

BEATRIZ RODRIGUES DA SILVA VIEIRA THOMENY

SUSCETIBILIDADE AO POLEROVIRUS *COTTON LEAFROLL DWARF VIRUS* PODE ESTAR RELACIONADA À SUPRESSÃO DE *ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR* (ERF VII) PELO miRNA172



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

Julho 2019

Trabalho realizado no Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Maite Vaslin de Freitas Silva e coorientação de Anna Karoline Fausto

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

T452s Thomeny, Beatriz Rodrigues da Silva Vieira
Suscetibilidade ao Polerovirus Cotton leafroll
dwarf virus pode estar relacionada à supressão de
Ethylene Responsive Factor (ERF VII) pelo miRNA172
/ Beatriz Rodrigues da Silva Vieira Thomeny. --
Rio de Janeiro, 2019.
51 f.

Orientadora: Maite Vaslin Freitas Silva.
Coorientadora: Anna Karoline Fausto Silva.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. Cotton leafroll dwarf virus. 2. miRNA172. 3.
ERPVII. 4. Arabidopsis thaliana. I. Silva, Maite
Vaslin Freitas, orient. II. Silva, Anna Karoline
Fausto, coorient. III. 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 lutam para produzir conhecimento científico neste país.

AGRADECIMENTOS

Durante nossa caminhada evolutiva na Terra muitos são os que nos auxiliam, servindo de guias, de professores e educadores. São estes que propulsionam nosso aprendizado moral e intelectual, colaborando para o desenvolvimento de potencialidades. Dessa forma não poderia deixar de agradecer ao meu pai Bruno Thomeny e a minha avó Alda Moiano por todo incentivo e carinho dispensados a mim durante minha jornada acadêmica, sem seu amor incondicional e paciência não teria ingressado em uma Instituição de tamanha excelência.

Agradeço ao meu namorado Felipe Trilles por todas as palavras de incentivo, por todos os momentos em que demonstrou ser um companheiro atencioso e dedicado, por não ter permitido que meus momentos ruins impedissem que eu perdesse a confiança em mim e na minha trajetória.

Agradeço imensamente à minha orientadora Maite Vaslin de Freitas Silva por ter aceitado a difícil tarefa de me orientar e transmitir conhecimentos que eu nunca imaginaria obter, pela oportunidade de participar de um trabalho com tanta história e parceria.

Por sua presença e disponibilidade, por seus conselhos e por suas broncas devo agradecer também a minha coorientadora Anna Karoline Fausto, que a todo momento me lembrava da importância e seriedade do nosso trabalho.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Virologia Molecular Vegetal, ainda que com personalidades tão distintas sempre se empenharam em criar um ambiente harmônico e colaborativo, além da constante troca de conhecimentos. Agradeço em especial a Vanessa Sales por sempre ser prestativa e ter participado e me auxiliado durante o desenvolvimento do projeto.

A graduação é um momento de descobertas e amadurecimento pessoal, é a porta para a vida profissional. O peso das responsabilidades e os momentos de dificuldades poderiam ter sido muito mais desagradáveis sem os amigos que fiz durante a graduação. Por isso agradeço a Juliana Guimarães, Larissa Skaf, Letícia Leonardo, Mariana Oliveira, Matheus Côrtes e Victor Rochetti por transformarem as piores situações nas melhores lembranças.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPERJ e a UFRJ, que sempre incentivaram e apoiaram 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: Beatriz Rodrigues da Silva Vieira Thomeny
DRE: 116051997

BANCA EXAMINADORA: Profa. Luciana Jesus Costa (Presidente)
 M.Sc. Stéfanie Menezes de Moura
 Dr. Gilberto Sachetto Martins
 Profa. Iranaia Assunção Miranda (Suplente)

**Título da Monografia: "Susceptibilidade ao polerovirus Cotton leafroll
 dwarf virus pode estar relacionada à supressão de ETHYLENE
 RESPONSIVE FACTOR (ERF-VII) pelo miRNA172"**

Local: Sala I0-057/ CCS / UFRJ

Data e hora de início: 04 de julho de 2019 às 9:00h

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 8,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 04 de julho de 2019.

NOTA

8,5

8,5

8,5

Banca Examinadora:

Luciana Jesus Costa

Profa. Luciana Jesus Costa

Stéfanie Menezes de Moura

M.Sc. Stéfanie Menezes de Moura

Gilberto Sachetto Martins

Dr. Gilberto Sachetto Martins

Iranaia Assunção Miranda

Profa. Iranaia Assunção Miranda

Aluno:

Beatriz Rodrigues da Silva Vieira Thomeny

Beatriz Rodrigues da Silva Vieira Thomeny

Orientador:

Maite Vaslin de Silva Freitas

Profa. Maite Vaslin de Silva Freitas

Coorientador:

Anna Karoline Fausto da Silva

Anna Karoline Fausto da Silva

**Coordenador
 de TCC**

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

RESUMO**BEATRIZ RODRIGUES DA SILVA VIEIRA THOMENY**

SUSCETIBILIDADE AO POLEROVIRUS COTTON LEAFROLL DWARF VIRUS PODE ESTAR RELACIONADA À SUPRESSÃO DE ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (ERF VII) PELO MIRNA172

Orientador: Maite Vaslin de Freitas Silva

O *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) é o agente causador da Doença Azul do algodoeiro (DA), possui um vetor biológico *Aphis gossypii* e causa os sintomas: nanismo, devido ao encurtamento da região internodal, curvatura das folhas, coloração verde intensa e amarelamento das veias. Marcadores moleculares para a resistência a DA em algodão foram descritos, permitindo a localização do locus de resistência no genoma de algodão. Anteriormente, identificamos um gene homólogo a um gene da arginil-T-RNA transferase (ATE) da *Arabidopsis thaliana* no locus da CBD. *Arabidopsis* tem dois genes *ate*, codificando ATE1 e ATE2, respectivamente. Essa proteína é uma N-end Rule responsável por arginilar outras proteínas, introduzindo-as na via de degradação. Além de estar relacionado à resistência a outros tipos de patógenos, como bactérias e oomicetos. A transcrição de ATE é conhecida por ser regulada por genes da família de fatores transcricionais responsivos ao etileno (ERFs), entre outros. Em outros estudos realizados pelo grupo, observou-se que a suscetibilidade ao CLRDV está associada à repressão do RNAm de ATE nas primeiras horas após a infecção. O presente trabalho mostra que, além da ATE, os membros da família ERFVII também são reprimidos nas primeiras horas após a infecção. Em contraste, uma forte superexpressão de miRNA172 é observada ao mesmo tempo. Como os membros do ERFVII são alvo putativo do miR172, podemos especular que o miR172 está silenciando as transcrições de ERFVII, o que inibe a transcrição de ATE..

Palavras-chave: *Cotton leafroll dwarf virus*, miRNA172, ERFVII, *Arabidopsis thaliana*

ABSTRACT**BEATRIZ RODRIGUES DA SILVA VIEIRA THOMENY**

SUSCETIBILIDADE AO POLEROVIRUS COTTON LEAFROLL DWARF VIRUS PODE ESTAR RELACIONADA À SUPRESSÃO DE ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (ERF VII) PELO MIRNA172

Orientador: Maite Vaslin de Freitas Silva

Cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) is the causative agent of Cotton Blue Disease. CLRDV is transmitted by a biological vector *Aphis gossypii* and causes symptoms as: dwarfism, due to shortening of the internodal region, curved leaves, intense green coloration, and yellowing of the veins, imposing strong losses in cotton productivity. Molecular markers for CBD resistance were already described, allowing the CBD locus localization in cotton genome. Previously, we identified a gene homologous to an arginyl-T-RNA transferase (ATE) gene from *Arabidopsis thaliana* in CBD locus. Arabidopsis has two *ate* genes, encoding ATE1 and ATE2, respectively. This protein is an N-end Rule responsible for arginylating other proteins and it introduces them into the pathway of degradation. In addition to being related to a resistance to other types of pathogens such as bacteria and oomycetes. ATE transcription known to be regulated by genes of the family of transcription factors ethylene responsive factors (ERFs), between others. In other studies conducted by the group, it was observed that CLRDV susceptibility is associate to ATE mRNA repression in the first hours after infection. The present work shows that in addition to ATE, members of ERFVII family are also repressed in the first hours after infection. In constrast, a strong overexpression of miRNA172 is observed at the same time. As ERFVII members are putative target of miR172, we can speculate that miR172 is silencing ERFVII transcripts, what is blocking ATE transcription.

Key-words: *Cotton leafroll dwarf virus*, miRNA172, ERFVII, *Arabidopsis thaliana*

LISTA DE ABREVIATURAS

ATE- Arginil T-RNA transferase

CBD- Cotton blue disease

cDNA- DNA complementar

CLRDV- Cotton leafroll dwarf virus

CP- capsídeo

DA- Doença Azul do algodoeiro

dNTP- desoxirribonucleico trifosfato

DNA- ácido desoxirribonucleico

d.p.i- Dias após a infecção

ERF- Ethylene Responsive Factor

Gh- Gossypium hirsutum

h.p.i- Horas após a infecção

Kb- quilobase

ORF- Open Reading Frame

RdRp- RNA polimerase RNA dependente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura genômica do polerovirus CLRDV.	2
Figura 2: Sintomas da doença azul do algodoeiro em algodão.	3
Figura 3: Esquema da região compreendida entre os marcadores DC20027 e NG0203481 do cromossomo 11 de <i>Gossypium raimondii</i> .	5
Figura 4: Árvore filogenética da subfamília ERF e seus subgrupos enumerados de I-X	7
Figura 5: Via N-end rule onde a ATE (AtATE1 e AtATE2) atua em plantas regulando negativamente proteínas ao acrescentarem uma molécula de Arginina à porção N-terminal de proteínas levando-as para a via de degradação por proteassoma.	8
Figura 6: Esquema relacionando a proporção entre acúmulo de miRNA156 e o acúmulo de miRNA172 durante os estágios de desenvolvimento do vegetal.	11
Figura 7: Hipótese do trabalho sugere que uma superexpressão do miRNA172 é induzida pela infecção viral.	13
Figura 8: <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagens no dia da inoculação com CLRDV	20
Figura 9: <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagens inoculadas com CLRDV no dia da coleta 5dpi.	21
Figura 10: Gel de Agarose 0,8% mostrado o resultado da extração de RNA total das amostras inoculadas e dos controles.	21
Figura 11: Diagnóstico das 21 por Nested-PCR baseado na amplificação do gene do capsídeo viral (606 pb) do CLRDV de linhagens de <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagens.	22
Figura 12: <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagens e 35S:ATE1 no dia do inóculo com pulgões não virulíferos e virulíferos (carreando CLRDV).	23
Figura 13: Diagnóstico por Nested-PCR baseado na amplificação do gene do capsídeo viral (606 pb) do CLRDV de linhagens de <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagens e 35S:ATE1.	24
Figura 14: Expressão dos genes ATE1, ATE2 e miR172 em plantas selvagens (Wild type – Wt) e 35S:ATE1 de <i>A. thaliana</i> inoculadas com pulgões <i>Aphis gossypii</i> virulíferos.	25
Figura 15: Expressão dos genes RAP 2.2, RAP 2.3 e RAP 2.12 em plantas selvagens (Wild type – Wt) e 35S:ATE1 de <i>A. thaliana</i> inoculadas com pulgões <i>Aphis gossypii</i> virulíferos.	27
Figura 16: Expressão dos genes ATE1, ATE2 e miR172 em plantas selvagens (Wild type – Wt) e 35S:ATE1 de <i>A. thaliana</i> inoculadas com pulgões <i>Aphis gossypii</i> .	28
Figura 17: Expressão dos genes RAP 2.2, RAP 2.3 e RAP 2.12 em plantas selvagens (Wild type – Wt) e 35S:ATE1 de <i>A. thaliana</i> inoculadas com pulgões <i>Aphis gossypii</i> .	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados no NESTED-PCR para o diagnóstico viral.	17
Tabela 2: Iniciadores utilizados para o PCR em tempo real	19

ÍNDICE

	<i>Pg.</i>
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1- <i>Cotton leafroll dwarf virus</i> (CLRDV).....	1
1.2- A doença azul do algodoeiro.....	2
1.3- A resistência à DA.....	4
1.4 - Fator de Transcrição responsivo ao Etileno (ERF).....	5
1.5 Arginil t-RNA transferase (ATE).....	8
1.6- miRNA172.....	9
	12
2- JUSTIFICATIVA.....	14
3-OBJETIVOS.....	15
4- METODOLOGIA.....	15
4.1- Material vegetal.....	15
4.2-Ensaio de infecção do CLRDV com vetor para determinar a taxa de infectibilidade.....	15
4.3-Ensaio de infecção do CLRDV com vetor para o PCR e tempo real.....	16
4.4- Extração de RNA e RT.....	16
4.5- Diagnóstico do CLRDV por meio de NESTED-PCR.....	17
4.6- Amplificação por PCR em tempo real dos genes miRNA172, ERFVII e <i>Atate1</i> e <i>Atate2</i>	18
5- RESULTADOS.....	19
5.1- Ensaios de infecção em <i>Arabidopsis thaliana</i> com CLRDV para determinar a taxa de infectibilidade.....	19
5.2-Ensaios de infecção em <i>Arabidopsis thaliana</i> com CLRDV para PCR em tempo real.....	22
5.3- Análise dos níveis de expressão de AtATE1, AtATE2 e miRNA172 ao longo da infecção.....	24
5.4- Análise dos níveis de expressão de membros da subfamília ERFVII ao longo da infecção viral.....	26
5.5- Análise dos níveis de expressão de AtATE1, AtATE2 e miRNA172 após herbivoria.....	28
5.6- Análise dos níveis de expressão de membros da subfamília ERFVII.....	29
6- DISCUSSÃO.....	31
7-CONCLUSÕES.....	35
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV)

Os vírus são patógenos intracelulares obrigatórios e os que infectam homens, em sua maioria, são capazes de modular as estruturas dos receptores de membrana celular de células hospedeiras para adentrarem o meio citoplasmático e se replicarem usando a maquinaria celular (Santos, 1964). No entanto, os vírus que infectam vegetais não possuem seus mecanismos completamente elucidados, sendo sua interação com receptores celulares pouco conhecida. A replicação viral em uma célula hospedeira desencadeia diversos tipos de resposta como ativação de fatores de transcrição, ativação de resposta via RNA interferente, síntese de hormônios, entre outros que podem levar a morte celular e ao desenvolvimento de sintomas, sendo estes generalizados ou característicos de um tipo viral (Trigiano, Windham e Windham, 2010)

O *Cotton leafroll dwarf virus* é um polerovirus da família *Luteoviridae*, causador da Doença Azul do Algodoeiro (DA) ou do inglês “Cotton Blue Disease” - (CBD) (Corrêa et al., 2005), que tem como único hospedeiro natural descrito o algodoeiro (*Gossypium sp.*). O genoma dos polerovirus é organizado em uma fita simples de RNA positiva e linear, com tamanho de aproximadamente 5.8 Kb, não segmentado, sem a presença de cauda poli-A. Apresentam capsídeo de formato icosaedral e não envelopado (Mayo & Ziegler-Graff, 1996).

A transmissão do CLRDV ocorre através do afídeo *Aphis gossypii* Glover, sendo esta a espécie de afídeo mais encontrada pelo Brasil (Costa, 1972). O inseto desempenha papel de vetor mecânico em uma relação circulativa não propagativa, responsável pela disseminação do vírus pelas plantações de algodão, causando importantes perdas econômicas. O *A. gossypii* pertence à família *Aphididae* da ordem *Hemiptera* e se alimenta da seiva levando a alterações hormonais nas plantas, afetando o seu desenvolvimento e produção.

No Brasil, o modo de transmissão e os sintomas vistos em plantações de algodão suscitavam a hipótese de que o agente causador da Doença Azul era um vírus pertencente da família *Luteoviridae*. Em 2005 o CLRDV foi molecularmente caracterizado pelo nosso laboratório (Corrêa, et al. 2005).

O genoma de CLRDV é composto por nove fases abertas de leitura (“Open Reading Frames”-ORFs) (figura 1), e é capaz de infectar o hospedeiro, se disseminar sistemicamente em plantas suscetíveis e se replicar sem auxílio de outros patógenos. Suas estratégias de replicação incluem “readthrough”, que leva a formação de uma proteína de fusão P3P5 (ou proteína RT), responsável pela transmissão pelo vetor, e síntese de RNA subgenômico (sgRNA).

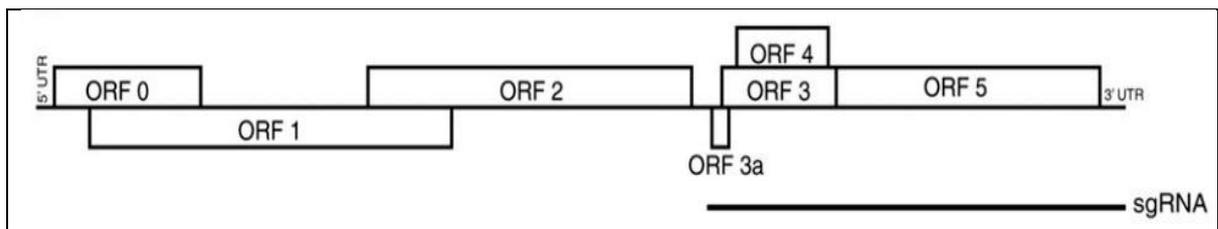


Figura 1: Representação esquemática da estrutura genômica do polerovirus CLRDV. A linha superior indica o RNA genômico, a linha inferior indica os RNAs subgenômicos. No primeiro sgRNA são encontradas as ORFs 3, 3a, 4 e 5. ORF0 – codificadora da proteína supressora do silenciamento gênico pós-transcricional; ORFs 1 e 2 – envolvidas na replicação viral; ORF3 – proteína do capsídeo; ORF3a- Codificadora de proteína de movimento a longa distância; ORF4 – proteína do movimento célula-a-célula; ORF5 – proteína de transmissão pelo afídeo. (Adaptado de Agrofloglio et al, 2017)

A ORF 0 é responsável por codificar a proteína P0, supressora do silenciamento pós-transcricional (Pfeffer et al., 2002), impedindo que a defesa antiviral via silenciamento de RNA afete a replicação viral. As ORFs 1 e 2 codificam as proteínas P1 e P2 cujas funções estão relacionadas com a replicação viral. Quando as sequências dessas ORFs são traduzidas juntas codificam uma proteína RNA polimerase RNA dependente (RdRp) responsável por replicar o genoma viral (Reutenauer et al., 1993). As proteínas originadas a partir das ORFs 3, 4 e 5 são sintetizadas a partir da formação de um RNA subgenômico, que é guiada por elementos regulatórios presentes na região intergênica (Tacke et al., 1991). A ORF 3 codifica proteína do capsídeo viral (CP), enquanto a ORF3a, que não é iniciada através de um códon AUG, codifica uma proteína envolvida com a movimentação a longa distância dentro da planta (Smirnova et al., 2015), portanto, favorece a infecção sistêmica. ORF 4 codifica uma proteína de movimento responsável pela disseminação de vírions para outras células. A ORF 5 codifica uma proteína conhecida como “readthrough-protein”, que é responsável pela transmissão viral pelo afídeo.

1.2- A doença azul do algodoeiro - DA

A infecção viral pode ser percebida constatando-se o surgimento de sintomas. Esses sintomas são causados a partir da entrada e replicação viral em células permissivas, que suscitam respostas de defesa do hospedeiro e podem levar ao estabelecimento dos mecanismos de patogênese viral, que é o que chamamos de doença. Os vírus causam doença ao interagir com elementos celulares do hospedeiro, desencadeando uma cascata de sinalização para ativação de resposta de defesa a patógenos, disfunção celular e dano tecidual.

A Doença Azul do algodoeiro (DA) pode manifestar-se através dos seguintes sintomas: encurtamento dos internódios, levando a alterações no desenvolvimento da planta (nanismo); rugosidade e curvatura para baixo dos bordos foliares, sintoma muito presente nas folhas mais novas; clareamento das nervuras e escurecimento das folhas mais velhas (Figura 2). Plantas

infectadas tem a produção de flores reduzida ou abolida. As alterações causadas no desenvolvimento do vegetal e na produção de flores/frutos levam a uma significativa redução na produção e qualidade da fibra, que levam a perdas econômicas. Quando a infecção ocorre em plantas parcialmente desenvolvidas os sintomas afetam mais gravemente as folhas mais novas e o crescimento a partir do momento da infecção (Cauquil e Vaissayre, 1971).

Em 1938, foi descrita no Brasil sob o nome de mosaico das nervuras uma doença com etiologia viral em algodão (Costa e Forster, 1938). Em 1949, na República Centro-Africana uma doença similar porém mais agressiva foi nomeada de Doença Azul (“cotton blue disease”) e desde então foi observada em diferentes continentes. Em 1962, uma estirpe mais severa do mosaico das nervuras foi descrita no Brasil, sob o nome de mosaico das nervuras Ribeirão Bonito (Costa e Carvalho, 1962). Levantou-se a hipótese de que a doença do mosaico das nervuras e a doença azul se tratavam da mesma enfermidade, pois os sintomas eram muito semelhantes.

A disseminação do CLRDV depende da disponibilidade do seu vetor (Figura 2C), que pode se apresentar na forma áptera ou alada, e é capaz de transmitir o vírus em todas as fases de seu ciclo de vida (Michelotto e Busoli, 2003b). A forma alada é muito importante para se obter um padrão de dispersão viral rápida. Segundo Michelotto e Busoli, pulgões virulíferos se desenvolvem mais rapidamente que pulgões não-virulíferos.



Figura 2: Sintomas da doença azul do algodoeiro em algodão. A- Diferenças entre uma folha não infectada (à esquerda) e uma infectada (à direita). B- Algodoeiros em campo, à esquerda planta infectada apresentando nanismo, escurecimento das folhas e enrolamento dos bordos foliares. Foto cedida pelo Dr. Nelson Suassana (Embrapa/ Algodão). C- *Aphis gossypii*: vetor biológico do CLRDV.

A transmissão da DA se dá exclusivamente através de seu vetor. Entretanto, em artigo publicado em 2013 por Distéfano e colaboradores, foi possível a transmissão através da

utilização de clone infeccioso do CLRDV para *Gossypium hirsutum* (algodão comercial), *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana benthamiana*. Em *N. benthamiana* foram realizados três experimentos, no primeiro observou-se sintomas, duas semanas após a infecção, em folhas sistêmicas em 2 das 7 plantas agroinfiltradas sendo que dessas apenas em uma foi possível detectar RNA viral por RT-PCR. Nos outros dois experimentos foi possível obter resultados positivos por RT-PCR para 3/6 e 4/6 plantas agroinfiltradas três dias após a infecção (Distéfano et al., 2013). Já em *Arabidopsis thaliana* agroinfiltradas não foi possível observar nenhum tipo de sintoma, e o RNA viral foi detectado por RT-PCR no primeiro experimento em 3/4 plantas e em 1/4 no segundo. Foram realizados 4 experimentos diferentes em algodoeiros, no primeiro experimento foi possível observar amplificação da região do capsídeo viral em 12/14 plantas agroinfiltradas, no segundo 9/15 plantas tiveram a infecção confirmada molecularmente, no terceiro 12/13 plantas tiveram resultado positivo para a infecção e por fim, no quarto experimento apenas 8/15 plantas apresentaram amplificação do CP por RT-PCR. Ao observar os resultados nos quatro experimentos, onde as amostras foram coletadas em três semanas após a agroinfiltração, constata-se a presença de RNA viral por RT-PCR em 53-92% das plantas utilizadas.

1.3- A resistência à DA

A resistência à doença azul do algodoeiro é controlada por um único gene dominante em algodão (*Gossypium raimondii*)(Junior et al. 2008) e já foram descritos marcadores moleculares para o locus de resistência (Fang et al. 2010). Nosso grupo identificou na região entre estes marcadores a presença de duas ORFs: CBD1 e CBD2, que estão potencialmente envolvidas com a resistência à DA e cuja expressão é controlada pela mesma região promotora. A proteína CBD2 apresenta homologia com a proteína Arginil-tRNA transferase (ATE) de *Arabidopsis thaliana*, onde são encontradas duas sequências codificantes de ATE, denominadas de *Atate1* e *Atate2*.

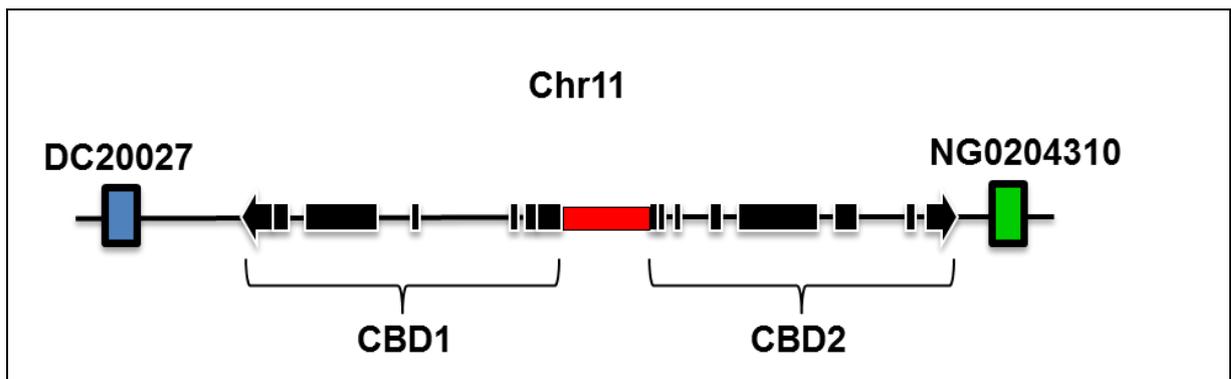


Figura 3: Esquema da região compreendida entre os marcadores DC20027 e NG0203481 do cromossomo 11 de *Gossypium raimondii*. Entre os marcadores estão os genes *CBD1* e *CBD2*, regulados pelo mesmo promotor (região em vermelho). Caixas pretas exons e linhas introns. Retirado de Fausto, A.K.S. (2016).

A sequência predita para a proteína CBD1 de *Gossypium raimondii* foi analisada em programas de banco de dados como o “Pfam” e o “Interpro scan” e não foi possível identificar domínios conservados. Em uma primeira pesquisa a sequência foi analisada no banco de dados específico para *Arabidopsis thaliana*, o TAIR (The Arabidopsis Information Resource) foi encontrado 68% de similaridade com uma proteína BPP1- BASIC PROLINE-RICH PROTEIN 1), que é associada ao microtúbulo. Outra pesquisa, realizada no programa BLAST NCBI (National Center for Biotechnology Information) identificou em 100% de cobertura, 98% de identidade e e-value de 0.0 com uma proteína receptora de lipoproteína de baixa densidade (LDL) de *Gossypium arboreum*, que se encontra no locus de resistência à DA.

1.4- Fator de Transcrição responsivo ao Etileno (ERF)

Fatores de transcrição são proteínas necessárias para iniciar a transcrição genética, permitindo o reconhecimento da região promotora pela RNA polimerase ao se ligarem a fita de DNA em regiões chamadas de *cis elements* ou elementos regulatórios *cis*. Dessa forma possibilitam a associação da enzima ao DNA e sua consequente ativação. Para que se inicie a transcrição de um gene se faz necessário a presença de diversos fatores de transcrição, que são classificados de acordo com sua função como: ativadores, co-ativadores, mediadores e silenciadores. O envolvimento desse grupo de proteínas na regulação genética possibilita que sua ausência ou presença dite se um determinado gene será transcrito ou não, e qual(is) gene(s) será(ão) transcrito(s).

O fator de transcrição responsivo ao etileno ou “Ethylene responsive factor” (ERF) é o nome de uma subfamília de fatores transcricionais, pertencentes à família AP2/ERF. Estes fatores de transcrição têm seus níveis aumentados na presença de etileno, um hormônio vegetal

gasoso envolvido no amadurecimento de frutos. São fatores transcricionais encontrados por todo o domínio Eukarya (Riechmann et al., 2000).

A família AP2/ERF desempenha um papel importante na ativação de genes relacionados ao crescimento do organismo, desenvolvimento de sementes e flores (Maes et al., 2001; Tsaftaris et al., 2012), capacidade meristemática (Asahina et al., 2011), resposta a estresse (Chen et al., 2012) e metabolismos primário e secundário (Mo et al., 2011; Shi et al., 2011). Os fatores transcricionais pertencentes a essa família possuem ao menos um domínio AP2/ERF, contendo de 60-70 aminoácidos, e são agrupados em 5 subfamílias: AP2, conhecida por possuir dois domínios AP2/ERF; RAV, conhecida por possuir um domínio AP2/ERF e um domínio B3, que é um domínio de ligação ao DNA conservado em outros fatores de transcrição (Nakano et al., 2006); CBF/DREB, caracterizado por reconhecer o elemento responsivo a desidratação (DRE) ao reconhecer sítios de ligação do tipo A/GCCGAC (Shinozaki, 1994; Thomashow, 1999), atuando na resposta a estresses abióticos, e a subfamília ERF, constituída por membros que possuem apenas um domínio AP2/ERF (Nakano et al., 2006). A ligação dos fatores transcricionais a seus alvos depende da interação entre os domínios do fator de transcrição e o sítio do promotor do gene alvo. Tendo em vista isto, sabe-se que a subfamília ERF é capaz de se ligar especificamente em uma sequência GCC-box na região promotora dos genes alvo possibilitando a transcrição destes (HAO et al. 1998).

Segundo Nakano e colaboradores, em artigo publicado em 2006, plantas selvagens da espécie *Arabidopsis thaliana* possuem 147 genes pertencentes a família AP2/ERF, destes 122 genes pertencem a subfamília ERF, que já foi descrito atuando na resposta a estresses de origem biótica (Hao et al., 1998) em diversas espécies de plantas como *Arabidopsis* (Sakuma et al., 2002) (Nakano et al., 2006), arroz (Nakano et al., 2006), Kiwi (artigo do 2.3) e algodão (Chapion et al., 2009). A subfamília ERF se divide em 10 grupos, enumerados de I-X, como é mostrado na figura 3, e que atuam como reguladores centrais interligando outras vias de sinalização hormonal (Müller & Munné-Bosch, 2015).

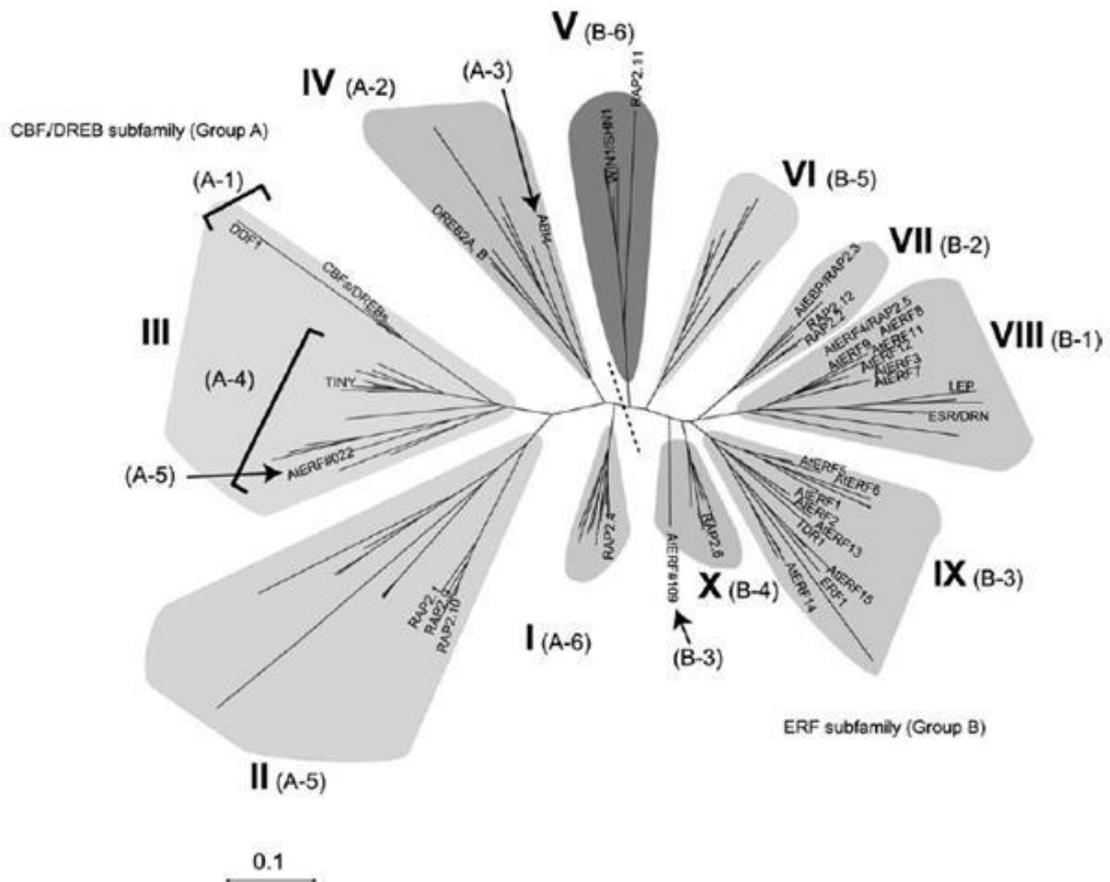


Figura 4: Árvore filogenética com genes da subfamília ERF, encontrados em *Arabidopsis thaliana*, e seus subgrupos enumerados de I-X. Retirada de Nakano et al. 2006.

O grupo ERF-VII, composto pelos genes RAP 2.2, RAP 2.3 e RAP 2.12 foi relacionado com a regulação positiva de uma proteína Arginil T-RNA transferase (ATE), que foi recentemente associada com a resposta à infecção por patógenos fúngicos e bacterianos (Marchi et al. 2016). ATE também já foi associada à regulação de genes responsáveis por conferir resistência a hipóxia em vegetais (Gasch et al., 2016). Neste trabalho plantas do tipo *Arabidopsis thaliana* foram submetidas a condição de hipóxia e foi constatado que nesta condição os genes da família RAP 2.2 e RAP 2.12 atuam de forma redundante e são capazes de ativar 95% dos genes relacionados a resposta a hipóxia.

1.5- Arginil t-RNA transferase (ATE)

A ATE é uma proteína da via proteolítica dependente de ubiquitina conhecida como *N-end rule*, e sua função é importante na regulação negativa de proteínas, pois atua conjugando uma arginina a um glutamato ou aspartato na porção N-terminal de outras proteínas. A arginilação é reconhecida como um sinal para a degradação e ubiquitinas são adicionadas na lisina que se encontra mais próxima da extremidade N-terminal, a aproximadamente 15 aminoácidos de distância.

A via *N-end rule* é muito conservada em eucariotos e desempenha papel crucial na regulação de diversos processos de desenvolvimento como o desenvolvimento cardiovascular, a replicação de DNA e a apoptose (Sriram et al., 2011). Proteínas podem ser introduzidas na via por duas formas bem caracterizadas, uma delas é mediada por acetilação, *Ac/N-end rule*, e a outra por adição de arginina, a *Arg/N-end rule*, que reconhece resíduos de aminoácidos não acetilados. Proteínas contendo resíduos desestabilizantes (*N-degradons*) são reconhecidas, marcadas para degradação através da ubiquitinação por proteínas E3 ligases específicas (*N-recognins*) por proteassomas (Graciet et al., 2009; Gibbs et al 2014,). Como é demonstrado na figura 5, os *N-degradons* podem ser proteínas que perderam sua metionina e expõem em sua porção N-terminal determinados resíduos de peptídeos como cisteína oxidada, aspartato e glutamato, sendo estes reconhecidos pela ATE, que é responsável por arginilar, isto é transferir uma arginina para um aminoácido no N-terminal (*N-degradom*), marcando a proteína de forma que ela seja reconhecida e ubiquitinada. Em *Arabidopsis* a proteína responsável por reconhecer proteínas arginiladas é a PROTEOLYSIS6 (PRT6) (Graciet et al.,2009; Holman et al., 2009).

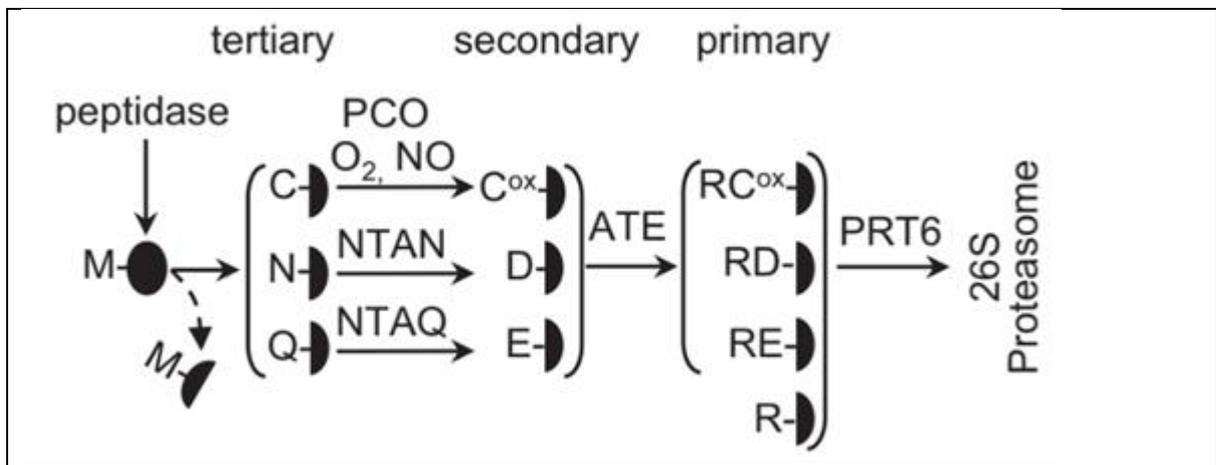


Figura 5: Via *N-end rule* onde a ATE (AtATE1 e AtATE2) atua em plantas regulando negativamente proteínas ao acrescentarem uma molécula de Arginina à porção N-terminal de proteínas levando-as para a via de degradação por proteassoma. Proteína com ausência de metionina (M) na porção N-terminal tendem a ser desestabilizadas, ao exporem os resíduos de aminoácidos cisteína (C), asparagina (N) e glutamina (Q) que passam por modificações e passam a ter resíduos de aminoácidos como o aspartato (D), um glutamato (E) ou uma cisteína oxidada (C^{ox}). C^{ox}, D e E são reconhecidos pela ATE, que irá acrescentar um arginina nesse terminal, de tal modo que a proteína

arginilada será enviada para a degradação no proteossoma por intermédio da PRT6. Adaptado de Vicent et al., 2019.

A ATE é uma importante proteína pois contribui em diversos momentos do desenvolvimento vegetal, como: amadurecimento e germinação de sementes, quebra dos lipídios e sensibilidade a açúcar nas plântulas (Graciet et al., 2009; Wellmer, 2010). Além disso, auxilia no crescimento, induz sensibilidade ao ácido abscísico e possibilita a resposta a estresses abióticos como hipóxia e acúmulo de óxido nítrico (NO) (Gibbs et al., 2014, 2015).

Essa proteína foi recentemente associada à resposta de defesa contra patógenos pois foi observado que plantas de *Arabidopsis thaliana* mutadas para ATE1 e ATE2 apresentam resposta de defesa contra fungos e bactérias com diversos estilos de vida altamente prejudicadas. O que fez supor que a ATE, devido ao seu importante papel na regulação de proteínas, poderia estar atuando como um regulador chave desses componentes celulares. Para comprovar essa hipótese o grupo da pesquisadora Emmanuelle Graciet analisou o proteoma de *Arabidopsis thaliana* mutantes, que não expressavam ATE1 e ATE2, e selvagens (WT) (Marchi et al., 2016). Estas plantas foram desafiadas com diferentes patógenos de origem fúngica como: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis Cinerea* e *Erysiphe cruciferarum*, e bacteriana como: *Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae*, e observou-se que as plantas selvagens apresentavam sintomas, mas estes não eram tão acentuado quando comparados aos vistos em plantas mutantes *ate1ate2* knockout e *prt6-5* knockout. A expressão relativa de alguns genes já relacionados com a defesa a patógenos como o ácido jasmônico, glucosinolatos e biossíntese de metabólitos secundários demonstravam repressão nas plantas mutadas quando comparados aos níveis de expressão das plantas selvagens, enquanto genes envolvidos com a resposta à hipóxia foram regulados positivamente. Esses resultados corroboram para a conclusão de que a via N-end rule e conseqüentemente as proteínas ATE1 e ATE2 são importantes para uma resposta de defesa a patógenos em plantas *Arabidopsis thaliana*.

1.6- O miRNA172

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA endógeno não-codante de aproximadamente 21-24 nucleotídeos. Essas moléculas atuam na regulação genética (Cogoni et al., 1996), principalmente de maneira pós-transcricional, ao se associarem com um complexo chamado RISC (RNA-Induced Silencing Complex) permitindo ao miRNA parear com mRNAs alvo levando-os a degradação. Também podem atuar impedindo a tradução de seus mRNAs alvos. Estudos moleculares demonstram que miRNAs são encontrados em diversos filós

(Cogoni & Macino, 2000) regulando eventos como desenvolvimento, metabolismo celular, diferenciação celular e apoptose (Rana, 2007).

A biogênese dos miRNAs compreende as fases de transcrição, maturação e incorporação ao complexo RISC. Portanto, ocorre a partir da transcrição de seu gene, encontrado em regiões intergênicas, e é realizada por uma RNA polimerase II originando uma estrutura primária com 60-100 nucleotídeos chamada de pri-miRNA que possui formato de grampo (“hairpin”). O pri-miRNA é processado por uma dsRNA-RNase chamada DICER-LIKE1 (DCL1) no precursor do miRNA (pre-miRNA) ainda no núcleo, este precursor é novamente processado pela DCL1, originando um miRNA estruturado em dupla-fita (miRNA/miRNA* duplex), contendo de 21-24 nucleotídeos, essa molécula é desprovida de terminal 5'-Cap e cauda poli-A na região 3' embora seja capaz de migrar da área nuclear para o citoplasma. Já no citoplasma é reconhecido por um complexo RISC (RNA-Induced Silencing Complex) contendo os domínios ARGONAUTE 1 (AGO1) e ARGONAUTE 2 (AGO2) que são responsáveis por clivar o (ds)miRNA em uma molécula madura de miRNA. Após a degradação da fita complementar o miRNA juntamente com RISC e AGO1 e 2 está pronto para exercer sua função (Lelandais-Brière et al., 2010).

O miRNA172 em *Arabidopsis* é conhecido por regular genes com domínio APETALA2 (AP2) (Chen, 2004) e sua regulação se dá por meio da inibição da tradução e não por indução da clivagem dos transcritos de seus alvos. Também está envolvido no controle da proliferação de células-tronco ou meristemáticas como um repressor de genes homeóticos florais, por exemplo os genes AP2, responsáveis por regular negativamente o florescimento. Genes homeóticos, também chamados de genes HOX, são reguladores chaves que atuam participando do desenvolvimento de diversas estruturas dos organismos, proporcionando que o mesmo adquira suas particularidades (Duboule, 1992). Em vegetais são os genes que vão determinar o tipo de raiz, característica das flores, estruturação dos caules, entre outros e permitir que cada órgão se desenvolva no momento correto, garantido um adequado crescimento do vegetal.

Em artigo produzido por Aukerman e Sakai em 2003, plantas de *Arabidopsis thaliana* geneticamente mutadas para a via miR172/AP2 demonstraram padrões fenotípicos distintos dos vistos em plantas selvagens. De tal modo que plantas que superexpressavam o miRNA172 demonstravam um florescimento precoce, enquanto plantas com superexpressão de AP2 apresentavam florescimento tardio, ficando evidente o papel exercido pelo miRNA172 no desenvolvimento floral. A figura 6 mostra este papel do miR172 a partir da regulação negativa

de genes como o *TOE1* e *TOE2* com domínio *AP2-like* possibilitando o desenvolvimento floral. Essa regulação se dá conforme aumenta o acúmulo do miRNA172, que atinge o seu máximo de expressão na fase reprodutiva. O acúmulo sofrido por miRNA172 é proporcional a degradação do miRNA156, sendo este encontrado em maior quantidade na fase jovem do vegetal, atuando como um antagonista neste caso pois inibe a transcrição de fatores como SPL 9 e SPL 10 responsáveis, entre outras funções, por induzir a transcrição de miRNA172.

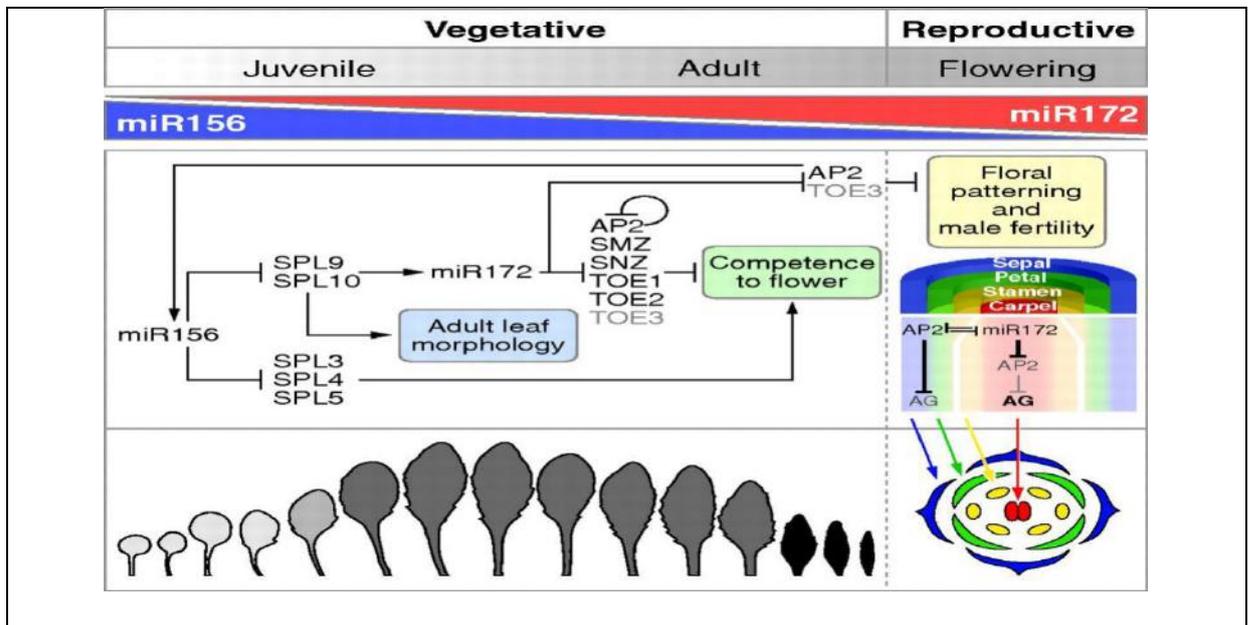


Figura 6: Esquema relacionando a proporção entre acúmulo de miRNA156 e o acúmulo de miRNA172 durante os estágios de desenvolvimento do vegetal (painel superior). No painel intermediário estão esquematizados os miRNAs citados e genes que são regulados por eles, como o com domínio AP2 que são inibidos pelo miRNA172. No painel inferior vemos as transformações morfológicas das folhas de *Arabidopsis thaliana* durante um crescimento natural. Adaptado de Huijser & Schmid 2011

II- JUSTIFICATIVA

Os vegetais desenvolveram diversos mecanismos de defesa contra estresses bióticos, como o ataque por patógenos, e contra estresses abióticos para garantir sua sobrevivência ao longo de seu processo evolutivo. Alguns desses mecanismos envolvem a ativação de cascatas de sinalização que são iniciadas com o aumento da circulação de determinados hormônios, como é o caso do ácido jasmônico, do ácido abscísico e do etileno.

O hormônio etileno é capaz de ativar uma família de fatores transcricionais chamada de *Ethylene Responsive Factors* (ERFs). Estes fatores são conhecidos por estarem envolvidos em diferentes vias de resposta contra esses estresses.

Nosso grupo identificou através de análises biomoleculares um gene que codifica uma proteína ARGINIL t-RNA TRANSFERASE (ATE), localizado no locus de resistência à DA em algodão.

Ao analisar os níveis de expressão de ATE em plantas de algodão susceptíveis à DA é observada uma forte redução da expressão de ATE nas primeiras 24 horas após contato com o agente causal da doença, o CLRDV. Isto, entretanto, não acontece nas plantas de algodão de variedade resistente, aonde este gene é levemente induzido após o contato com o vírus (Fausto et al., em redação). Aparentemente, níveis altos de ATE não são favoráveis ao estabelecimento da infecção. Dados obtidos em uma dissertação de mestrado, recentemente defendida no grupo, mostraram que plantas de arabidopsis superexpressando ATE são altamente resistentes ao CLRDV, enquanto plantas deletadas de ambas as ATE acumulam níveis mais altos do vírus do que as plantas selvagens (Fausto, A.K. S. 2016 e Moura, M. 2018)

Em paralelo foi observado pelo nosso grupo que diversos miRNAs são induzidos e/ou reprimidos durante a infecção de algodão pelo CLRDV, destacam-se entre eles o miRNA172 que é altamente induzido após a infecção (Romanel et al., 2012). Posteriormente observamos que em plantas de algodão susceptíveis à DA, ocorre um aumento de até 750x do miR172 em 24 horas após a infecção. Ao passo que, nas plantas resistentes, os níveis deste miRNA172 permanecem semelhantes aos do controle (dados não publicados).

É amplamente relatado que o miRNA172 regula negativamente a expressão dos fatores transcricionais apétala, membros da família ERF, durante a floração (Chen, 2004). Também é sabido que ERFVII regula positivamente a transcrição de ATE (Gibbs et al., 2016). É, portanto, possível que o miR172 esteja regulando negativamente este fator transcricional levando a uma redução nos níveis de transcritos de ATE nas plantas susceptíveis ao vírus. Como nas plantas

resistentes este microRNA não é induzido, os níveis de ATE permanecem altos, impedindo o estabelecimento da infecção.

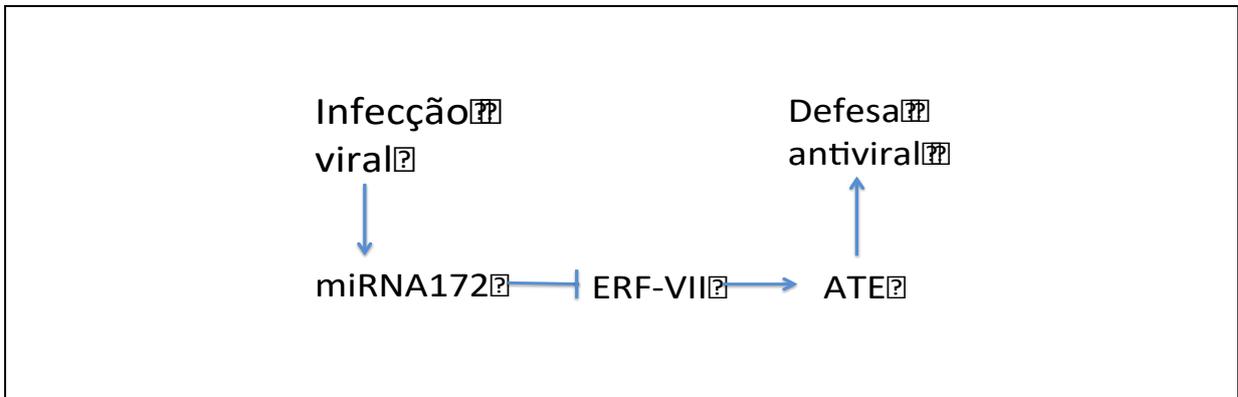


Figura 7: Hipótese do trabalho sugere que uma superexpressão do miRNA172 é induzida pela infecção viral, essa indução inibe a tradução dos transcritos de ERF-VII, que leva a uma diminuição da transcrição de AtATE, interferindo na defesa antiviral.

Para testar esta hipótese, infectaremos plantas de *Arabidopsis* com o CLRDV e analisaremos os níveis de expressão de ERFVII a fim de verificar se de fato ERFVII está sendo reprimido durante as fases iniciais da infecção.

III-OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Avaliar a expressão de alguns genes da subfamília ERF da família AP2/ERF e do miRNA172 maduro em plantas de *Arabidopsis* selvagens e que superexpressam ATE para averiguar possível relação entre os níveis de expressão desses dois genes e a expressão de ATE durante a infecção pelo CLRDV.

3.2-Objetivos Específicos:

- Determinar as taxas de infectibilidade do CLRDV em *Arabidopsis*
- Determinar a expressão gênica miRNA172 em *Arabidopsis thaliana* após a infecção com o CLRDV.
- Determinar a expressão gênica de ATE1 e ATE2 em *Arabidopsis thaliana* após a infecção com o CLRDV.
- Determinar a expressão gênica dos genes RAP2.2, RAP2.3, RAP2.12 em *Arabidopsis thaliana* em após a infecção com o CLRDV.
- Analisar a relação entre os genes RAP 2.2, RAP 2.3, RAP 2.12, miRNA172, ATE1 e ATE2 em plantas saudáveis e infectadas com o CLRDV.
- Analisar a expressão dos genes estudados em resposta a herbivoria do vetor.

IV- METODOLOGIA

4.1- Material vegetal

Para a realização deste trabalho foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia selvagens (“*wild type*” - WT) e plantas transgênicas superexpressando ATE, 35S:ATE1, que contém o gene *ate1*, regido pelo promotor 35S de Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), um promotor constitutivo considerado forte por levar ao aumento de transcritos (Odell, Nagy e Chua, 1985). As sementes foram mantidas em estado de latência à temperatura de 15°C-18°C até sua germinação.

Primeiramente as sementes foram esterilizadas, logo cada variedade foi manipulada separadamente em tubos Eppendorf. O processo consistiu na adição de 250ul de álcool 70% por 5 minutos. O álcool deve ser descartado para em seguida ser adicionado mais 250ul de álcool 100% realizando-se o “*up and down*” com a pipeta, novamente o álcool deve ser descartado. Após a completa evaporação do álcool as sementes foram semeadas em placas de Petri contendo meio MS ½ de força (Murashige & Skoog, 1962). Todo o processo de esterilização ocorre dentro do fluxo laminar. As placas semeadas passaram três dias em uma câmara escura para que as sementes saíssem do estado de dormência. Passado o tempo de quebra de dormência, as placas foram movidas para uma bancada exposta a luz controlada e após duas semanas as plantas já estavam em um tamanho adequado para o transplante para a terra. Quando atingiram um estágio de 4 folhas verdadeiras, as plântulas foram transplantadas para terra:vermiculita (8:1) em potes plásticos e mantidas sob luz LED Full Spectrum 600W ou em BOD com fotoperíodo de 8 horas luz: 16 horas escuro.

4.2- Ensaio de infecção do CLRDV com vetor para determinar a taxa de infectibilidade.

A infecção com o CLRDV foi realizada com pulgões (*Aphis gossypii*) virulíferos, mantidos em casa de vegetação. Após ser observado o adequado crescimento das plantas WT em vaso, cerca de duas a três semanas após o transplante, foram transferidos com o auxílio de pincéis como descrito em Fausto, A.K (2016) trinta pulgões para cada planta de *Arabidopsis*.

Como *Arabidopsis thaliana* não é um hospedeiro natural do CLRDV e buscando otimizar futuros experimentos e proporcionar maior confiabilidade aos testes foi realizado um ensaio de infecção para análise da taxa de infecciosidade do CLRDV em *A. thaliana*. Para alcançar tal objetivo foram utilizadas 20 plantas para realizar o inóculo com CLRDV e 1 planta

para controle não infectada. Ao todo, 21 plantas WT foram utilizadas. As plântulas inteiras foram coletadas em 5 dias após a inoculação a fim de verificar a presença do CLRDV por Nested RT-PCR. As amostras seguiram para o diagnóstico tendo sido armazenadas em freezer -80.

4.3- Ensaio de infecção do CLRDV com vetor para o PCR e tempo real

Para realização do PCR em tempo real foram utilizadas sementes WT e 35S:ATE1, que foram esterilizadas, germinadas e transplantadas como descrito no item 4.1. As duas variedades de plantas foram organizadas em três grupos: Controle, Pulgão e Vírus. O grupo controle corresponde às plantas que não receberam nenhum tipo interferência. O grupo pulgão foi inoculado com pulgões não-virulíferos e o grupo vírus foi inoculado com pulgões virulíferos.

Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas, sendo cada triplicata formada por um pool contendo seis plantas. Os pulgões foram mantidos nas plantas por um período de 24 horas e então foram eliminados com o auxílio de um pincel. As folhas foram coletadas em 12 e 24 horas e 5 dias após o contato com os pulgões (hpi e dpi, respectivamente) e armazenadas em freezer -80°C para dar início a etapa seguinte que é a de analisar a indução ou repressão dos genes já citados no trabalho por PCR em tempo real.

4.4- Extração de RNA e obtenção de c-DNA

Após a coleta as amostras foram maceradas em TRIZOL (Ambiom, Life Technologies Co.) para a extração de RNA total, que seguiu conforme o protocolo comercial do reagente. Para confirmar o grau de pureza, a concentração de moléculas por µl e a qualidade da extração foi utilizado o NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific Co.).

Para a síntese de c-DNA das amostras utilizadas para desenvolver o PCR em tempo real foi utilizado 1 µg de RNA, que passou por um tratamento com a enzima RQ1 RNase-Free DNase (Promega Co.) a fim de evitar contaminação por DNA. Após o tratamento foi realizada uma reação de transcrição reversa (RT) para a produção de c-DNA utilizando a enzima RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Co.) e 100 µM do primer Oligo dT e 100µM do oligonucleotídeo O5R2, que se anela próximo a porção 3' do genoma do CLRDV (Silva et al,2008).

Para realizar a síntese de c-DNA das plantas utilizadas para determinar a taxa de infectibilidade foi utilizado o Kit com a enzima SuperScript III One-Step (Invitrogen) que

possibilita a reação de RT e a primeira reação do NESTED-PCR para o diagnóstico da infecção viral.

4.5- Diagnóstico do CLRDV por meio de NESTED-PCR.

Após a reação de RT-PCR realizada com a enzima SuperScript III One-Step (Invitrogen) o produto obtido dessa reação foi utilizado como molde para uma segunda PCR cujo par de primers se anela em uma região mais interna do gene que codifica o capsídeo viral, e a enzima utilizada, de acordo com a recomendação do fabricante, foi a Taq DNA polymerase (Fermentas Co.) . Na primeira reação foram utilizados iniciadores que se anelam nas regiões flangeadoras mais externas ao gene que codifica o capsídeo viral, são eles o O5R2 e o PL2F. Para a segunda reação são utilizados os iniciadores CPF e CPR e 1 ul do produto da primeira reação como molde (Tabela 1).

A primeira ciclagem ocorreu nas seguintes condições: (1) etapa inicial à 55° por 30 minutos, seguida de 95° C por 5 minutos para desnaturação inicial de estruturas mais complexas que possam haver na solução, seguida de 35 ciclos que contam com (2) com uma etapa inicial de 95°C por 1 minuto para desnaturação, uma etapa que ocorre à 57°C por 1 minuto para anelamento dos iniciadores, e uma à 72° C por 1 minuto para extensão da fita de DNA. E por fim, uma etapa de extensão final à 72°C por 10 segundos. A segunda reação ocorreu dentro das seguintes condições: (1) 95° C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguida de 40 repetições das etapas de desnaturação à 95°C por um minuto, anelamento dos iniciadores à 53°C por 1 minutos e extensão da fita de DNA à 72°C por 1 minuto e extensão final à 72°C por 10 segundos. Apenas o produto da segunda reação é visualizado por meio de uma corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e tampão de corrida Tris Acetato (TAE) 0,5x, com tamanho esperado de 606 bp para amostras consideradas positivas para a infecção.

Tabela 1: Iniciadores utilizados no NESTED-PCR para o diagnóstico viral.

Nome	Sequência	Reação
O5R2	5'-GCAACCTTTTATAGTCTCTCCAAT-3'	1 ^a
PL2F	5'-AACAATTAGGTTTTAAAGTCGAGG-3'	1 ^a
CPR	5'-ATGAATACGGTCGTGAGAAGA-3'	2 ^a
CPF	5'-CTATTTGGATTGTGGAATTGGCAC-3'	2 ^a

Para realizar o diagnóstico das amostras utilizadas para a PCR em tempo real o protocolo foi diferente. Após a extração de RNA total as amostras foram tratadas com a enzima RQ1

RNase-Free DNase (Promega Co.) de acordo com as instruções do fabricante, a fim de eliminar possíveis contaminações por DNA. Em seguida 1 µg do RNA tratado foi utilizado para a síntese de c-DNA que ocorreu com atuação da enzima RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Co.) e dos primers Oligo dT a 100 µM, O5R2 e miRNA172R a 150 nM. E finalmente, para a realização do diagnóstico foi realizado o NESTED-PCR com os primers O5R2 e PL2F a 10 µM na primeira reação e os primers CPF e CPR para a segunda reação (SILVA et al., 2008).

A primeira ciclagem ocorreu nas seguintes condições: (1) etapa inicial à 95° C por 5 minutos para desnaturação inicial de estruturas mais complexas que possam haver na solução, seguida de 40 ciclos que contam com (2) com uma etapa inicial de 95°C por 1 minuto para desnaturação, uma etapa que ocorre à 57°C por 1 minuto para anelamento dos iniciadores, e uma à 72° C por 1 minuto para extensão da fita de DNA. E por fim, uma etapa de extensão final à 72°C por 10 segundos. A segunda ciclagem ocorreu exatamente como o descrito anteriormente.

4.6- Amplificação por PCR em tempo real dos genes miRNA172, ERFVII e *Atate1* e *Atate2*

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, utilizando para a reação de amplificação o kit Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas Co.) de acordo com as orientações do fabricante. Os pares de iniciadores que foram utilizados estão descritos na tabela 2. O termociclador utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems Co.). Os genes constitutivos que foram utilizados são o AtFBox (proteína da família F-box) e At EF1a (fator de alongação 1 a) (Lilly et al., 2011).

As amostras de c-DNA foram diluídas em água MilliQ na proporção de 1:25 para que pudessem ser utilizadas como template do PCR em tempo real. O resultado das reações gera um valor de Ct (Cycle threshold) por reação. Nos valores de Ct são avaliadas as triplicatas técnicas, apenas sendo aceitos os valores de Ct que tenham diferença entre eles abaixo de 0,5, os valores acima foram excluídos. Posteriormente foi realizada a média de Ct entre os valores aceitos e utilizadas para análise da expressão relativa, da mesma forma com os valores de Ct dos genes de referência. O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizado para avaliar a expressão relativa e os valores obtidos mostrados na forma de *fold change* segundo Schmittgen & Livak (2008).

As plantas do grupo Controle (mock) são utilizadas como controle do grupo Pulgão, que recebeu pulgões não-virulíferos. O grupo Pulgão por sua vez serve de controle para o grupo Vírus, que recebeu pulgões virulíferos.

Tabela 2: Iniciadores utilizados para o PCR em tempo real

Gene	Sequência
RAP 2.2 F	5'-TTCGTCTTCACCGCAACTACTAAG-3'
RAP 2.2 R	5'-TTCTTGGCATATGCTGAACCTACC-3'
RAP 2.3 F	5'-ACGTAACTTGGTTGGTGGGATGG-3'
RAP 2.3 R	5'-AACTCACGGCTGAGGAACTCTG-3'
RAP 2.12 F	5'-ACTGAATGGGACGCTTCACTGG-3'
RAP 2.12 R	5'-AGGGTTTGCACCATTGTCCTGAG-3'
miRNA172 F	5'-GCGGCGGAGAATCTTGATGAT-3'
miRNA172 R	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGA GGTATTCGCACCAGAGCCAACATGCAG-3'
AtATE1 F	5'-TAAAACGTGTTGCCCTCCTT-3'
AtATE1 R	5'-TTGCCATCCAAGAACCTTTC-3'
AtATE2 F	5'-CAATCCGCTTGAAAGCAAGT-3'
AtATE2 R	5'-CTCGGCTTCGCATCTAGTTC-3'
AtF-Box F	5'-GGCTGAGAGGTTTCGAGTGTT-3'
AtF-Box R	5'-GGCTGTTGCATGACTGAAGA-3'
At-EF1a F	5'-CACCCTGGAGGTTTTGAGG-3'
At-EF1a R	5'-TGGAGTATTTGGGGGTGGT-3'

V- RESULTADOS

5.1-Ensaio de infecção em *Arabidopsis thaliana* com CLRDV para determinar a taxa de infectibilidade

O único hospedeiro natural descrito para o CLRDV é o algodão. Em função da praticidade do uso da planta modelo *Arabidopsis* para o estudo da interação CLRDV:planta, foi desenvolvido anteriormente em nosso laboratório um protocolo de infecção de *A. thaliana* pelo CLRDV. Na época oito plantas foram inoculadas e todas tiveram a infecção confirmada de forma molecular. Em ensaios subseqüentes, as *Arabidopsis* foram diagnósticas em pools contendo 3-5 plantas em cada e em todos os pools foi possível obter amplificação do capsídeo viral (Fausto, 2016; Oliveira, 2018). Mostramos desta forma que *Arabidopsis* é susceptível ao CLRDV. Entretanto, os resultados relativos às taxas de infectibilidade ficaram insipientes em função do baixo número amostral e/ou das plantas terem sido diagnosticadas em pools.

Em função disto, um ensaio para avaliar a infectibilidade do CLRDV neste modelo foi realizado com um número amostral mais significativo. Para o ensaio da infecção com CLRDV foram utilizadas vinte e uma plantas *Arabidopsis thaliana* do tipo WT, que foram inoculadas com cerca de trinta pulgões virulíferos cada, e uma planta WT que não recebeu nenhum tipo de tratamento foi utilizada como controle negativo da infecção.

As plantas cresceram em meio MS e foram transplantadas após uma semana e três dias para terra. Decorridos 3 semanas elas apresentavam um padrão de crescimento homogêneo e foram inoculadas, com cada indivíduo apresentando tamanhos semelhantes, sendo a média da área foliar igual a 0,64 cm² das plantas infectadas enquanto a planta controle apresentava 0,81 cm² no dia da inoculação (Figura 8). Neste estágio foram inoculadas com pulgões virulíferos e cinco dias depois toda a planta foi coletada para a realização de teste diagnóstico da presença viral via Nested RT-PCR.

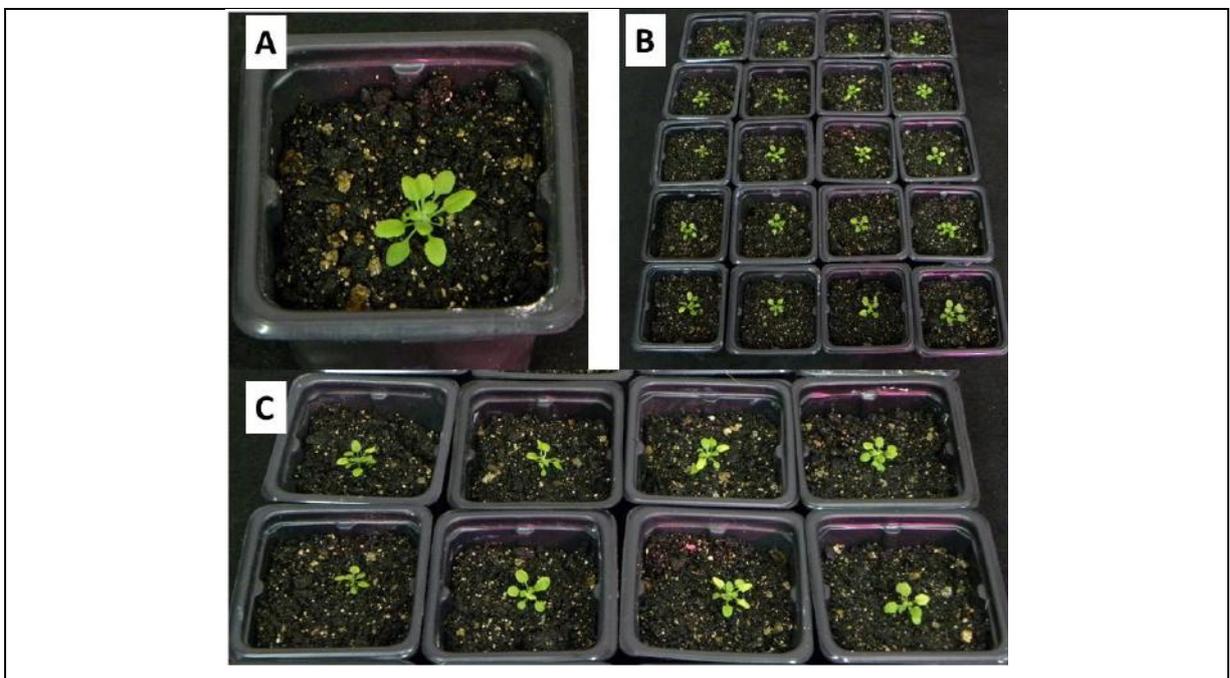


Figura 8: *Arabidopsis thaliana* selvagens no dia da inoculação com CLRDV: A- Planta WT controle. B- Plantas inoculadas com pulgões virulíferos.. C- Detalhe das plantas da segunda e da terceira linhas do grupo inoculado.

No dia da coleta não foi possível observar mudanças fenotípicas decorrentes de uma possível infecção, como folhas enroladas como visto na figura 9.



Figura 9: *Arabidopsis thaliana* selvagens inoculadas com CLRDV no dia da coleta 5dpi: A- Planta controle WT. B- Plantas inoculadas com pulgões virulíferos. C- Detalhe das linhas 4 e 5.

A extração do RNA total foi realizada com o reagente TRIZOL e a qualidade da extração pode ser atestada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% na figura 10. Foi observado que a extração de RNA total de algumas amostras foi bem-sucedida pois podemos ver no gel três bandas distintas e bem definidas, mas em algumas amostras como as amostras 1, 4, 5, 6, 14, 20a revelação demonstrou que a qualidade do RNA não estava ideal, podendo interferir nos resultados seguintes.



Figura 10: Gel de Agarose 0,8% mostrado o resultado da extração de RNA total das amostras inoculadas e dos controles, sendo C+ o de um controle positivo da infecção e C- o controle negativo do experimento.

As amostras de RNA total extraído foram utilizadas para desenvolver reações de RT para obtenção de c-DNA. Esse template foi utilizado para realizar o diagnóstico viral a partir de NESTED-PCR baseado na amplificação da sequência do capsídeo viral.

O diagnóstico demonstrou que 11 em 21 plantas foram infectadas a partir do inóculo com pulgões virulíferos. Como observado na figura 11 ambos os controles positivo e negativo da reação funcionaram. A dificuldade de obtenção de RNA total em quantidade adequada para a realização do experimento influencia diretamente no resultado do diagnóstico da infecção viral, portanto o resultado do diagnóstico foi considerado inconclusivo.



Figura 11: Diagnóstico das 21 por Nested-PCR baseado na amplificação do gene do capsídeo viral (606 pb) do CLRDV de linhagens de *Arabidopsis thaliana* selvagens. As plantas foram coletadas e analisadas após 5dpi. Detalhe em vermelho indicando que nas amostras 12 e 13 um indício de banda positividade.

5.2- Ensaio de infecção em *Arabidopsis thaliana* com CLRDV para PCR em tempo real

Para alcançar o objetivo de analisar a expressão dos genes *Atate1*, *Atate2*, miRNA 172 e os genes subfamília ERF plantas de *A. thaliana* foram germinadas em placa contendo meio MS e as plântulas foram transplantadas para a terra e inoculadas com cerca de 25 dias de idade. Após o transplante transcorreram-se três semanas até que as plantas pudessem ser inoculadas. Como é observado na figura 12 as plantas cresceram de forma adequada, não demonstrando pontos de clorose ou necrose, neste estágio não foi observado a presença de botão floral, o que indicaria uma condição de estresse para plantas com essa idade. Essas plantas foram organizadas em grupos como descrito no item 4.3. O experimento foi realizado em triplicata biológica, e cada replicata contém um pool de seis plantas.

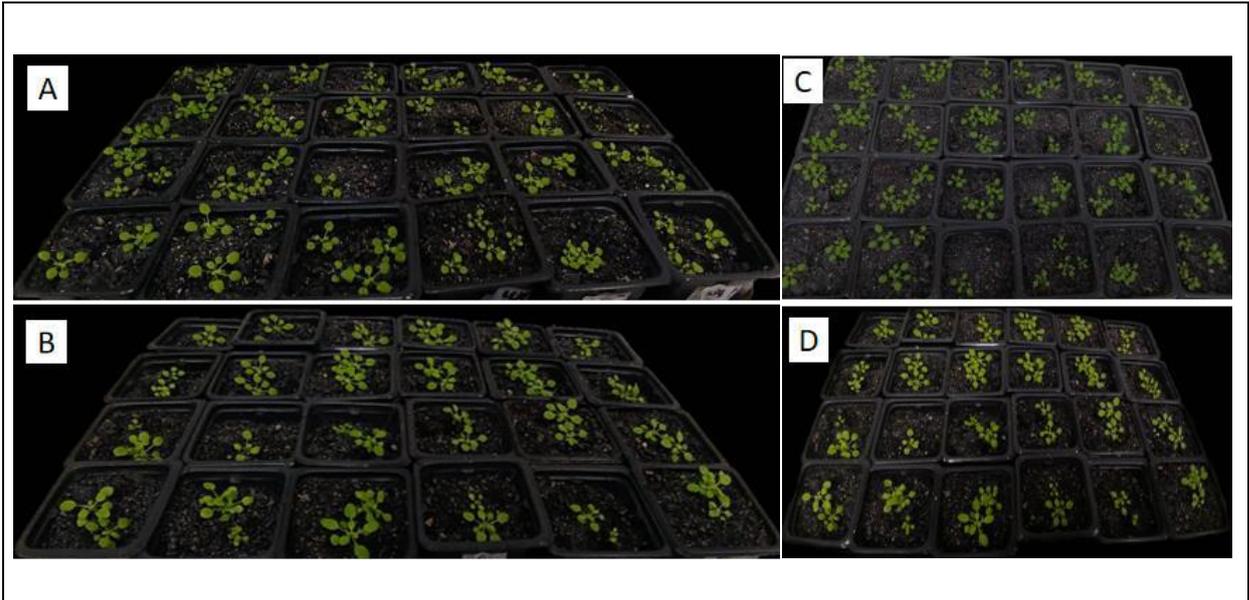


Figura 12: *Arabidopsis thaliana* selvagens e 35S:ATE1 no dia do inóculo com pulgões não virulíferos e virulíferos (carreando CLRDV): A- Plantas WT. B- Plantas 35S:ATE1 . C- Plantas WT visão superior. D- Plantas 35S:ATE1 visão superior.

Após a coleta das folhas em pools, de acordo com a divisão feita, a extração do RNA total foi realizada com o reagente TRIZOL e a qualidade da extração pode ser atestada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% e quantificação em Nanodrop, dados não mostrados. Essas amostras foram utilizadas para obtenção de c-DNA e este foi utilizado para realizar o diagnóstico das amostras e como template para a amplificação por PCR em tempo real.

O resultado obtido e exposto na figura 13 corresponde ao diagnóstico por NESTED-PCR e é observado por meio de eletroforese em gel de Agarose 0,8%. As amostras de folhas selvagens de *A. thaliana* inoculadas com o vetor infectado por CLRDV foram diagnosticadas de forma positiva (Figura 13), com a amplificação do fragmento de 606bp, correspondente ao gene do capsídeo viral. Enquanto as amostras obtidas das plantas inoculadas apenas com pulgões não virulíferos ou sem tratamento (controles) foram confirmadas com o resultado negativo para o diagnóstico viral. Esse resultado foi observado em todos os tempos do teste.

Nas plantas 35S:ATE1, que superexpressam ATE1, inoculadas com CLRDV teve o resultado do diagnóstico viral negativo em todos os tempos testados, o que indica uma resistência à infecção ao CLRDV. As amostras inoculadas com pulgões não virulíferos e sem tratamento confirmaram o resultado negativo para a presença do vírus CLRDV (Figura 13).

Portanto, com o resultado do diagnóstico viral em de *A. thaliana* concluiu-se que a variedade WT é susceptível ao CLRDV, enquanto que a variedade 35S:ATE1 é resistente a esta infecção independente do tempo testado.

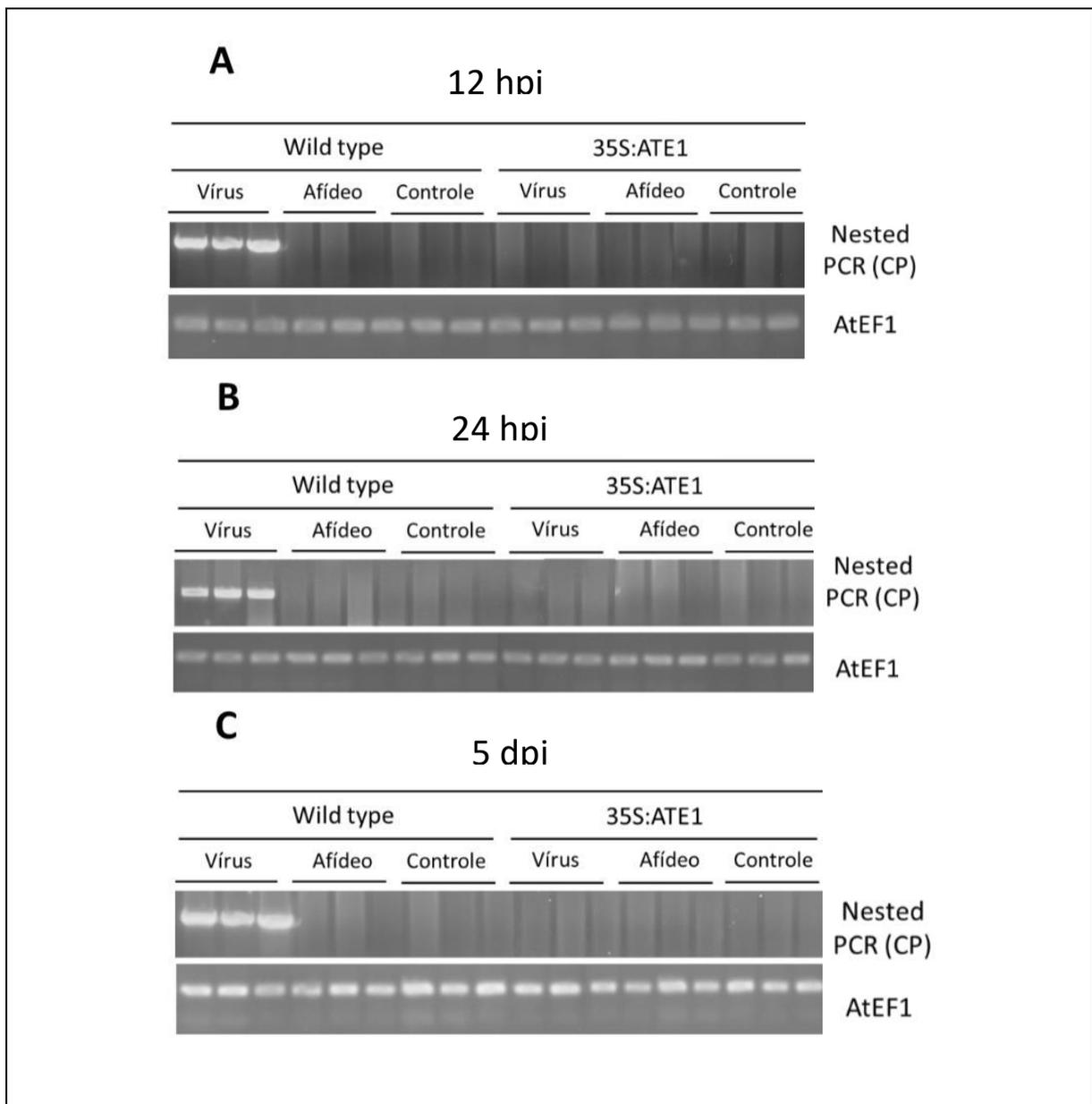


Figura 13: Diagnóstico por Nested-PCR baseado na amplificação do gene do capsídeo viral (606 pb) do CLRVDV de linhagens de *Arabidopsis thaliana* selvagens e 35S:ATE1. A: plantas coletadas e analisadas após 12 horas da inoculação (12hpi); B: plantas coletadas após 24 horas da inoculação de pulgões (24hpi); C: plantas coletadas 5 dias após a infecção (5dpi). Vírus: plantas inoculadas com pulgão *Aphis gossypii* com CLRVDV; Afídeo: plantas inoculadas com pulgões não virulíferos; Controle: plantas não inoculadas. AtEF1: RT-PCR baseado no fator de alongação de *Arabidopsis*, utilizado como controle interno. A visualização foi realizada sob luz UV em gel de agarose 0,8%.

5.3- Análise dos níveis de expressão de AtATE1, AtATE2 e miR172 ao longo da infecção viral

Os resultados de PCR em tempo real mostraram que nas primeiras doze horas após a infecção o nível dos transcritos da proteína ATE 1 sofrem inibição em plantas WT. A repressão se mantém nas primeiras vinte e quatro horas, ainda que menos acentuada, começando a voltar

aos níveis de expressão próximo ao controle em cinco dias após a infecção. O mesmo padrão não é visto em plantas 35S:ATE1 que mantêm os níveis de indução da expressão de ATE 1 nos três pontos estudados.

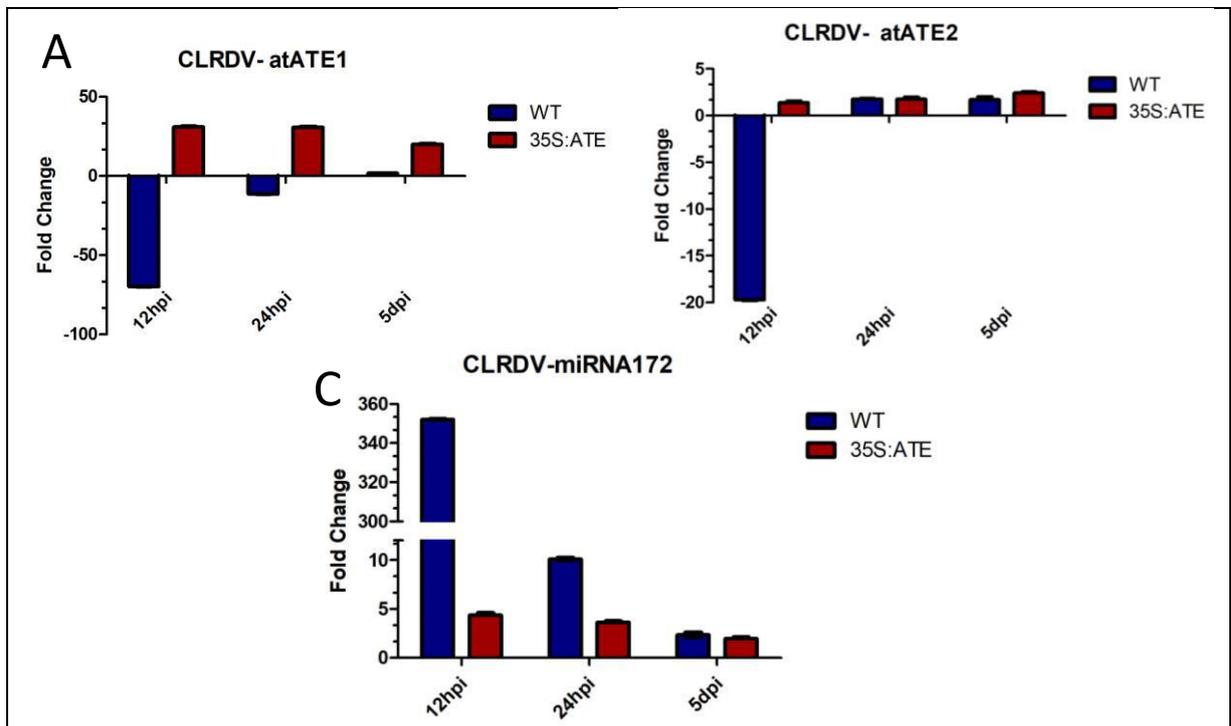


Figura 14: Expressão dos genes ATE1, ATE2 e miR172 em plantas selvagens (Wild type – Wt) e 35S:ATE1 de *A. thaliana* inoculadas com pulgões *Aphis gossypii* virulíferos A: expressão do gene Arginil t-RNA Transferase 1 (ATE1); B: níveis de expressão do gene Arginil t-RNA Transferase 2 (ATE2); C: expressão do gene miRNA172 maduro. Para a análise da expressão foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Amostras de plantas de *A. thaliana* que entraram em contato com pulgões não virulíferos foram utilizadas como controles. As expressões desses genes foram normalizadas com os genes constitutivos AtEF1 e AtFbox, que foram identificados previamente como bons normalizadores (Lilly et al, 2011). Hpi: horas após a inoculação e Dpi: dias após a inoculação.

A expressão relativa de ATE 2, embora de forma um pouco menos acentuada quanto a expressão de ATE 1, também é reprimida nas primeiras doze horas. Uma indução começa a ser vista em vinte e quatro horas após a infecção e em cinco dias a expressão se mantém. Em plantas 35S:ATE1 não é possível observar uma repressão do mRNA de ATE 2 nas primeiras doze e vinte e quatro horas, que mantém seus níveis próximos ao do controle inoculado apenas com o pulgão sem vírus. Em cinco dias após a infecção, uma leve indução deste transcrito é observada.

Atuando de forma oposta ao gene do miRNA172 em plantas WT se encontra em estado de superexpressão nas primeiras doze horas de infecção, chegando a atingir um nível de expressão 350x maior que o observado para o controle. Passando a ser 10 e 2 vezes mais expresso que no controle nos dois pontos de análise seguintes. Em plantas 35S:ATE1 destaca-

se a indução de aproximadamente 5x nas primeiras doze horas após a infecção seguida de níveis um pouco mais baixos nos pontos seguintes.

5.4- Análise dos níveis de expressão de membros da subfamília ERVII ao longo da infecção viral

A fim de avaliar se membros da subfamília de fatores transcricionais ERFVII encontram-se reprimidos pelo miR172, os níveis de expressão de três ERFVII foram analisados.

Para o gene RAP 2.2 vemos que o padrão de expressão durante a infecção é semelhante ao padrão do gene da ATE1, sendo reprimido em aproximadamente 30x nas primeiras doze horas de infecção em plantas WT. Os níveis dessa repressão são menos intensos em vinte e quatro horas após a infecção, sendo recuperados em cinco dias após a infecção.

Ao analisarmos o padrão de expressão do mesmo gene em plantas 35S:ATE1 observamos que não há alterações drásticas de indução/repressão nas primeiras doze horas de infecção estando sua expressão próxima de 1x. No entanto, ocorre uma repressão em vinte e quatro horas de infecção com magnitude de 40x, que não corresponde com a expressão de ATE1 e ATE2. E em cinco dias de infecção já é possível observar uma indução do gene em torno de 17x.

Em plantas WT, o gene RAP 2.3 encontra-se reprimido em todos os tempos de verificação, sendo sua repressão nas primeiras doze horas bastante significativa, atingindo um nível de inibição de 160x em comparação com as plantas controles que receberam pulgões não virulíferos. Os níveis de inibição em vinte e quatro horas e cinco dias após o inóculo são de 14x e 7x, respectivamente. Nas plantas 35S:ATE1 vemos uma repressão em vinte e quatro horas que atinge a marca de 21x, diferentemente dos pontos de análise de doze horas após inóculo e cinco dias após inóculo que apresentam indução de 24x e 35x em cada ponto mencionado.

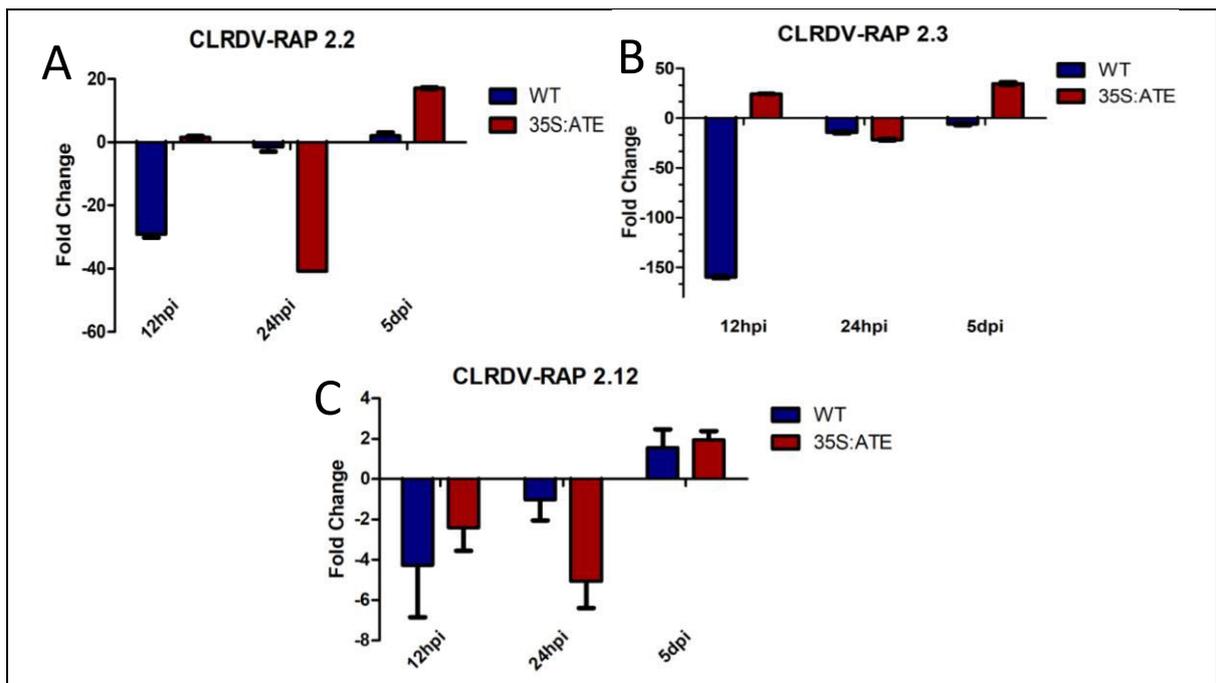


Figura 15: Expressão dos genes RAP 2.2, RAP 2.3 e RAP 2.12 em plantas selvagens (Wild type – Wt) e 35S:ATE1 de *A. thaliana* inoculadas com pulgões *Aphis gossypii* virulíferos. A: expressão do gene RAP 2.2; B: níveis de expressão do gene RAP 2.3; C: expressão do gene RAP 2.12. Para a análise da expressão foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Amostras de plantas de *A. thaliana* que entraram em contato com pulgões não virulíferos foram utilizadas como controles. As expressões desses genes foram normalizadas com os genes constitutivos AtEF1 e AtFbox, que foram identificados previamente como bons normalizadores (Lilly et al, 2011). Hpi: horas após a inoculação e Dpi: dias após a inoculação.

O gene RAP 2.12 nas *Arabidopsis thaliana* selvagens pareceu ser o menos afetado tendo um nível de repressão de 4x nas primeiras doze horas, embora com um desvio de 2,58, diminuindo o valor em vinte e quatro horas para 1x e sendo expresso em cinco dias após o inóculo em torno de 1x. As plantas que superexpressam ATE demonstraram inibição dos transcritos do gene RAP 2.12 nas primeiras doze e vinte e quatro horas após o inóculo de aproximadamente 2x e 5x, já em cinco dias foi observado uma indução de aproximadamente 2x.

Portanto todos os membros da família ERFVII foram reprimidos em vinte e quatro horas de infecção, sendo a repressão de RAP 2.2 a mais ressaltada.

5.5- Análise dos níveis de expressão de AtATE1, AtATE2 e miR172 após herbivoria

O efeito da herbivoria causada pelo vetor *Aphis gossypii* também foi considerado para as análises das expressões pois a abrasão provocada pela alimentação do inseto pode levar a modulação de genes de defesa que podem ser relacionados com a resposta a patógenos.

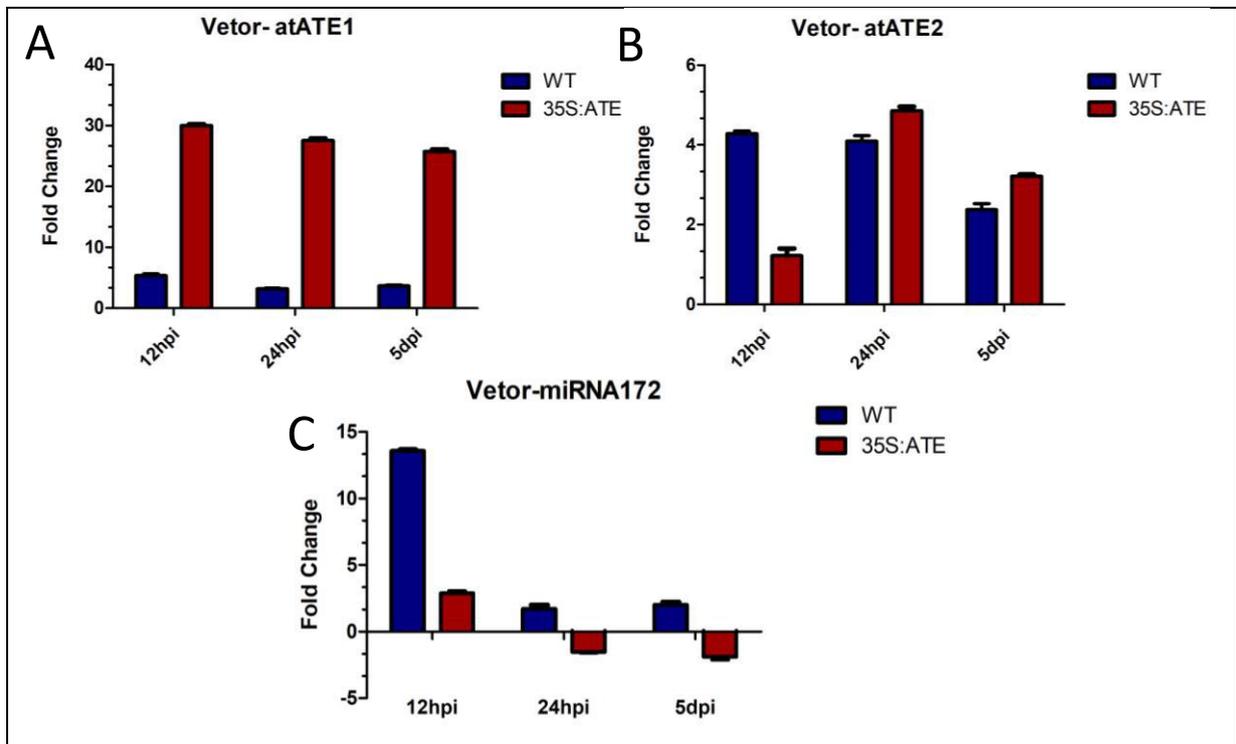


Figura 16: Expressão dos genes ATE1, ATE2 e miR172 em plantas selvagens (Wild type – Wt) e 35S:ATE1 de *A. thaliana* inoculadas com pulgões *Aphis gossypii*. A: expressão do gene Arginil t-RNA Transferase 1 (ATE1); B: níveis de expressão do gene Arginil t-RNA Transferase 2 (ATE2); C: expressão do gene miRNA172 maduro. Para a análise da expressão foi utilizado o método 2^{-ddCt} . Amostras de plantas de *A. thaliana* que não receberam nenhum tipo de tratamento foram utilizadas como controles. As expressões desses genes foram normalizadas com os genes constitutivos AtEF1 e AtFbox, que foram identificados previamente como bons normalizadores (Lilly et al, 2011). Hpi: horas após a inoculação e Dpi: dias após a inoculação.

Neste caso vemos que a expressão de ATE 1 é induzida tanto WT quanto em 35S:ATE1, sendo os níveis de indução 5x, 3x e 3x em doze, vinte e quatro horas após a infecção e cinco dias após a infecção, em plantas selvagens e 30x, 27x e 25x nas plantas mutantes, respectivamente.

Os níveis de indução de ATE 2 em WT são muito parecidos, sendo eles 4x maiores nas primeiras doze e vinte e quatro horas após o inóculo e de 2x em cinco dias após a adição de pulgões não virulíferos. Nas plantas 35S:ATE1 obtivemos em vinte e quatro horas o nível mais alto de expressão do gene da ATE2 neste grupo, estando o gene aproximadamente 5x mais

induzido do que em plantas controle (mock). Nos outros dois tempos o gene atinge níveis de expressão de 1x e 3x para doze horas e 5 dias após a infecção, respectivamente.

O miRNA172 é induzido nas primeiras 12hpi cerca de 10x e o valor dessa indução decai para 1,7x e 2x em 24hpi e 5dpi, em plantas WT. E em plantas 35S:ATE1 o gene só encontra-se induzido nas primeiras 12hpi, atingindo um patamar de aproximadamente 3x, e está reprimido nos pontos de análise seguintes com os valores de 1,5x e 1,8x muito próximos.

5.6- Análise dos níveis de expressão de membros da subfamília ERVII após herbivoria

Em oposição ao que foi observado na presença do vírus, os níveis de expressão dos genes ERFVII considerando apenas a alimentação do vetor nas primeiras vinte e quatro horas apresentam mais momentos de indução do que de repressão.

Para o gene RAP 2.2 em plantas selvagens apenas foi visto repressão em 5dpi com valor muito próximo de 1. Nos outros pontos de coleta vemos uma acentuada indução em 12hpi que atinge um nível de 30x, e que decai em 24hpi para 2x. No grupo 35S:ATE1 vemos que este gene apresenta uma superexpressão em 24hpi de 58x, sendo este um aumento abrupto se comparado com o ponto de 12hpi que apresenta uma repressão de aproximadamente 5x, constituindo uma queda igualmente drástica quando comparado com expressão do mRNA em 5dpi que sofre uma repressão de 10x em relação ao grupo controle.

O gene RAP 2.3 é induzido em plantas WT na presença do vetor não virulífero nas primeiras 12 e 24 hpi com valores de 33x e 48x e reprimido em 5dpi com valor muito próximo do controle. As plantas 35S:ATE1 utilizadas demonstraram um valor de expressão próximo do basal em 12 hpi, aumentando em 24hpi para 14x e sofrendo repressão em 5dpi no nível aproximado de 21x.

Finalmente, os níveis de expressão do RAP 2.12 quando influenciados apenas pelo pulgão se encontram muito próximos do basal nas primeiras 12 e 24 hpi sendo a indução de 1.1x e 1.8x, respectivamente, e reprimido em de 4.3x em 5dpi. Já as plantas que superexpressam ATE apresentaram indução em 12hpi de magnitude 1.3x, semelhante ao resultado em WT, indução em 24hpi com valor de 12x em relação ao controle e repressão em 5dpi atingindo um nível de 11x em relação ao controle.

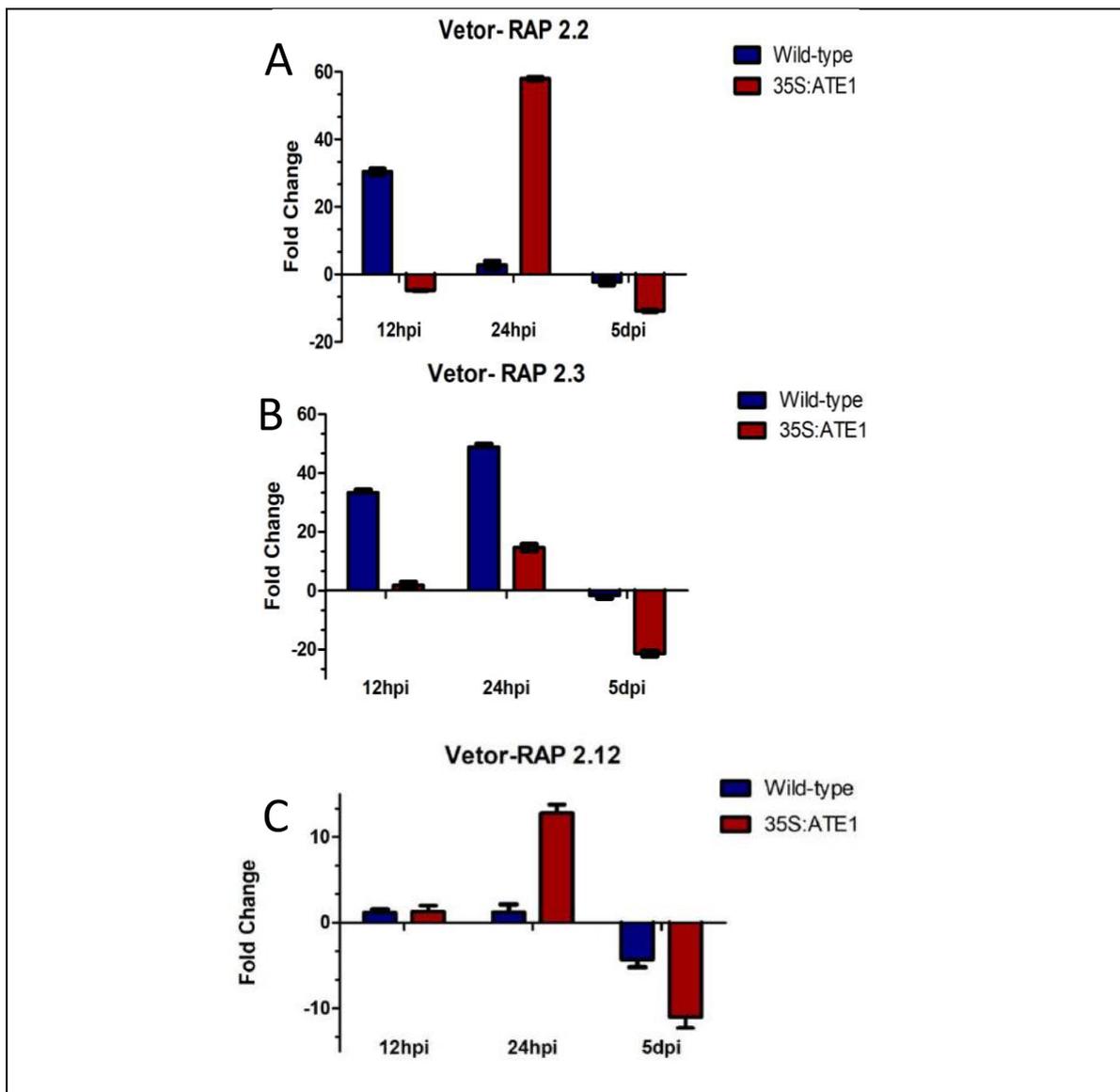


Figura 17: Expressão dos genes RAP 2.2, RAP 2.3 e RAP 2.12 em plantas selvagens (Wild type – Wt) e 35S:ATE1 de *A. thaliana* inoculadas com pulgões *Aphis gossypii*. A: expressão do gene RAP 2.2; B: níveis de expressão do gene RAP 2.3; C: expressão do gene RAP 2.12. Para a análise da expressão foi utilizado o método 2^{-ddCt} . Amostras de plantas de *A. thaliana* que não receberam nenhum tipo de tratamento foram utilizadas como controles. As expressões desses genes foram normalizadas com os gene constitutivos AtEF1 e AtFbox, que foram identificados previamente como bons normalizadores (Lilly et al, 2011). Hpi: horas após a inoculação e Dpi: dias após a inoculação.

VI- DISCUSSÃO

Os vírus que acometem vegetais são importantes patógenos, juntamente com bactérias e fungos (Marchi et al., 2016), e podem levar a sérias perdas econômicas de diversos tipos de cultivos agrícolas. Seu potencial de disseminação através de vetores torna mais difícil o manejo dessas culturas. O conhecimento a respeito dos mecanismos de infecção utilizado por esses patógenos se torna essencial para o combate à suscetibilidade de algumas espécies de vegetais.

A utilização de plantas do tipo *Arabidopsis thaliana* para esse tipo de estudo se justifica por seu crescimento relativamente rápido em comparação com outras espécies de vegetais, a vasta gama de informação sobre seu genoma, completamente sequenciado em 2000, e pela relativa facilidade de se obter mutantes da espécie[]. Em um trabalho anterior do grupo foi possível estabelecer um protocolo de infecção de *Arabidopsis* pelo polerovírus CLRDV. Neste trabalho, aprofundamos a avaliação da infectividade do CLRDV em *Arabidopsis*. Como o observado, plantas selvagens dessa espécie foram suscetíveis a infecção pelo CLRDV por meio de seu vetor *Aphis gossypii*, com uma taxa de infectibilidade de 51%, esse valor se encontra muito próximo ao obtido pelo grupo da Dra. Distéfano em 2013, que utilizou clone infeccioso para inocular plantas de *A. thaliana* ao invés do vetor viral, no entanto, neste experimento foram utilizadas apenas 8 plantas, enquanto no presente trabalho foram utilizadas 21 plantas. Mas devido a dificuldade de obtenção de RNA total de boa qualidade e a utilização de uma nova enzima (SuperScript III One-Step) e que não possui protocolo estabelecido para utilização em amostras de *Arabidopsis thaliana*, pode ser necessário a realização de novos testes para confirmar o resultado obtido neste experimento. Em experimentos anteriores do grupo a taxa encontrada foi de 100% em teste realizado com 8 plantas WT, mas essa divergência não inviabiliza os resultados dos experimentos realizados em pool, já que as plantas utilizadas foram diagnosticadas.

Arabidopsis apresenta dois genes que codificam a proteína ATE, são eles o *Athate1* e o *Athate2*, não possuindo diferenças significativas entre eles. A proteína ATE já foi relacionada a resposta de defesa contra patógenos bacterianos e fúngicos (Marchi et al., 2016), além de ser uma importante proteína responsável por integrar diversas vias e participar da degradação de proteínas via proteassoma pelo *N-end rule*. Ao se obter plantas transgênicas dessa planta capazes de superexpressar a proteína ATE (chamados de 35S:ATE1) foi observado que a infecção não se estabelece como ocorre em plantas selvagens (WT)(Figura 13).

Em experimentos anteriores do grupo foi realizada a análise da expressão do gene *Ghate* (CBD2) em plantas de *Gossypium hirsutum* suscetíveis, variedade FM, e resistentes, variedade

DO, à infecção pelo CLRDV transmitido pelo vetor *Aphis gossypii*. Foi observado que em plantas suscetíveis ocorre a repressão deste gene em 12 e 24 horas após a inoculação do vírus (hpi). Enquanto que em plantas resistentes foi observado à indução de *Ghate* em 12hpi. Essa diferença de indução do gene *Ghate* pode ser importante para ativar a defesa antiviral e dificultar o estabelecimento da infecção.

Já é sabido que essa proteína pode ser regulada por fatores transcricionais com domínio APETALA 2 da subfamília ERF VII, bem como pode regular a expressão desses fatores, mantendo assim uma relação complexa que deve ser bastante controlada para manutenção da homeostase celular (Asahina et al., 2011). Os resultados obtidos por meio da utilização da técnica de PCR em tempo real demonstraram que frente a uma infecção por CLRDV os transcritos tanto de ATE 1 quanto ATE 2 sofreram modulação quando comparadas ao grupo controle (mock), e que a repressão em 12hpi foi comum para os dois genes, podendo o gene voltar a ser induzido ou não nas horas seguintes de infecção (Figura 14) como foi relatado no item “Resultados”, sendo este resultado semelhante ao que foi encontrado em algodão por Fausto em 2016. Como plantas que superexpressam ATE são resistentes à infecção e seus níveis de expressão continuam altos após a infecção pelo CLRDV, podemos inferir que a repressão de ATE nas primeiras horas de infecção é essencial para o estabelecimento de uma infecção consistente.

Os pulgões além de serem insetos muito encontrados no Brasil (Michelotto & Busoli, 2003a) são capazes de transmitir CLRDV em diversas fases de seu ciclo de vida (Michelotto & Busoli, 2003b). Possuem estiletos, estruturas finas em forma de agulha associadas ao aparelho bucal do inseto, que os auxiliam na alimentação atingindo o tecido vascular do hospedeiro (Westwood e Stevens, 2010). Dessa forma, apesar de causar poucos danos mecânicos ao hospedeiro podem ativar algumas defesas alterando a circulação dos principais hormônios vegetais como o ácido jasmônico, ácido salicílico, e etileno (Westwood e Stevens, 2010), que são importantes ativadores da resposta basal de defesa contra patógenos (Bari, 2009). Essa relação pode explicar o porquê de a herbivoria do vetor no experimento apresentado neste documento levar a uma indução nos genes ATE1 e ATE2 tanto em plantas WT quanto em 35S:ATE1.

Dentre os representantes da família ERF-VII foi notório que tanto RAP 2.2 quanto RAP 2.3 e RAP 2.12 sofreram inibição nas primeiras doze horas após a inoculação, mesmo que em intensidades diferentes. Dos três, o mais afetado foi o RAP 2.3 com um nível de inibição de aproximadamente 150x em plantas selvagens infectadas pelo CLRDV. E o menos afetado foi o

RAP 2.12 sendo o que obteve a melhor recuperação em 5 dias após o inóculo sendo induzido em quase 2x mais que em plantas controle.

Em artigo publicado em 2003 de autoria de Aukerman, M.J e Sakai, H. a relação entre a regulação da floração e da maturação dos órgãos florais pelo miRNA172 e seus genes alvo é discutida, sendo estes alvos os genes APETALA-2-like, que inclui a subfamília AP2. O trabalho associa uma superexpressão de *miRNA172* a uma regulação negativa de dois genes AP2-like, *TOE1* e *TOE2*, que ocasiona uma regulação negativa de outros genes com domínio AP2, plantas que superexpressam esse miRNA e por consequência possui uma deficiência na expressão de seus genes alvo demonstram um florescimento precoce e defeito na identidade dos órgãos florais. Nossos resultados demonstraram a mesma relação, pois em todos os momentos em que houve um aumento significativo na expressão de miRNA172 devido a infecção viral houve uma queda na expressão dos genes da família ERF-VII, que também possuem o domínio AP2. Estas alterações poderiam levar a um fenótipo de florescimento precoce e órgãos defeituosos. Entretanto, não foi observado florescimento precoce em nossa avaliação dos sintomas 30 dpi, apesar de alterações no desenvolvimento das folhas terem sido observadas.

Por outro lado, quando houve aumento da expressão do miRNA172 em 10x, devido a presença de vetores não virulíferos, as expressões dos respectivos genes de ERF-VII não sofreram repressão tão drástica quando comparado ao caso anterior. Estes dados indicam que para que a expressão de ERF-VII e conseqüentemente ATE 1 e ATE 2 seja prejudicada é necessário que haja uma expressão exacerbada de miRNA172.

O grupo 35S:ATE1 sofreu repressão em RAP 2.2, RAP 2.3 e RAP 2.12 em 24 hpi na presença de CLRDV, que não resultou diretamente em uma repressão dos transcritos de ATE 1 e ATE 2, sendo detectado ainda uma indução destes, principalmente de ATE 1, possibilitando a manutenção da resistência a infecção viral em plantas que superexpressam ATE. Esse padrão encontrado pode ser em decorrência da utilização do promotor 35S originário de CaMV, já que este não possui relação com o promotor do gene endógeno de *Arabidopsis thaliana* que é regulado por ERF-VII. Segundo Marchi e colaboradores (2016) a transgênica recebeu a construção 35S:ATE1 por meio de inserção sítio dirigida dentro do gene *AtATE1* o que torna inviável a expressão de ATE1 endógeno.

Os dados obtidos quando relacionados indicam que assim como é encontrado na literatura o miRNA172 pode atuar inibindo de forma pós-transcricional genes com domínio AP2, incluindo os genes da subfamília ERF, especificamente o grupo VII, que é conhecido por regular a expressão de ATE. Assim como foi relatado no estudo em *Gossypii hirsutum* o

miRNA172 atinge um nível de superexpressão elevado nas primeiras 12hpi, em variedade de algodão suscetível esse nível foi de 750x enquanto em *Arabidopsis thaliana* selvagens foi de 350x. Essa indução coincidiu com uma diminuição dos transcritos de ATE1 e ATE2, em *Arabidopsis thaliana* em cerca de 60x e 20x, o mesmo ocorreu em plantas de algodão suscetível quando analisados os transcritos de CBD2.

De acordo com os nossos resultados ficou demonstrado que essa repressão de ATE ocorreu devido a uma inibição dos fatores transcricionais capazes de ativar a transcrição dos genes codificantes da proteína, são eles os: RAP 2.2, RAP 2.3 e RAP 2.12. O miRNA172 pode ser o regulador chave dessa modulação. Além disso, a proteína ATE, que já foi relacionada com a resistência à patógenos bacterianos e oomicetos, também pode assumir papel fundamental na resistência a infecções virais já que plantas transgênicas superexpressando esta proteína se mostraram resistentes a infecção por CLRDV, necessitando de experimentos utilizando outros tipos virais para que se possa concluir está análise.

VII- CONCLUSÕES

- Embora não seja o hospedeiro natural do CLRDV, por meio da utilização do vetor viral, é possível que *Arabidopsis thaliana* sejam infectadas, validando todo o estudo referente a infecção pelo CLRDV nesse organismo modelo.
- *Arabidopsis thaliana* selvagens são suscetíveis ao CLRDV mas plantas dessa espécie, que superexpressam a proteína ATE, são resistentes a infecção.
- O CLRDV causa modulação na expressão do miRNA172. Ao que parece sua forte indução favorece a infecção em plantas selvagens.
- Para uma infecção bem-sucedida ATE precisa estar reprimida nas primeiras 12 horas de infecção, como já havia sido observado em algodão.
- A indução do miRNA172 presente na variável 35S:ATE1 não é suficiente para reprimir a expressão de ATE1 ou ATE2, independente do curso da infecção.
- Os genes RAP 2.2 e RAP 2.3 são os mais afetados pela infecção do CLRDV, sendo necessário outros experimentos para concluir quais dos genes testados possui papel protagonista na regulação de ATE.

V-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrofoglio, Y. C., Delfosse, V. C., Casse, M. F., Hopp, H. E., Kresic, I. B., Distéfano, A. J., (2017) Identification of a new cotton disease caused by an atypical Cotton leafroll dwarf virus in Argentina. *Phytopathology*, 107, pg. 369-376.
- Ambros, V. (2003) MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell.*, v. 113,N. 6, pg. 673-676.
- Asahina, M., Azuma, K., Pitaksaringkarn, W., Yamazaki, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Okada, K., Nishimura, T., Koshiba, T., Yokota, T., Kamada, H., Satoh, S., (2011). Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis* PNAS.,108,16128-16132.
- Ashoub, A., Rohde, W., Prüfer, D. (1998). In planta transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. *Nucleic Acids Research*, 26, 420-426.
- Aukerman, M. J., Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, 15, 2730-2741.
- Bari, R., Jones, J.D. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 2009 Mar; 69(4):473-88.
- Cauquil, J. & M. Vaissayre. 1971. La "maladie bleue" du cotonnier en Afrique: Transmission de cotonnier a cotonnier par *Aphis gossypii* Glover. *Coton Fibres Trop.* 26: 463-466.
- Chen, H., Je, J., Song, C., Hwang, J.E., Lim, C.O., (2012) A proximal promoter region of *Arabidopsis* DREB2C confers tissue-specific expression under heat stress. *J Integr Plant Biol.*, 54, 640-551.
- Chen J, Vandelle E, Bellin D, Delledonne M. (2014). Detection and function of nitric oxide during the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*: where there's a will there's a way. *Nitric Oxide* 43: 81–88.
- Chen, X. (2004). A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* Flower Development. *Science*, v. 303, n. 5666, p. 2022-2025.
- Cogoni C., Macino G. (2000). Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev.*, v. 10, n.6, pg. 638-643.
- Cogoni C., Irelan J.T., Schumacher M., Schmidhauser T.J., Selker E.U., Macino G. (1996). Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* 1996 Jun 17; 15(12): 3153–3163.
- Corrêa, R. L., Silva, T. F., Simões-Araújo, J. L., Barroso, P. A., Vidal, M. S., Vaslin, M. F. (2005). Molecular characterization of a virus from the family Luteoviridae associated with cotton blue disease. *Arch. Virol.*, v. 150,n. 7, pg. 1357-1367.
- Costa AS, Carvalho AMB (1962) Moléstias de vírus do algodoeiro. *Bragantia* 21(2): 50–51

- Costa AS, Forster R (1938) Nota preliminar sobre uma nova molestia de virus do algodoeiro – mosaico das nervuras. Boletim Técnico do Instituto Agrônomo de Campinas 51: 11
- Costa, D. (1972). O pulgão em evidência. *Divulgação Agrônômica*. Scielo 32, 19-22.
- Distéfano, A. J., Bonacic Kresic, I., & Hopp, H. E. (2010). The complete genome sequence of a virus associated with cotton blue disease, cotton leafroll dwarf virus, confirms that it is a new member of the genus Polerovirus. *Archives of Virology*, 155(11), 1849–1854.
- Domitrovic, T., Fausto, A. K., Silva, T., Romanel, E. & Vaslin, M. (2016). Plant arginyltransferases(ATEs). *Genetics and Molecular Biology*, 2016.
- Duboule, D., Izpisúa-Belmonte, J. C. (1992). Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb. *Dev. Biol.*, 152, 26-36.
- Fang, D. D.; Xiao, J.; Canci, P. C. & Cantrel, R. G. (2009) A new SNP haplotype associated with blue disease resistance gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theor Appl Genet*, 11.
- Fang, D. D.; Xiao, J.; Canci, P. C. & Cantrel, R. G (2010) A new SNP haplotype associated with blue disease resistance gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik*, 120, 5, 943–953.
- 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.
- França, N. R., Júnior, D. M., Lima, A. B., Pucci, F., Andrade, L. E., Silva, N. P. (2010). Interferência por RNA:Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. *Rev Bras Reumatol.*, v.50, n.6, pg. 695-709
- Gasch, P.; Fundinger, M.; Müller, J.T.; Lee, T.; Bailey-serres, J.; Mustroph, A. (2015)Redundant ERF-VII transcriptionfactors bind an evolutionarily-conserved cis-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* , 28, 160–180.
- Gibbs, D.J.; Lee, S.C.; Isa, N.M.; Gramuglia, S.; Fukao, T.; Bassel, G.W.; Correia, C.S.; Corbineau, F.;Theodoulou, F.L.; Bailey-Serres, J.:(2011) Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* , 479, 415–418.
- Gibbs, D.J., Bacardit, J., Bachmair, A., Holdsworth, M.J. (2014) The eukaryotic N-end rule pathway: conserved mechanisms and diverse functions. *Trends Cell Biol.*, v. 24, n.10, pg.603-611.
- Gibbs1, D. J., Bailey, M., Tedds, H. M. Holdsworth, M. J. (2016) From start to finish: amino-terminal protein modifications as degradation signals in plants. *New Phytologist*, 211: 1188–1194.
- .Graciet, E., Walter, F. Ó’Maoiléidigh, D.S., Pollmann, S., Meyerowitz, E.M., Varshavsky, A., Wellmer, F. (2009). The N-end rule pathway controls multiple functions during Arabidopsis shoot and leaf development.

- Graciet E, Mesiti F, Wellmer F. 2010. Structure and evolutionary conservation of the plant N-end rule pathway. *Plant Journal* 61: 741–751
- HAO, D. et al. (1998) Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene responsive element binding factor (ERF domain) in plants. 1. *Biological Chemistry*, Berlin, v. 273, p. 26857-26861.
- Holman, T. J., Jones, P.D., Russell, L., Medhurst, A., Tomá, S. U., Talloji, P., Marquez, J., Schmuths, H., Tung, S., Taylor, I., Footitt, S., Bachmair, A., Theodoulou, F. L., Holdsworth, M. J. (2009). The N-end rule pathway promotes seed germination and establishment through removal of ABA sensitivity in Arabidopsis. *PNAS*, 106, 11, 4549-45554.
- Huang, X.Y., Tao P., Li, B.Y., Wang, W.H., Yue, Z.C., Lei, J.L., Zhong, X.M.. (2015) Genome-wide identification, classification and expression analysis of the heat shock transcription factor family in Chinese cabbage. *Genet Mol Res.*, v. 14, n. 1, pg.2189-2204
- Huang Y, Zhang BL, Sun S, Xing GM, Wang F, Li MY, Tian YS, Xiong AS. (2016). AP2/ERF Transcription Factors Involved in Response to Tomato Yellow Leaf Curly Virus in Tomato. *Plant Genome*, v. 9, n.2, pg.
- Inoue-Nagata, A., Nagata T. (2002). Distribuidor de vírus. *Cultivar HF*, n. 13, p.26-29
- Izpisúa-Belmonte JC1, Duboule D. (1992) Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb. *Dev Biol.*;152(1):26-36.
- Jeevalatha, A., Priyanka Kaundal, R. K. Shandil, N. N. Sharma, S. K. Chakrabarti, and B. P. Singh (2013). Complete Genome Sequence of *Potato leafroll virus* Isolates Infecting Potato in the Different Geographical Areas of India Shows Low Level Genetic Diversity. *Indian J Virol*. 2013 Sep; 24(2): 199–204
- Jofuku KD1, den Boer BG, Van Montagu M, Okamoto JK. (1994) Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell*, v. 6, n. 9, pg. 1211-1225.
- Junior, O. P.; Schuster, I.; Pinto, R. B.; Pires, E.; Belot, J. & Silvie, P. (2008) Inheritance of resistance to cotton blue disease. *Pesq. agropec. bras.*, 43, 5, 661–665.
- Junya, M., Kazuo, S., Kazuko, Y-S. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Elsevier*, v. 1819, n. 2, pg. 86-96.
- Krol J1, Sobczak K, Wilczynska U, Drath M, Jasinska A, Kaczynska D, Krzyzosiak WJ. (2004). Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *J Biol Chem.*, v.279, pg.42230-42239
- Lelandais-Brière C1, Sorin C, Declerck M, Benslimane A, Crespi M, Hartmann C. (2010). Small RNA diversity in plants and its impact in development. *Curr Genomics*, v.11, n.1, pg. 14-23.
- Licausi, F., Kosmacz, M., Weits, D. A., Giuntoli, B., Giorgi, F. M., Voesenek, L. A., Perata, P., van Dongen, J.T. (2011). Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature*, v.479, p. 419-422

- Lilly, S. T.; Drummond, R. S. M.; Pearson, M. N., Macdiarmid, R. M. (2011) Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI, 24, 3, 294–304.
- Maes, T., Van de Steene, N., Zethof, J., Karimi, M., D'Hauw, M., Mares, G., Van Montagu, M., Gerats, T. (2001). *Petunia* Ap2-like Genes and Their Role in Flower and Seed Development. *Plant Cell*, 13, 229–244.
- Marchi, R., Sorel, M., Mooney, B., Fudal, I., Goslin, K., Kwasniewska, K., Ryan, P. T., Pfalz, M., Kroymann, J., Pollmann, S., Feechan, A., Wellmer, F., Rivas, S., Graciet, E. (2016) The N-end rule pathway regulates pathogen responses in plants. *Nature*, 6, e26020.
- Mayo, M. A., Ziegler-Graff, V., (1996). *Molecular Biology of Luteoviruses*. Elsevier, Adv. In Virus Research, v.46, pg. 413-460.
- Michelotto M.D. & A.C. Busoli 2003a. Aspectos biológicos de *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera:Aphididae) em três cultivares de algodoeiro e em três espécies de plantas daninhas. *Cienc. Rural* 33: 999-1004.
- Michelotto M.D. & A.C. Busoli 2003b. Eficiência de ninfas e adultos de *Aphis gossypii* Glov. na transmissão do vírus do mosaico das nervuras do algodoeiro. *Bragantia* 62: 255-259.
- Michelotto, M. D., Busoli, A. C. (2009). *Biologia de Aphis Gossypii* em plantas infectadas pelo vírus do mosaico das nervuras do algodoeiro. 68, 1017-1024.
- Mo J, Li D, Zhang H, Song F (2011) Roles of ERF transcription factors in biotic and abiotic stress response in plants. *Plant Physiol J* 47:1145–1154.
- Moura, M. O. (2018). Avaliação do papel da Arginil t-RNA Transferase na interação planta-vírus tendo como modelo *Arabidopsis*:CLRVDV. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Müller, M., Munné-Bosh, S., (2015). Ethylene Response Factors: A Key Regulatory Hub in Hormone and Stress Signaling. *ASPB, Plant Physiol.*, v. 169 n. 1, pg. 32-41
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., Shinshi, H. (2006). Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in *Arabidopsis* and Rice
- Odell, J.T., Nagy, F., Chua, N. H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313, 810-812.
- 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.
- Ramiro E. Rodriguez, Martin A. Mecchia, Juan M. Debernardi, Carla Schommer, Detlef Weigel, Javier F. Palatnik (2010). Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development* 137: 103-112
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 23–36.

- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, G. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, v. 290, n.5499, pg. 2105-2110.
- Romanel, E., Silva, T.F., Corrêa, R. L., Farinelli, L., Hawkins, J. S., Schrago, C.E., Vaslin, M. F. (2012). Global alteration of microRNAs and transposon-derived small RNAs in cotton (*Gossypium hirsutum*) during Cotton leafroll dwarf polerovirus (CLRDV) infection. *Plant Mol Biol.*, 80 (4-5), 443-460.
- Santos, N. S. de O. (1964)-Virologia humana. In: Propriedades gerais dos vírus. Norma Suely de Oliveira Santos, Maria Teresa Villela Romanos, Marcia Dutra Wigg. 3. ed. (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.), pp. 76-91
- Shi, X., Gupta, S., Rashotte, A.M. (2014). Characterization of two tomato AP2/ERF genes, SICRF1 and SICRF2 in hormone and stress responses. *Plant Cell Rep.*, 33,35-45.
- 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.
- Sriram, S.M., Kim, B.Y., and Kwon, Y.T. (2011). The N-end rule pathway: emerging functions and molecular principles of substrate recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 735–747
- Trigiano, R. N. (2010). Fitopatologia: Conceitos e exercícios de laboratório. In: Defesas do hospedeiro um enfoque físico e fisiológico. Trigiano, R. N., Windham, M. T., Windham, A. S. 2ª ed (Porto Alegre, Artmed), pp. 576
- Tsaftaris, A., Pasentsis, K., Kalivas, A., Michailidou, S., Madesis, P., Argiriou, A. (2012) Isolation of a CENTRORADIALIS/TERMINAL FLOWER1 homolog in saffron (*Crocus sativus* L.): characterization and expression analysis. *Mol Biol Rep.*,39, 7899-910.
- Vella, M. C., Slack, F. J. (2005). *C. elegans* microRNAs, Research Community, WormBook, doi:10.1895/wormbook.1.26.1
- Wellmer, F., Graciet, E. (2010) The N-end rule: structure and functions. *Cell, Trends Plant Sci.*, 15, 8, 447-453.
- Westwood, J. H., Stevens, M. Resistance to aphid vectors of virus disease. 1. ed.[s.l.] Elsevier Inc.,. 76, 2010.