológicos. *Desafios do agronegócio brasileiro*, 3. Embrapa. 29 p.

Silva, O. A.; Figueira, A. R.; Boari, A. J.; Pinto, C. A. B. P., & Boni, R. R. (2005). Caracterização Biológica de Onze Isolados de PVX (*Potato virus X*) do Brasil. ***Ciência e Agrotecnologia*, Lavras-MG, v. 29, n.3, p. 521-527.**

Smirnova, E, Firth, A.E., Miller, W. A., Scheidecker, D., Brault, V., Reinbold, C., Rakotondrafara, A. M., Chung, B. Y-W. & Ziegler-Graff, V. (2015). Discovery of a Small Non-AUG-Initiated ORF in Poleroviruses and Luteoviruses That Is Required for Long-Distance Movement. *PLoS pathogens*, 11, 5.

Thomeny, B. R. S. V. (2019). Suscetibilidade ao Polerovirus *Cotton leafroll dwarf virus* pode estar relacionada à supressão de Ethylene Responsive Fator (ERF VII) pelo miRNA172. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Verchot, J. Plant Virus Infection and the Ubiquitin Proteasome Machinery: Arms Race Along the Endoplasmic Reticulum. (2016). *Viruses*. 19;8(11):314.

Verchot-Lubicz, J.; Ye, C. & Bamunusinghe, D. (2007). Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J Gen Virol.* 88(Pt 6):1643-55.

ViralZone (2008). *Potexvirus*. Disponível em <https://viralzone.expasy.org/272?outline=all_by_species>. Acesso em 27 de Maio de 2020.

ViralZone (2008). *Tobravirus*. Disponível em <<https://viralzone.expasy.org/644>>. Acesso em 27 de Maio de 2020.

Rojas, V. K. & Park, I. (2019). Role of the Ubiquitin Proteasome System (UPS) in the HIV-1 Life Cycle. *Int J Mol Sci* 2019 Jun 19;20(12):2984.

Wellmer, F., Graciet, E. (2010) The N-end rule: structure and functions. *Cell, Trends Plant Sci.*, 15, 8, 447-453.

Wikipédia (2020). *Tobacco rattle virus*. Disponível em <https://en.wikipedia.org/wiki/Tobacco_rattle_virus>. Acesso em 27 de Maio de 2020.

Zaidi, S. S. & Mansoor, S. (2017). Viral Vectors for Plant Genome Engineering. *Front Plant Sci.* 11;8:539.

ANEXOS

Anexo A – Amostras de folhas de *A. thaliana wild type* (wt) e *35S:ATE1* (SE) inoculadas com PVX e TRV e sistêmicas.

Condição	Tratamento PVX	Tratamento TRV
wt Inoc.	PVX wt I 4	TRV wt I 1
	PVX wt I 6	TRV wt I 4
	PVX wt I 9	TRV wt I 8
wt Sist.	PVX wt S 1	TRV wt S 3
	PVX wt S 3	TRV wt S 6
	PVX wt S 5	TRV wt S 9
SE Inoc.	PVX SE I 2	TRV SE I 1
	PVX SE I 6	TRV SE I 3
	PVX SE I X	TRV SE I 6
SE Sist.	PVX SE S 4	TRV SE S 1
	PVX SE S 6	TRV SE S 2
	PVX SE S X	TRV SE S 8

I – Inoculada; S – Sistêmica.

Anexo B – Resultado das quantificações dos RNAs de *A. thaliana* wt e SE (folhas inoculadas e sistêmicas) infectadas com PVX. Amostra, concentração de ácido nucléico (ng/μl) e 260/280. Dados obtidos por meio do NanoDrop™.

Amostra	ng/μl	260/280
PVX wt I 4	366,6	1,57
PVX wt I 6	241,4	1,45
PVX wt I 9	313,7	1,53
PVX wt S 1	698,5	1,30
PVX wt S 3	209,1	1,52
PVX wt S 5	383,9	1,57
PVX SE I 2	263,7	1,53
PVX SE I 6	721,7	1,50
PVX SE I X	589,8	1,43
PVX SE S 4	120,1	1,37
PVX SE S 6	565,4	1,24
PVX SE S X	223,7	1,38

I – Inoculada; S – Sistêmica.

Anexo C – Resultado das quantificações dos RNAs de *A. thaliana* wt e SE (folhas inoculadas e sistêmicas) infectadas com TRV. Amostra, concentração de ácido nucléico (ng/μl) e 260/280. Dados obtidos por meio do NanoDrop™.

Amostra	ng/µl	260/280
TRV wt I 1	185,5	1,40
TRV wt I 4	287,2	1,40
TRV wt I 8	162,9	1,43
TRV wt S 3	211,3	1,35
TRV wt S 6	378,6	1,45
TRV wt S 9	207,5	1,38
TRV SE I 1	193,6	1,48
TRV SE I 3	264,7	1,60
TRV SE I 6	217,0	1,47
TRV SE S 1	320,1	1,51
TRV SE S 2	291,8	1,41
TRV SE S 8	588,4	1,23

I – Inoculada; S – Sistêmica.