

CARLOS EDUARDO SOLIS PINHEIRO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA ARGINIL T- RNA
TRANSFERASE NA RESISTÊNCIA A VÍRUS EM
PLANTAS MODELO



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

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA
PAULO DE GÓES UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO RIO
DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2024

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

CIP - Catalogação na Publicação

S687a Solis Pinheiro, Carlos Eduardo
AVALIAÇÃO DO PAPEL DA ARGINIL T- RNA TRANSFERASE
NA RESISTÊNCIA A VÍRUS EM PLANTAS MODELO / Carlos
Eduardo Solis Pinheiro. -- Rio de Janeiro, 2024.
57 f.

Orientadora: Maite Vaslin de Freitas Silva.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Biodiversidade e Sustentabilidade, Bacharel em
Ciências Biológicas, 2024.

1. PVX. 2. ATE. 3. Nicotiana benthamiana. 4.
Arabidopsis thaliana. I. Vaslin de Freitas Silva,
Maite, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Há quatro anos não tinha noção de que poderia percorrer esse caminho e acharia impossível de conseguí-lo. Há quatro anos decidi estudar sozinho e ao menos tentar fazer um caminho diferente da minha realidade, mas nada seria viável sem a ajuda e até mesmo a simples presença de pessoas na minha vida. Infelizmente as pessoas mais importantes para eu estar aqui realizando esse caminho se foram antes mesmo de eu ter conseguido entrar na faculdade. Porém, tenho certeza de que os meus avós acreditavam mais do que eu nessa conquista. Dedico e agradeço principalmente a eles por toda essa trajetória na minha vida. Sabe, cresci longe da cidade grande e então tive a vida menos movimentada e longe de pessoas com a realidade completamente diferente da minha. Nessa experiência aqui no Rio tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis, gentis e realmente boas. Cada uma tinha seu jeito, cada uma tinha sua história. Essa percepção sobre outras vidas me mostrou o quanto a minha vida é minha e o quanto eu devia valorizar o que me fez - a minha família. Então, só tenho a agradecer aos meus pais e minhas irmãs por esse período de crescimento que realmente permitiu que eu chegasse até aqui.

Não posso deixar de lembrar e agradecer novamente aos meus amigos Filipe e Mayline que simplesmente foram super importantes para eu reconhecer que eu devia mudar o meu pensamento e focar mais no meu bem-estar. E também não posso deixar de agradecer aos amigos que fiz no Rio (Ana Barcelos, Carol, Yuri, José, Matheus, Gean, Mariana, Lucas, Théo, pessoal do volêi) e me permitiram ter saúde mental e ser feliz ao longo do estresse da faculdade. Yuri que conheci no final da faculdade e tornou-se um amigo para todas as horas. Sou grato por todos os momentos e por todas as histórias que fizemos juntos ao longo da minha graduação e nunca esquecerei. Também sou extremamente grato a Maite pela orientação e por ter me deixado entrar no laboratório. Nesse laboratório tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis e que me ajudaram em todo esse período de iniciação científica. Só tenho a agradecer ao Alex, Andréia, Carolzinha, Dania, Douglas, Gabriel, Jennifer, Tatiana, Téó e Marianas. Só tenho a agradecer a todos.

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(A): CARLOS EDUARDO SOLIS
PINHEIRO**

DRE: 120143405

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Luciana Jesus da Costa (Presidente)
Prof. Adriana Flores Fussaro
Prof. Anna Karoline Fausto da Silva
Prof. Iranaia Assunção Miranda (Suplente)

**Título da Monografia: “AVALIAÇÃO DO PAPEL DA ARGINIL-T-RNA TRANSFERASE
NA RESISTÊNCIA A VÍRUS EM PLANTAS MODELO”**

Local: Sala D27, no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Data e hora de início: 17 de dezembro de 2024 às 19:00h

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 9 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 coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 17. de Dezembro. de 2024.

NOTA:

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente

LUCIANA JESUS DA COSTA

Data: 06/01/2025 14:50:06-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

9

Prof. Luciana Jesus da Costa (Pre



Documento assinado digitalmente

ADRIANA FLORES FUSARO

Data: 20/12/2024 09:54:13-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

9



Documento assinado digitalmente

ANNA KAROLINE FAUSTO DA SILVA

Data: 23/12/2024 09:27:32-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Adriana Flores Fussaro

9

Prof. Anna Karoline Fausto da Silva

Prof. Iranaia Assunção Miranda (Suplente)

Documento assinado digitalmente



CARLOS EDUARDO SOLIS PINHEIRO

Data: 21/12/2024 10:13:07-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Aluno(a):

Orientador(a)

(e coorientador):

Maite Vaslin de Freitas Silva



Documento assinado digitalmente

MAITE VASLIN DE FREITAS SILVA

Data: 27/12/2024 17:50:49-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coordenadora de

TCC:

Profa. Marinella Silva Laport



Documento assinado digitalmente

MARINELLA SILVA LAPORT

Data: 06/01/2025 16:07:33-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

RESUMO

CARLOS EDUARDO SOLIS PINHEIRO

AVALIAÇÃO DA ARGYNIL-T-RNA TRANSFERASE NA RESISTÊNCIA A VÍRUS EM PLANTAS MODELOS

Orientadora: Maite Vaslin de Freitas Silva

Com base na identificação molecular de duas ORFs associadas à resistência do algodão (*G.hirsutum*) ao CLRDV (vírus do nanismo e enrolamento da folha do algodão, gênero Polerovirus e família *Solemoviridae*), foi demonstrado que o ORF CBD2 codifica uma ARGINYL-t-RNA TRANSFERASE (ATE). A ATE adiciona argininas a proteínas com aminoácidos específicos em sua porção N-terminal, incluindo ácido glutâmico, ácido aspártico ou uma cisteína oxidada. A adição de arginina é importante para que a PRT6 (E3 ub ligase em plantas) reconhecer a proteína e marca-lá com a ubiquitina para ser degradada via proteassoma. Fausto, Karol (2016), demonstrou que a superexpressão de ATE em *Arabidopsis thaliana* inibe a disseminação e síntese de CLRDV, sugerindo que a ATE também pode ter um papel antiviral em outras plantas. Entretanto, ainda não se sabia se essa atividade antiviral era restrita ao CLRDV ou se atuava contra vírus de outras famílias. Este estudo avalia se a ATE inibe a replicação e disseminação do Potato virus X (PVX - *Alphaflexiviridae*) em *Nicotiana benthamiana* e *A. thaliana*. Nos experimentos em *N.benthamiana*, a ATE tem demonstrado afetar a replicação de PVX, visto que a região agroinfiltrada com ATE e PVX-GFP tem demonstrado menor intensidade de fluorescência. O mesmo comportamento tem sido analisado em *N.benthamiana* 16 C. Além disso, em *N.benthamiana* foi observado atraso de 24h no espalhamento sistêmico do PVX-GFP quando tratado com ATE. Em *Arabidopsis thaliana* é observado ausência de amplificação do transcrito viral da proteína TGB2 do PVX em folhas novas sistêmicas.

ABSTRACT

EVALUATION OF ARGINYL-t-RNA TRANSFERASE IN VIRUS RESISTANCE IN MODEL PLANTS

Advisor: Maite Vaslin de Freitas Silva

Based on the molecular identification of two ORFs associated with cotton (*G. hirsutum*) resistance to **CLR DV** (Cotton Leafroll Dwarf Virus, genus *Polerovirus* and family *Solemoviridae*), it was demonstrated that the **ORF CBD2** encodes an **ARGINYL-t-RNA TRANSFERASE (ATE)**. The ATE adds arginines to proteins with specific amino acids at their N-terminal region, including glutamic acid, aspartic acid, or oxidized cysteine. The addition of arginine is important for the **PRT6** (E3 ubiquitin ligase in plants) to recognize the protein and mark it with ubiquitin for degradation via the proteasome. Fausto and Karol (2016) demonstrated that the overexpression of ATE in *Arabidopsis thaliana* inhibits the spread and synthesis of CLR DV, suggesting that ATE may also have an antiviral role in other plants. However, it was not known whether this antiviral activity was restricted to CLR DV or if it acted against viruses from other families. This study evaluates whether ATE inhibits the replication and spread of **Potato Virus X (PVX)** (Alphaflexiviridae) in *Nicotiana benthamiana* and *A. thaliana*. In experiments with *N. benthamiana*, ATE was shown to affect PVX replication, as the agroinfiltrated region with ATE and PVX-GFP showed lower fluorescence intensity. The same behavior has been observed in *N. benthamiana* 16 C. Additionally, in *N. benthamiana*, a 24-hour delay in the systemic spread of PVX-GFP was observed when treated with ATE. In *Arabidopsis thaliana*, the absence of amplification of the viral transcript for the TGB2 protein of PVX was observed in new systemic leaves.

RESUMO PARA LEIGOS

CARLOS EDUARDO SOLIS PINHEIRO

AVALIAÇÃO DA ARGYNIL-T-RNA TRANSFERASE NA RESISTÊNCIA A VÍRUS EM PLANTAS MODELOS

As plantações em todo o mundo são constantemente afetadas por microrganismos (bactérias, fungos, helmintos, vírus) que são capazes de causar doença em plantas. Para se defender dos microrganismos as plantas possuem mecanismos de resistência, os quais podem o processo infeccioso do microorganismo. A Arginynil-t-RNA transferase é uma enzima que é produzida pela célula vegetal que pode estar associada ao desenvolvimento da resistência da planta quando infectada por vírus. Em estudos anteriores do laboratório, analisou que um cultivo de algodoeiro que era resistente a uma infecção viral (CLRVDV – *Cotton leafroll dwarf virus*) apresentava como diferencial (em relação as plantas suscetíveis) a enzima ATE (Arginynil-t-RNA transferase) e a enzima CBD1. Em outros trabalhos do grupo, analisou que a ATE era capaz de inibir a infecção do vírus CLRVDV em plantas de *Arabidopsis thaliana* e, além disso, a ATE afetou o movimento sistêmico do vírus em *Arabidopsis thaliana* infectada por outros vírus (PVX e TRV). Dessa maneira, a ATE tem constantemente apresentado atividade antiviral em diferentes plantas quando infectadas por firentes vírus. O projeto busca, portanto, suplementar esse comportamentamento antiviral ao analisar se a ATE pode afetar a replicação de PVX em outro modelo de planta (*N.benthamiana* selvagem e *N.benthamiana* 16c) e, além disso, também é feita a complementação da análise de PVX em *A.thaliana* WT e em *A.thaliana* que superexpressa ATE (35S:ATE). Nos resultados, podemos avaliar que o aumento da produção da enzima ATE impactou a infecção de PVX nas duas espécies de *N.benthamiana* (selvagem e 16c) e em *Arabidopsis thaliana* selvagem e 35S:ATE.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATE - Arginil T-RNA transferase

CBD - *Cotton blue disease*

cDNA - DNA complementar

CP - Capsídeo

DA - Doença Azul do algodoeiro

dNTP - Desoxirribonucleico

trifosfato DNA - Ácido desoxirribonucleico

dpi - Dias após a infecção

GFP – *Green Fluorescent Protein*

ORF - *Open Reading Frame*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pb – Pares de bases

RdRp - RNA polimerase RNA

RNAi - RNA de interferência

dependente Wt – *Wild type* (selvagem)

sRNA - pequeno RNA

dsRNA – RNA de dupla fita

DO – Densidade óptica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática simplificada dos mecanismos de ativação e regulação da resposta imune em plantas

Figura 2: Mecanismo de resistência a vírus vegetais via siRNA.

Figura 3: Planta saudável e planta infectada pelo CLRDV

Figura 4: Locus de resistência ao CLRDV em *G. hirsutum*

Figura 5: Modos de desestabilização de proteínas e enzimas associadas a catálise

Figura 6: Modelo do funcionamento da enzima Arginil t-RNA Transferase

Figura 7: Análise de susceptibilidade ao CLRDV e de expressão de ATE1 de linhagens de *Arabidopsis thaliana* selvagens, nocaute e de superexpressão de ATE1 por RT-PCR.

Figura 8: Expressão do gene de CP em plantas 35S:ATE1 de *A. thaliana* infectadas por Tobacco rattlevirus (TRV) em 6dpi.

Figura 9: Sintomas de PVX em folha de *Nicotiana benthamiana*

Figura 10: Ilustração do genoma viral do Potato Virus X (PVX)

Figura 11: Ciclo do PVX em célula vegetal.

Figura 12: Expressão do gene AtATE1 em plantas 35S:ATE1 de *A. thaliana* infectadas por esse vírus

Figura 13: Ilustração do Vetor binário e *vir* helper.

Figura 14: Construção de PVX clonado em vetor binário de *Agrobacterium tumefaciens* e processo de agroinfiltração

Figura 15: Ilustração dos experimentos realizados em *A.thaliana* WT e em 35S:ATE

Figura 16: Ilustração dos experimentos realizados em *N.benthamiana* WT

Figura 17: Análise de folhas de *N.benthamiana* em 4, 5 e 6 dpi sob luz UV

Figura 18: Análise da área fluorescente e da sua intensidade das amostras de *N.benthamiana* tratadas com ou sem ATE em 5 e 6 dpi

Figura 19: Segunda análise da área fluorescente e da sua intensidade das amostras de *N.benthamiana* tratadas com ou sem ATE em 4, 5 e 6 dpi

Figura 20: Imagens do experimento com agroinfiltração na mesma folha com inóculos contendo PVX + p19 + ATE; PVX + 19 + pART em 4, 5 e 6 dpi em *N.benthamiana*.

Figura 21: Análise da área fluorescente e da sua intensidade das amostras de *N.benthamiana* tratadas com ou sem ATE em 5 e 6 dpi

Figura 22: Análise da área fluorescente e da intensidade da fluorescência em *Nicotiana benthamiana* tratada com ATE, na presença ou ausência do p19, comparada a amostras controle (sem ATE) também com ou sem p19. As medições foram realizadas aos 5 e 6 dias após a infiltração (dpi).

Figura 23: Imagens das folhas de *N.benthamiana* com diferentes agroinfiltrações (PVX 0,5_{DO}; PVX 0,25_{DO} + ATE 0,125_{DO}; PVX 0,25_{DO} + ATE 0,25_{DO}; PVX 0,25_{DO} + ATE 0,5) analisadas sob luz UV em 4, 5 e 6 dpi.

Figura 24: Análise da área fluorescente e da intensidade da fluorescência em *Nicotiana benthamiana* 16 C tratada com ATE, na presença ou ausência do p19, comparada a amostras controle (sem ATE) também com ou sem p19. As medições foram realizadas aos 5 e 6 dias após a infiltração (dpi).

Figura 25: Imagens de *Arabidopsis thaliana* WT e 35S:ATE infectadas com PVX GFP + p19 analisadas em 9 dia após agroinfiltração sob luz UV.

Figura 26: Gel de PCR com amostras de folhas sistêmicas novas após 9 dias da agroinfiltração com PVX-GFP em *Arabidopsis thaliana* WT e 35S:ATE

Figura 27: Sequência de proteínas do PVX que são alvo de ATE (TGB1 e TGB3)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cepas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas para experimento em *N.benthamiana* wt, *A.thaliana* wt e em *A.thaliana* 35S:ATE.

Tabela 2: Adição de antibióticos de resistência na concentração ideal para cada 3 ou 20 ml de LB

Tabela 3: Primers forward e reverse usados para amplificação da sequência da ORF3 (TGB2) do PVX por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Tabela 4: Análise da infecção sistêmica de PVX em plantas de *N.benthamiana* tratadas com PVX + ATE e em plantas tratadas com PVX + pART.

ÍNDICE

RESUMO.....	IV
RESUMO PARA LEIGOS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Mecanismos de resistência de plantas a vírus	1
1.2 Supressão do silenciamento.	4
1.3 <i>Cotton leafroll dwarf virus</i> e a Doença Azul do algodoeiro.	5
1.4 N-end rule	6
1.5 Arginil t-RNA Transferase.....	8
1.6 Potato virus X	11
2 JUSTIFICATIVA.....	16
3 OBJETIVOS	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Agrobactérias e agroinfiltração.	18
4.1.2 Crescimento de Agrobactérias.....	21
4.2 Material Vegetal.....	21
4.3 Esterilização de <i>Arabidopsis thaliana</i> e germinação em placa.....	24
4.4 Quantificação da fluorescência com Image J.....	24
4.5 Extração de RNA.....	25
4.6 RT-PCR.....	25
4.7 PCR.....	26
4.8 Análise Estatística	27

5 RESULTADOS.....	28
5.1 Ensaio de infecção do PVX em <i>Nicotiana benthamiana</i>	28
5.2 Co-agroinfiltração de diferentes inóculos em única folha de <i>N.benthamiana</i>	31
5.3 Avaliação do efeito de ATE na replicação do PVX em <i>Nicotiana benthamiana</i> 16c....	33
5.4 Análise da infecção do PVX em <i>Arabidopsis thaliana</i> wt e 35S:ATE.....	36
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO	41
7.1 Perspectivas.....	41
8 REFERÊNCIAS.....	42

1. Introdução

É amplamente conhecido como epidemias e pandemias virais que acometem a população humana afetam diretamente a economia e ocasionam o aumento da desigualdade social e da miséria. Do mesmo modo, as infecções virais em plantas afetam a economia e podem levar ocasionalmente ao aumento da fome em determinados países do mundo. Para se ter uma noção rápida, as infecções virais podem ocasionar prejuízos estimados em 30 bilhões de dólares mundialmente por acarretarem perdas no cultivo, diminuírem ou prejudicarem a colheita, que pode ser perene ou temporária (HILAIRE *et al.*, 2022). Portanto, a quantidade e a qualidade do alimento a ser comercializado para a população mundial pode ser afetada.

Além disso, estima-se que o prejuízo com as infecções virais aumente principalmente devido ao aquecimento global, visto que o aumento da temperatura, por exemplo, leva a necessidade de fazer o cultivo de determinados alimentos de uma localidade em outras regiões do mundo com temperaturas mais estáveis para o cultivo. Dessa forma, o cultivo destas culturas pode ser alvo de novos patógenos virais presentes na vegetação nativa daquela nova localidade (TREBICKI, 2020; HILAIRE *et al.*, 2022). Também há observações sobre como o aumento das temperaturas pode afetar o ciclo de vetores mecânicos ou biológicos, como mosca branca, pulgões e outros insetos hemípteros que são responsáveis por cerca de 64 % da transmissão de todos os vírus de planta descritos (TREBICKI, 2020). As plantas possuem mecanismos para resistir às infecções virais, mas os vírus tendem a conseguir evadir-se por meio de novos mecanismos. Logo, é importante identificar e estudar possíveis novos mecanismos de resistência de plantas para atenuar o impacto das infecções em plantas.

1.1. Mecanismos de resistência aos vírus em plantas

Atualmente, sabe-se que as plantas possuem diferentes mecanismos de resistência às infecções virais. Dentre os variados mecanismos, os mais importantes são a resistência por meio de RNAi, onde pequenos RNAs interferentes atuam. As plantas também possuem outros mecanismos como as respostas imunes de PTI (PAMP Triggered Immunity) e/ou ETI (“effector triggered immunity”), como ilustrado na figura 1. A resposta imunológica PTI é desencadeada por receptores membranares que identifiquem PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) ou MAMPs (Microbe- Associated Molecular Patterns) e DAMPs (Damage-associated molecular patterns) através de receptores que reconhecem moléculas sinalizadoras de microorganismo exógeno ou de danos, como flagelina bacteriana, peptídeos, quitina fúngica (NGUYEN *et al.*,

2021). Já a resposta imunológica por efetores (ETI) ocorre por meio do reconhecimento de moléculas efetoras do patógeno de forma direta ou indireta com proteínas denominadas de proteínas de resistência (figura 1). Dentre as proteínas de resistência, há por exemplo proteínas que podem ter domínio que pode interagir com nucleotídeos (NB) e também pode vir a ter domínios com repetição rica em leucina (LRR), conhecidas como NLR (NOD-like receptor). A resposta imunológica por efetores quando ativada pode levar ao desenvolvimento da hipersensibilidade, onde a célula pode entrar em apoptose ou morte celular programada para impedir o espalhamento do patógeno na planta (NGUYEN *et al.*, 2021).

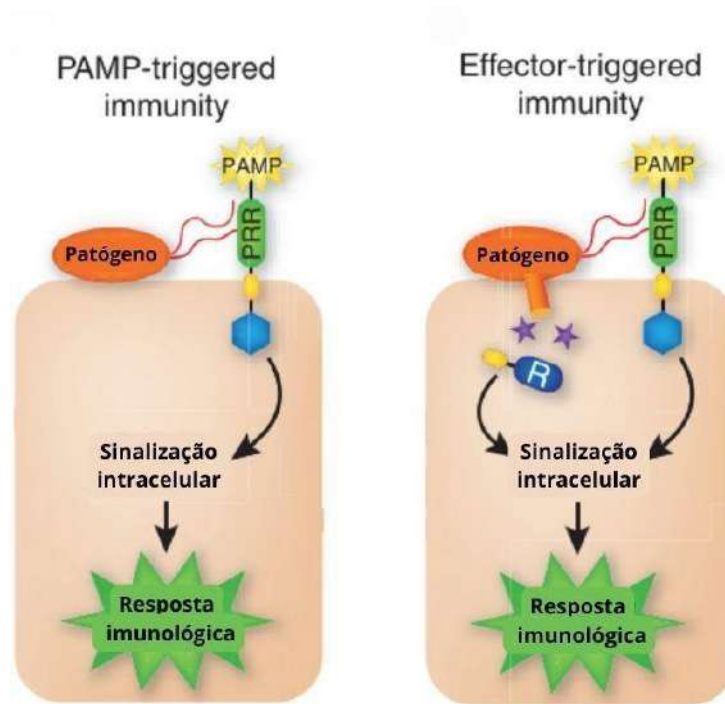


Figura 1: Representação esquemática simplificada dos mecanismos de ativação e regulação da resposta imune em plantas. Padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) ativam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), resultando em uma cascata de sinalização que leva à imunidade acionada por PAMP (PTI). Patógenos virulentos adquirem efetores (estrelas roxas) que suprimem a PTI, resultando em suscetibilidade desencadeada pelo efector (ETS). Por sua vez, as plantas adquirem proteínas de resistência (R) que reconhecem esses efetores específicos, resultando em uma resposta imune secundária chamada imunidade desencadeada por efector (ETI). (Pieterse et al., 2009 com modificação)

Diferentemente, o RNAi (RNA de interferência) é a forma da planta inibir parcialmente o ciclo replicativo do vírus por meio da degradação de mRNAs virais ou por impedir que estes sejam traduzidos. O mecanismo é disparado pelo reconhecimento de dupla fitas de RNA, como mostra a figura 2.

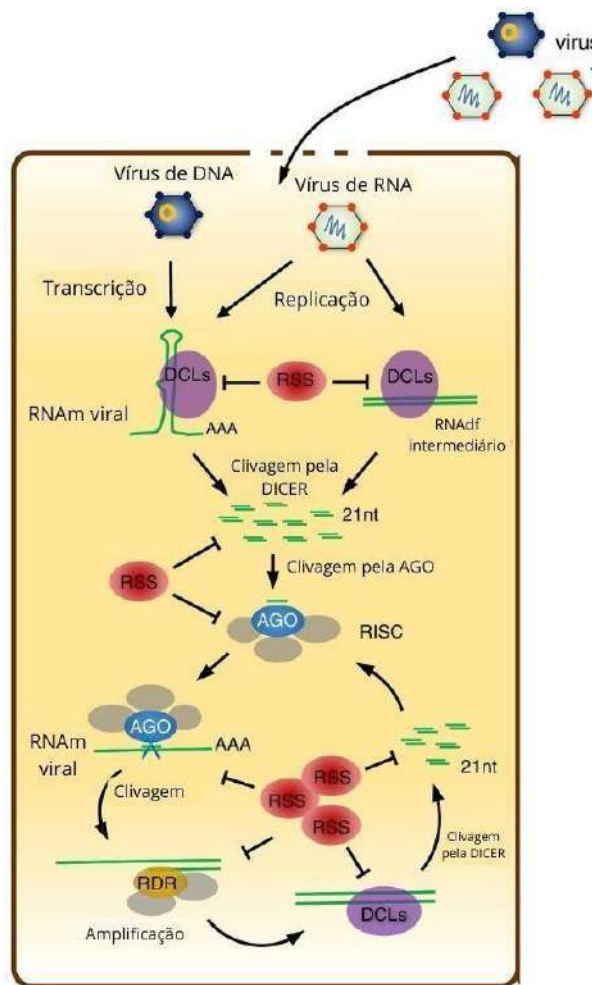


Figura 2 – Mecanismo de resistência a vírus vegetais via siRNA. Silenciamento do RNA viral em plantas e sua inibição pelos supressores de silenciamento virais (RSS – “Viral RNA Silencing Suppressors”). O silenciamento do RNA é iniciado pelo reconhecimento realizado pelas DCLs (DICER- like) da dupla fita de RNA (dsRNA) intermediário gerado durante a replicação viral pela RDR (“RNA- dependent RNA polymerase”) ou por uma dupla fita parcial formada por estruturas em grampo ou “hairpin”, os quais são processados gerando vsiRNA (virus small interfering RNA). Os vsiRNAs serão reconhecidos pela AGO (ARGONAUTE) no complexo RISC (“RNA-Induced Silencing Complex”) a qual recruta a maquinaria para amplificação do sinal de silenciamento do genoma viral. (BOUALEM et al., 2016 com modificações).

Vírus de RNA, por exemplo, ao alcançarem o meio intracelular irão iniciar o processo de replicação de seu genoma por meio da sua própria RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Durante o processo há formação de fitas duplas de RNA (dsRNA) que são identificadas e processadas pela proteína celular DICER, as quais são denominadas como DICER like (DCL) em plantas (E *et al.*, 2001; JIN *et al.*, 2022). As proteínas DCLs são endonucleases que irão clivar o dsRNA em pequenos fragmentos de RNA dupla fita (siRNAs) com tamanhos entre 21-24 nucleotídeos (MELNYK; MOLNAR; BAULCOMBE, 2011). O complexo RISC irá reconhecer e fixar-se ao siRNA dupla fita e clivá-lo por meio da proteína ARGONAUTA para

degradar uma fita simples e utilizar a outra fita simples como molde. Dessa forma, um único RNAs oriundo da separação será utilizado para escanear RNAs mensageiros presentes no citoplasma e ao complementar-se a outro RNA fs livre este será clivado pela proteína ARGONAUTA. Sendo assim, pode ocorrer a inibição da síntese proteica viral e da replicação do RNA viral como visto quando plantas de *N. tabacum* que foram manipuladas com cDNA do TEV (Tobacco etch virus) e tiveram os transcritos virais degradados no citoplasma (LINDBO; DOUGHERTY, 1992; LINDBO *et al.*, 1993).

Há mais de um tipo de DCL em plantas e cada uma pode ter uma funcionalidade distinta. Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, há 4 tipos de DCL e cada uma está voltada para um funcionamento específico. A DCL 1 cliva RNA com “hairpins” e gera miRNA de 21 nt; a DCL 2 e 4 vão clivar RNA virais e gerar fragmentos de dupla fita com pareamento complementar (siRNA) com 21-22 nt que serão importantes para a degradação de transcritos virais. A DCL 3 gera siRNA de 24 nt que podem estar associados a silenciamento transcricional (TGS – Transcriptional Gene Silencing) (JIN *et al.*, 2022). Embora as diferenças entre os tamanhos dos fragmentos e também entre as enzimas da via do RNAi, suspeita-se que tanto miRNA, quanto siRNA e os seus precursores terão a capacidade de serem transferidos sistemicamente por meio do plasmodesma para permitir a degradação do RNA viral sistemicamente (MELNYK; MOLNAR; BAULCOMBE, 2011).

1.2 Supressão do silenciamento

Os vírus de RNA podem ter diversas variantes que podem ser derivadas da alta taxa de mutação proveniente da atividade da sua polimerase não apresentar mecanismos de correção de erros na polimerização durante a replicação do material genético pela ausência do domínio exonuclease 3' na sua RNA polimerase (SANJUÁN; DOMINGO-CALAP, 2016). Durante a replicação, mutações podem ocorrer no genoma viral e podem ocasionar modificações na estrutura de proteínas que venha a acarretar no auxílio da evasão do vírus ou em novas funcionalidades para a proteína. Além disso, os vírus podem ter a capacidade de suprimir o silenciamento da planta por RNAi. Nesse caso, a proteína viral poderia interagir com enzimas do sistema de silenciamento da planta, como a DCL, RISC ou com a ARGONAUTA e impedir o seu funcionamento ou também poderia proteger o RNA viral ao se associar a ele, e impedir atividades enzimáticas de endonucleases (JIN *et al.*, 2022). A TGB1, por exemplo, é uma proteína supressora do silenciamento do PVX que promove a degradação de Argonauta 1 via

proteassoma (CHIU *et al.*, 2010; JIN *et al.*, 2022). Outra possível forma de inibir o silenciamento da planta seria pela capacidade da proteína supressora de silenciamento sequestrar pequenos RNAs antivirais e, assim, inibir a degradação dos RNAs genômicos e/ou subgenômicos virais pelo complexo RISC (MÉRAI *et al.*, 2006; JIN *et al.*, 2022).

1.3 *Cotton leafroll dwarf virus* e a Doença Azul do algodoeiro

Nosso grupo analisou entre 2006 e 2008 amostras de algodoeiros (*G.hirsutum*) que eram susceptíveis ao Cotton Leafroll Dwarf Virus (CLRDV), os quais ocasionam a Doença azul do algodoeiro ou *Cotton blue disease*. Foi identificado por meio de RT-PCR que amostras de cultivares de algodoeiros no Brasil estavam infectados com o CLRDV, e que existiam cultivares de *G.hirsutum* resistente e suscetíveis (CORRÊA *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.* 2008).

A Doença azul do algodoeiro tem como seu agente etiológico um vírus de RNA fita simples com sentido 5'-3' e está incluído no gênero Polerovirus, o qual pertence à família *Solemoviridae*. O vírus é altamente transmitido por meio do pulgão *Aphis gossypii* e a doença já foi identificada em diversos países do mundo, como Brasil, Estados Unidos, China, Georgia e entre outros (Edula *et al.*, 2023). Dentre os sintomas apresentados pelas plantas infectadas por este vírus temos o nanismo, o mosaico e os enrolamentos foliares. Na Figura 3, é possível observar os sintomas em uma planta de algodão infectada com o CLRDV em comparação com a planta saudável.



Figura 3: Planta infectada à esquerda com CLRDV tendo sintomas característicos como o nanismo, folhas murchas e curvamento das folhas. Planta saudável à direita com desenvolvimento normal e sem sintomas de infecção. Foto de Dr. Nelson Suassuna (Embrapa/ Algodão).

Existem cultivares de algodoeiros suscetíveis e resistentes a este vírus e, em 2010, Zang *et al.* identificaram marcadores que estavam associados à resistência ao vírus. Em 2012, utilizando estes marcadores moleculares de resistência, nosso grupo identificou a sequência do locus de resistência, o qual contém duas ORFs identificadas entre os marcadores, como mostrado na figura 4. Foram identificadas a ORF CBD1 e a ORF CB2. A CBD1 codifica a proteína CBD1, a qual possui a sequência nucleotídica e a sua estrutura similar a BPP1 (basic proline-rich protein) de *Arabidopsis thaliana*, enquanto a CBD2 codifica a proteína CBD2, a qual é homóloga a Arginil t-RNA transferase (ATE). A ATE é uma enzima que está associada à degradação de proteínas pela via N-end rule.

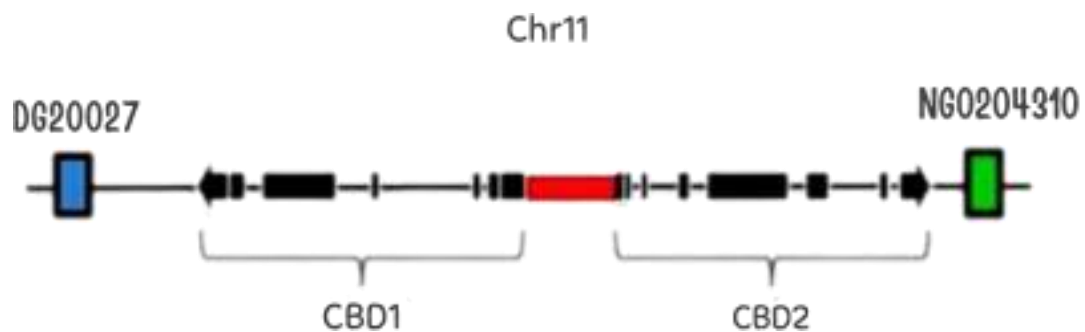


Figura 4: Locus de resistência ao CLRDV em *G. hirsutum*. Na extremidade, os marcadores DC20027 e NG0204310 flanqueando os genes CBD1 e CBD2. Adaptado de Rodrigues, 2019.

1.4 N-end rule

A via de degradação de proteínas chamada N-end rule ou N-degron, se baseia na porção N terminal de proteínas alvo e foi identificada em diferentes organismos, como fungos, plantas e mamíferos, sendo bastante conservada em eucariotos. Esta via de degradação das proteínas se baseia nos aminoácidos N- terminais das proteínas alvo, também denominados de degrons. Pode se ter distinções nos degrons dos organismos, em *Sacchormyces cerevisiae*, por exemplo, há somente dois aminoácidos N-terminais terciários e secundários (asparagina e glutamina) que são alvo da via N-end rule, e os aminoácidos ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E) como N-terminais primários. Enquanto em plantas e mamíferos as cisteínas (C) oxidadas presentes na região N-terminal de proteínas também se tornam alvo da via N-end rule (GRACIET; MESITI;

WELLMER, 2010; VARSHAVSKY, 2011; DOMITROVIC *et al.*, 2017) (Figura 5). Os degrons, portanto, possuem um papel essencial no reconhecimento e marcação das proteínas por N-recogininas, E3 ubiquitina ligases, que pertencem ao sistema ubiquitina proteassoma (UPS) (NGUYEN *et al.*, 2021). A E3 ub ligase é capaz de marcar proteínas por meio da transferência de ubiquitina para lisina mais próxima do N-terminal reconhecido. Ressalta-se que em plantas as N-recogininas são identificadas como PRT6 ou PRT1 (NGUYEN *et al.*, 2021).

A E3 ubiquitina ligase depende indiretamente da funcionalidade de outras enzimas para conseguir ubiquitinar as proteínas-alvo. A E1, por exemplo, é importante para a degradação de proteínas-alvo porque irá interagir com a ubiquitina por meio de resíduo de CYS e GLY presente no carboxi-terminal da ubiquitina, onde irá formar uma ligação tio-éster de alta energia e ativá-la (revisado em LOBAINA *et al.*, 2022). A ubiquitina, então, será doada para a E2 por transesterificação e depois a ubiquitina será transferida para a E3 ub ligase. Consequentemente, a E3 ub ligase vai ser capaz de se ligar a proteína com aminoácidos N-terminais específicos e transferir a ubiquitina. Assim, a proteína é marcada e pode ser degradada via proteassoma. (TASAKI *et al.*, 2012).

A célula, portanto, pode utilizar desse sistema ubiquitina proteassoma para degradar proteínas mal enoveladas ou que tiveram problemas durante a tradução ou sofreram degradações enzimáticas por MET-aminopeptidases (MAP). As enzimas MAP clivam a metionina e deixam aminoácidos na porção N-terminal expostos para o reconhecimento por N-recogininas. As proteínas sem metionina no N-terminal podem apresentar desestabilizações estruturais definidas como primária, secundária e terciária, como mostra na figura 5. A desestabilização primária ocorre quando os aminoácidos arginina (R), histidina (H) e lisina (K) estão presentes na porção N-terminal das proteínas e a lisina mais próxima do N-terminal será ubiquitinada pela E3 ub ligase, visto que trata-se de aminoácidos reconhecidos por N-recogininas. O mesmo ocorre quando resíduos hidrofóbicos como a leucina (L), tirosina (Y), fenilalanina (F), triptofano (W), isoleucina (I) estão presentes na porção N-terminal. (TASAKI *et al.*, 2012; DOMITROVIC *et al.*, 2017).

Na desestabilização secundária há aminoácidos que podem ser substratos para enzimas como a ATE, o que possibilita a catálise de sua degradação por meio da adição de argininas em aminoácidos N-terminais como ácido aspártico, ácido glutâmico e/ou à cisteína oxidada. Por fim, a desestabilização terciária é quando há desaminação de glutamina (Q) e asparagina (N) em

estruturas secundárias por meio da atividade enzimática de NTAN1 e NTAQ1 ou a oxidação de cisteína para, posteriormente, serem alvo de ATE e adiante serem ubiquitinadas por N-recogninas (DOMITROVIC *et al.*, 2017; TASAKI *et al.*, 2012).

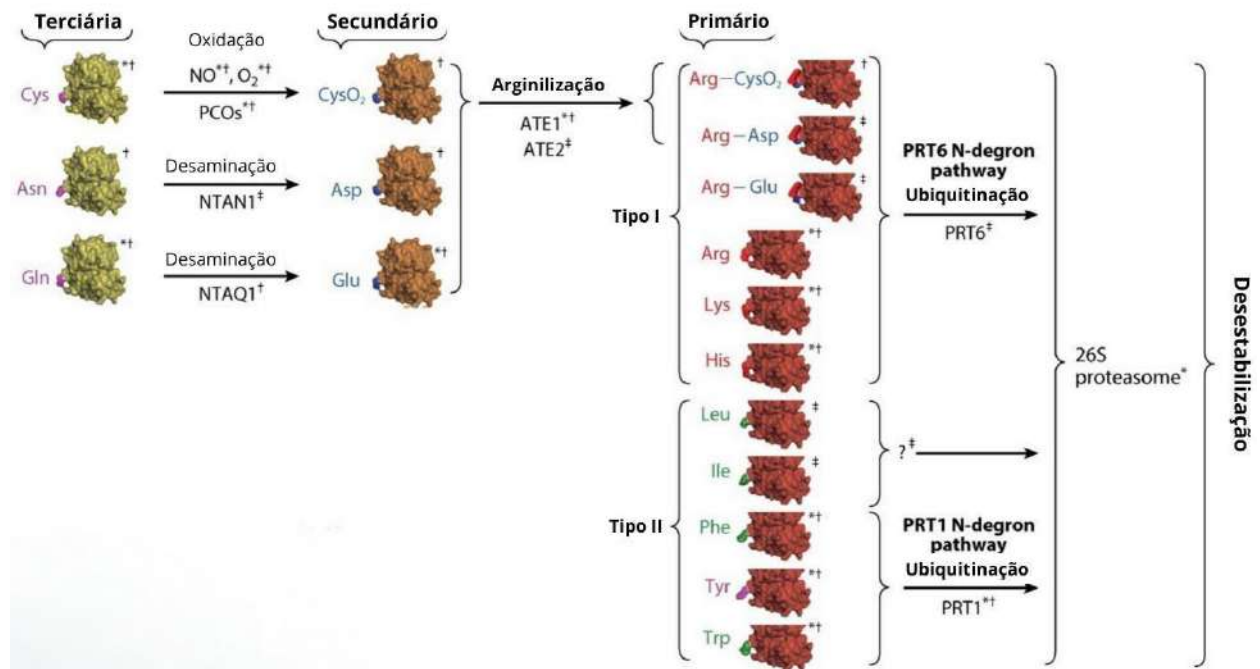


Figura 5: A proteína que sofre degradação da metionina (M) pode ter N-terminais terciários, secundários e primários expostos. A cisteína (C), a asparagina (N) e a glutamina (Q) podem sofrer catálise por outras enzimas e, então, serem alterados em outros compostos que são substratos de ATE, como Cisteína oxidada (Cox), ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E). Com a adição de Arginina pela ATE 1 e 2 de *A.thaliana* (Arg ou R) as proteínas podem ser alvos da PRT6 (tipo1) e PRT1(tipo 2) serão ubiquitinadas para ocorrer a degradação via proteassoma. Os N-degrons do tipo 2 possuem caráter hidrofóbico que auxilia o seu reconhecimento pela PRT1. Disponível em Dissmeyer N. 2019.

Ademais, foi identificado em eucariotos que a adição de argininas e a acetilação em aminoácidos N-terminais específicos também causam a desestabilização da proteína e consequentemente é feita sua marcação com ubiquitina. Em humanos é observado que cerca de 80% das proteínas possuem seus N-terminais acetilados, sendo então possíveis alvos de degradação proteica via N-end rule (VARSHAVSKY, 2011).

1.5 Arginil t-RNA transferase

Uma das possíveis formas de catalisar a degradação de proteínas via proteassoma é por meio da adição de argininas no N-terminal de proteínas feita pela ATE (arginil t-RNA transferase), como é ilustrado na figura 6. A ATE é uma enzima que é conservada em grande parte dos eucariotos, mas pode apresentar mais de um tipo em cada organismo. Nos

camundongos foram relatadas 4 isoformas de ATE, sendo ATE 1-1 e ATE 1-2 com maior atividade e ATE 1-3 e ATE 1-4 com menor atividade. Foi observado, por exemplo, que o nocaute do gene *ATE1* nos camundongos resultou em problemas cardíacos (WANG *et al.*, 2011).

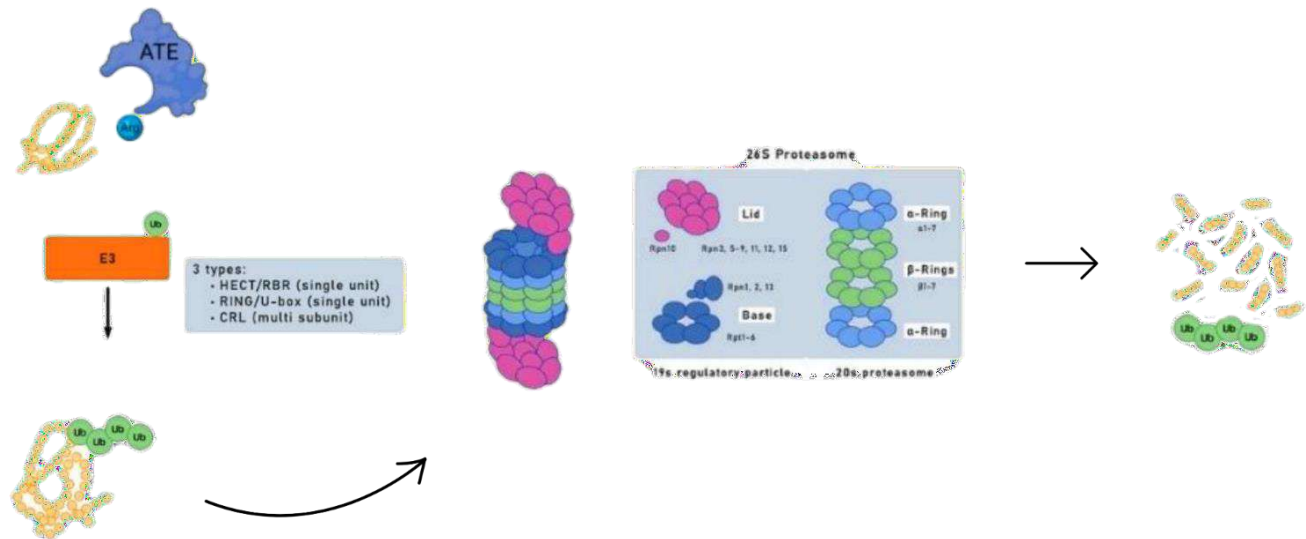


Figura 6: A Arginil-T-RNA transferase adiciona arginina na porção N-terminal com aminoácidos específicos. A adição de arginina ocasiona em um desequilíbrio primário que torna a proteína com alvo da enzima e3 ub ligase, a qual marca a proteína com ubiquitina. A proteína marcada pode, então, ser degradada em vários peptídeos via proteassoma. Imagem adaptada de LOBAINA, D. P. et al; 2022.

Em *A.thaliana* há dois locus gênicos que codificam para ATE : *AtATE1* (At5g05700) e *AtATE2* (At3g11240). Ambas proteínas são funcionais e possuem papel na via N-end rule. No entanto, também já foi observado que a ATE1 possui função associada a senescência foliar da planta. A *A.thaliana* DLs1 possui uma senescência foliar mais tardia quando comparada a *A.thaliana* selvagem (wt) e, em estudos posteriores que buscavam analisar diferenças do metabolismo da planta, foi observado a ausência de transcritos do gene da ATE 1. Sucessivamente, foi analisado que em DLs1 que tinham expressão de ATE1 por meio da integração do gene ao genoma celular por plasmídeo T-DNA, apresentavam normalização na senescência foliar (YOSHIDA, Satoko *et al.*, 2002).

Em 2016, a fim de verificar se a ATE poderia ter atividade antiviral ao CLRDV, Fausto analisou a infecção do vírus CLRDV em *A.thaliana* wt, *A.thaliana* superexpressora de ATE (35S:ATE) e também em *A.thaliana* com o nocaute do gene *ATE1* e *ATE2* (K. Fausto, Anna.2016; Tair.2024), uma vez que o gene de ATE foi identificado em locus gênico de resistência do *G.hirsutum* ao CLRDV (figura 4). Após 5 dias da infecção por meio do vetor

Aphis gossypii, foi feita a amplificação por Nested PCR de transcritos da proteína de capsídeo viral, onde se observou que as plantas selvagens inoculadas tiveram amplificação do RNA viral, ou seja, foram infectadas e, além disso, apresentavam bandas mais fracas de ATE quando comparado com plantas selvagens não inoculadas (Figura 7). Nas plantas *ate1ate2* nocaute teve-se um aumento da intensidade da banda correspondente ao vírus, logo maior amplificação de RNA viral, e ausência na banda de ATE. Nas plantas 35S:ATE não ocorreu amplificação de RNA viral e observou-se um aumento da amplificação de ATE.

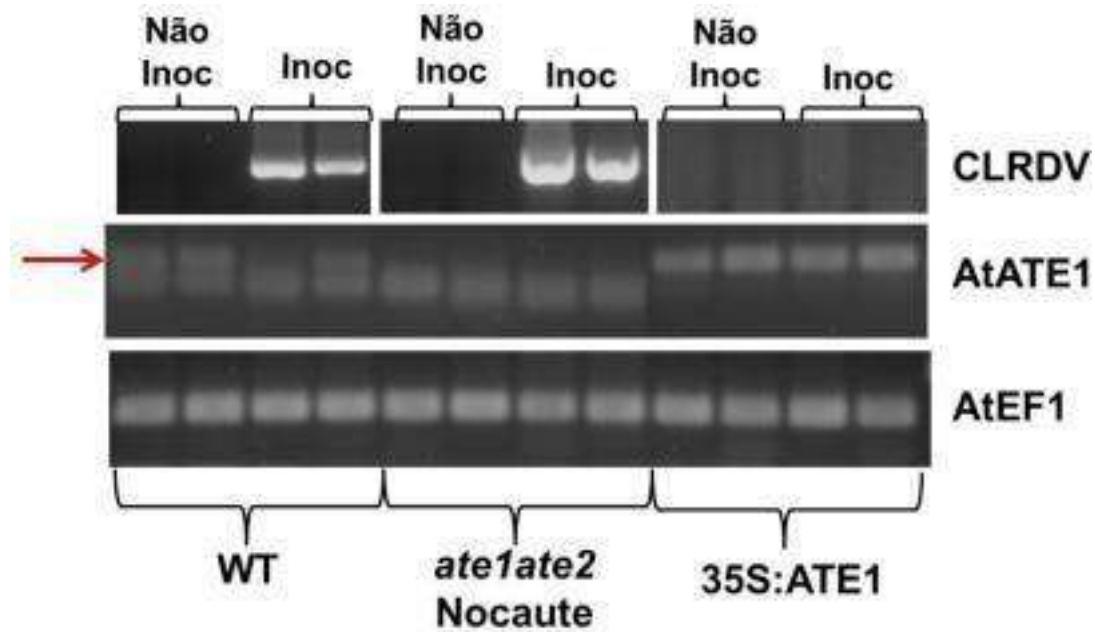


Figura 7: Análise de susceptibilidade ao CLRDV e de expressão de ATE1 de linhagens de *Arabidopsis thaliana* selvagens, nocaute e de superexpressão de ATE1 por RT-PCR. Painel superior: Nested-PCR para região do capsídeo viral; painel central: RTPCR da AtATE1, a seta indica o tamanho do amplicom esperado (137 nt); painel inferior: RTPCR para expressão do fator de elongação de *Arabidopsis* (AtEF1). A visualização foi realizada sob luz UV em gel de agarose 1,5%. K. Fausto, Anna.(2016).

Assim conclui-se que a superexpressão ATE parece estar associada à resistência de *G. hirsutum* à infecção pelo CLRDV. Observou-se em estudos recentes do nosso grupo que a *Arabidopsis thaliana* transgênicas que superexpressam a ATE apresentavam menos transcritos da proteína viral de capsídeo do TRV (Tobacco ratlle virus) em folhas sistêmicas quando comparadas com as folhas sistêmicas de *A.thaliana* selvagens (Figura 8). O TRV é da família *Virgiviridae* e gênero Tobravírus, ou seja, sua família e gênero são diferentes do CLRDV e, por enquanto, aparentemente a ATE vem apresentando um comportamento inibidor da disseminação

viral mediante a diferença entre as famílias de plantas e vírus.

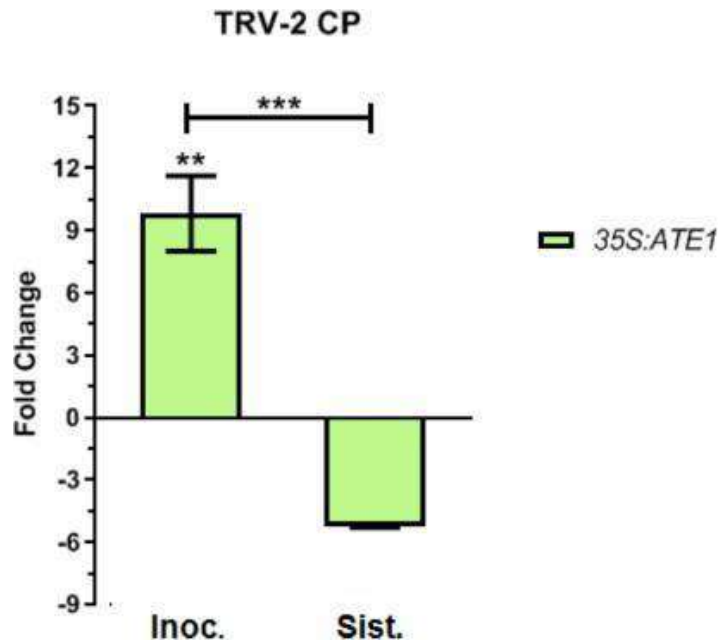


Figura 8: Expressão do gene de CP em plantas 35S:ATE1 de *A. thaliana* infectadas por Tobacco rattle virus (TRV) em 6dpi. As folhas inoculadas (Inoc.) e sistêmicas (Sist.) foram coletadas. A análise da expressão foi feita pelo método 2- $\Delta\Delta$ Ct utilizando as plantas wt infectadas como controle. Os resultados estão representados em fold change segundo SCHMITGEN e LIVAK (2008). *Testes ‘Two-way ANOVA’ $p < 0.05$. Resultado de Brito, FB; 2020.

Diferente de *A.thaliana*, em *N.benthamiana* há 5 tipos de ATE. Dentro dos 5 tipos de ATE presentes, há 3 genes com sequências homólogas a de ATE1 (Nbe.v1.s00010g21680; Nbe.v1.s00070g23120 e Nbe.v1.s00150g16660) e dois genes com duas sequências homólogas a ATE2 (Nbe.v1.s00110g00610 ; Nbe.v1.s00130g10390) de *Arabidospis thaliana*. Apenas as homólogas a ATE1 apresentaram expressão em *N. benthamiana* e não há descrição sobre suas funcionalidades (NbenBase;2024).

1.6 Potato Vírus X

O potato vírus X (PVX) é um vírus que tem as plantas herbáceas dicotiledôneas como hospedeiras, principalmente da família *Solanaceae*, como *Solanum tuberosum* (batata) e *Solanum lycopersicum* (tomate). O PVX é um vírus assintomático, mas comumente ocasiona o desenvolvimento de mosaicos nas folhas de plantas infectadas, como mostra na figura 9. No

entanto, pode ter desenvolvimento de sintomas mais severos quando há co-infecções com vírus de famílias diferentes, como potato vírus Y (PVY, Potyviridae). Em co-infecções pode ter, por exemplo, o surgimento de enrolamento das folhas e aumento da necrose.



Figura 9: Folha de *N. benthamiana* com sintomas ocasionados pela infecção pelo PVX. Há visualização de mosaicos e o clareamento da nervura principal. Adaptado de Aguilar et. al, 2016.

O PVX é um vírus que pertence ao gênero Potexviridae da família *Alphaflexiviridae*. Os vírions do PVX possuem uma morfologia filamentosa entre 470 e 580 nm de comprimento, sendo composto do genoma viral de 6.400 nt de fita simples de RNA com sentido 5'-3' e é associado a proteínas de nucleocapsídeos. Possui uma cauda poliadenilada na extremidade 3' e também possui Cap na extremidade 5'. O genoma viral é composto por 5 ORFs, como mostra abaixo na figura 10.

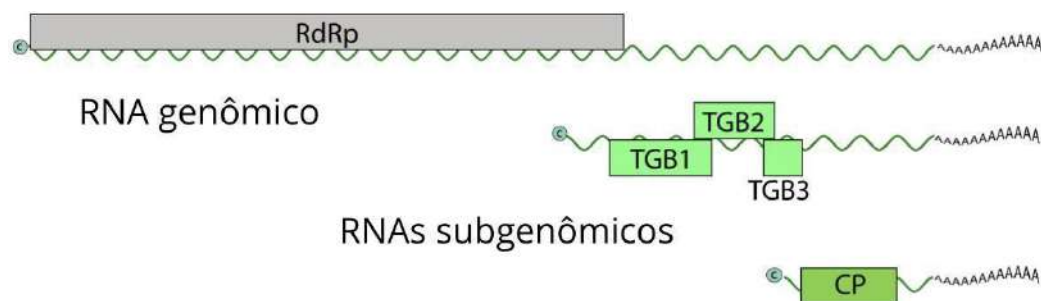


Figura 10: Ilustração do genoma viral do Potato virus X (PVX). Trata-se de um genoma de fita simples positivo que contém cauda poliadenilada na porção 3' e cap na porção 5'. Possui Orf para polimerase dependente de RNA (RdRp), para 3 proteínas virais (TGB1, 2 e 3) e também para a proteína de capsídeo. Adaptado de Viralzone e ICTV (2024)

A ORF1 codifica para a polimerase dependente de RNA (RdRp -166 kDa), as ORFs 2, 3 e 4 codificam genes que se sobrepõem e codificam para 3 proteínas que estão associadas ao movimento do vírus célula à célula. Pelo fato de serem três proteínas virais e ORFs subsequentes e sobrepostas, a região é denominada de bloco triplo de genes (TGB). A TGBp 1 (25kDa) é uma proteína codificada pela ORF 1 que é capaz de suprimir o silenciamento da planta, aumentar o diâmetro do plasmodesma e também funciona como uma helicase para RNA. As TGB 2 e 3 são proteínas que possuem domínios transmembrana e residem nas membranas do retículo endoplasmático e também são encontradas no plasmodesma (BAYNE *et al.*, 2005; TILSNER *et al.*, 2013). Foi reconhecido que a TGBp 3 possui interação com a TGBp 2 e que ambas são encontradas em vesículas granulares advindas do ER, o que pode auxiliar na movimentação dos vírions para células adjacentes via plasmodesma. Tanto a proteína de TGB 1, 2 e 3 estão presentes em uma estrutura perinuclear onde ocorre a replicação do vírus, a qual é denominada de corpo X, onde também há RNA viral e RdRp (Figura 11) (WU *et al.*, 2019).

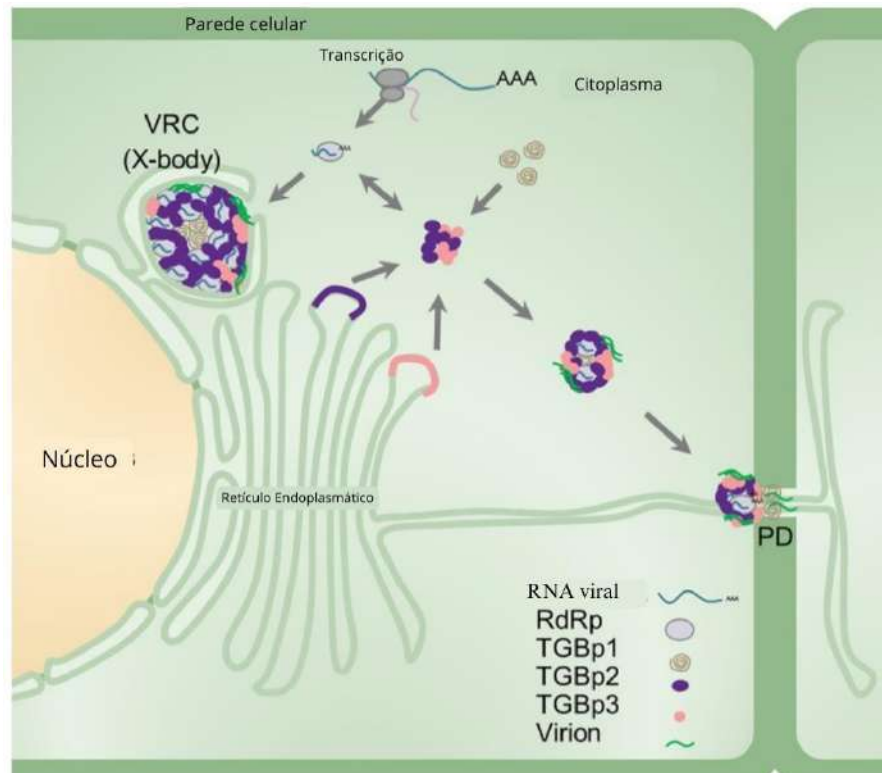


Figura 11: Ciclo do PVX em célula vegetal. Inicialmente ocorre a tradução do genoma viral fita simples 5'-3' e posteriormente a RdRp viral inicia a replicação do RNA a partir da fita antisense negativa (3'-5'). Com a replicação feita há o aumento de fitas simples de RNA 5'-3', genoma viral. Logo, aumenta-se também a síntese proteica, visto que o RNA 5'-3' já é traduzido pelo ribossomo. A replicação do vírus ocorre na região perinuclear denominado corpo X, onde o RNA

viral fica oculto de nucleases e RNAi. As proteínas de movimento TGB 1, 2 e 3 auxiliam no movimento dos vírions formados e também dos não formados residentes do corpo x até o plasmodesma. No plasmodesma o vírus consegue infectar a célula adjacente. Imagem retirada de WU, X. et, 2019

O PVX é comumente utilizado para estudos a respeito da infecção sistêmica na planta, visto que possui um bloco triplo de proteínas que estão associadas à movimentação do vírus célula a célula (TILSNER *et al.*, 2012). Em estudos anteriores pelo nosso grupo, utilizou-se o PVX para avaliar se a replicação poderia ser afetada na superexpressão de ATE em *Arabidopsis thaliana* 35S:ATE. Foi visto que folhas sistêmicas de *A. thaliana* 35S:ATE continham menor quantidade de transcritos da proteína viral TGB2 do PVX quando comparadas com as folhas sistêmicas de plantas de *A.thaliana* selvagens (Figura 12). Diferentemente, as folhas agroinoculadas apresentaram maior concentração de transcritos da TGB2 nas plantas 35S:ATE do que nas plantas WT, o que pode ser um indício de que o aumento da atividade da ATE possa conter a disseminação do vírus via célula a célula. Ademais, em outros experimentos foi observado o aumento de transcritos de ATE1 nas folhas sistêmicas de *A. thaliana* 35S:ATE.

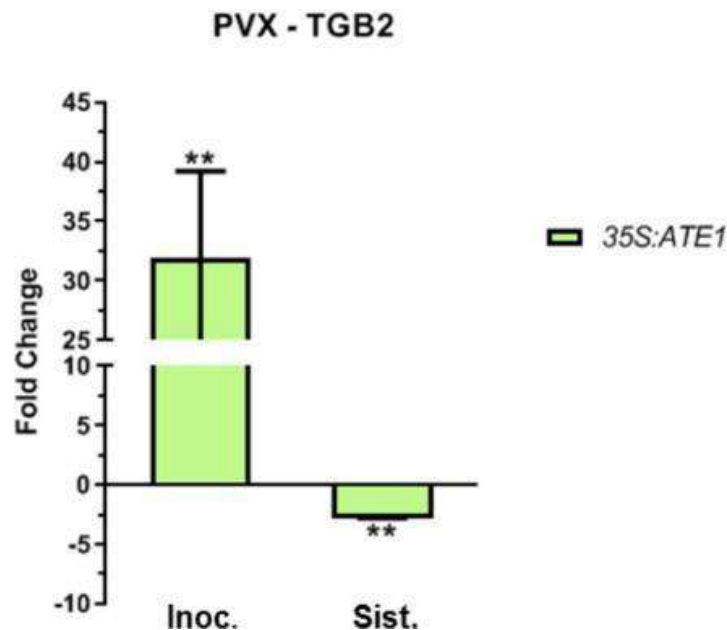


Figura 12: Expressão do gene de TGB2 em plantas 35S:ATE1 de *A. thaliana* infectadas por Potato virus X (PVX). As folhas inoculadas (Inoc.) e sistêmicas (Sist.) foram coletadas com 6dpi. A análise da expressão foi feita pelo 34 método 2- $\Delta\Delta C_t$ comparando os níveis de acúmulo de PVX nas plantas SE com os níveis nas plantas wt infectadas. Os resultados estão representados em fold change segundo SCHMITGEN e LIVAK (2008). Análise estatística foi realizada utilizando Two-way ANOVA e teste de Tukey com $p < 0,01$. Disponível em Brito, FB; 2020.

2 Justificativa

Em função dos graves prejuízos em lavouras associados a doenças virais, e antevendo possíveis influências futuras ocasionadas pelo aquecimento global que possam intensificar infecções virais em plantas, é extremamente importante ter estudos que busquem entender novos mecanismos de resistência antiviral a fim de mitigar os danos causados pelas viroses.

Sabe-se que o gene da Arginil t-RNA tranferase foi identificado dentro de um locus gênico de *Gossypium hirsutum* (algodoeiro) associado à resistência ao CLRDV. Posteriormente, estudos com *A. thaliana* 35S:ATE mostraram que a superexpressão de ATE é capaz de inibir a replicação de CLRDV (Fausto, 2016). Dados preliminares mostraram a inibição do espalhamento sistêmico de PVX e TRV em *Arabidopsis thaliana* 35S:ATE aonde não foram detectados os transcritos da proteína TGB2 do PVX e da proteína de capsídeo do TRV nas folhas sistêmicas (Brito, 2018).

Dessa forma, a ATE, é capaz de catalisar a degradação de proteínas pela adição de ARG em N-terminais específicos, e vem apresentando um comportamento antiviral em plantas.

3 Objetivos

O objetivo deste projeto é ter mais dados que mostrem se a resistência contra o CLRDV mediada pela ATE é ou não restrita a este vírus ou se ATE faz parte de uma possível nova via de resistência viral de plantas.

Busca-se, portanto, aprofundar os resultados anteriores de *A. thaliana* avaliando a presença de PVX em plantas superexpressando ATE e entender se a interação ATE com PVX pode atrapalhar seu espalhamento em *N. benthamiana*.

3.1 Objetivos específicos:

A) Analisar a disseminação de PVX em *A. thaliana* WT e *A. thaliana* 35S:ATE agroinoculadas com PVX-GFP

B) Avaliar se há detecção de PVX-GFP em folhas novas sistêmicas por meio do RT-PCR.

C) Avaliar se a co-infiltração de ATE e PVX influencia a disseminação de PVX em *N. benthamiana* WT e 16c

4 MATERIAL E MÉTODOS

1) Agrobactérias e agroinfiltração

Para ser feita a infecção viral nas plantas de *Arabidopsis thaliana* e *N. benthamina* utilizamos a técnica de agroinfiltração, onde a *Agrobacterium tumefaciens* age como a mediadora do processo infeccioso viral.

A *A.tumefaciens* é uma bactéria que na natureza é comumente encontrada na rizosfera, onde pode infectar plantas que estão com leves feridas ou danos, visto que com os danos há liberação de compostos fenólicos que são capazes de ativar proteínas Vir A presente na membrana da bactéria. As proteínas Vir A quando ativadas são responsáveis por ocasionar uma cascata de fosforilação na bactéria que vai desencadear na expressão gênica de mais proteínas Vir, como por exemplo, a VirD1 (helicase) e VirD2 (endonuclease). A VirD1 e VirD2 vão reconhecer sequências de repetição que delimitam a região T-DNA dentro do plasmídeo Ti (LB e RB). A VirD2 será responsável por transferir o T-DNA para o núcleo da célula vegetal, logo, há necessidade de que mantenha a síntese das proteínas Vir nas agrobactérias com o T- DNA modificado como ilustrado na figura 13 (LEE; GELVIN, 2008; CHEN *et al.*, 2013)

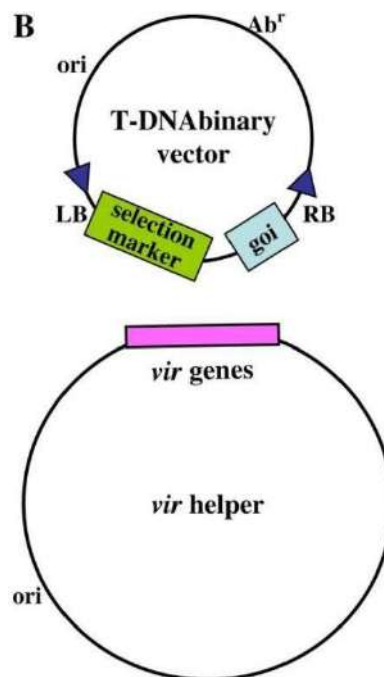


Figura 13: Ilustração de um Vetor binário e *vir* helper. O vetor binário é composto pela região do T-DNA que é delimitada pelas regiões LB e RB. Dentro da porção LB e RB pode se adicionar a sequência de interesse e um marcador que sinalize o sucesso da transformação. Há também a região Ori (origem de replicação) e a Ab, a qual deve possuir um gene de resistência à antibiótico específico. No plasmídeo *vir* helper há um bloco contendo todos os genes *vir*, ori de replicação e também pode adicionar outro gene de resistência a outro antibiótico. Imagem do artigo LEE, L.-Y et al; 2008.

Dessa forma, a *A. tumefaciens* é comumente utilizada para transformar plantas com sequências de interesse engenheiradas na região do T-DNA. No caso de agroinoculação, o genoma viral é inserido no T-DNA de modo que nas células transformadas ocorre a síntese de partículas virais.

Neste projeto foi utilizada uma *A. tumefaciens* com o genoma do potato virus X (PVX) clonado sob controle do promotor constitutivo 35S, ambos dentro do T-DNA. O genoma do PVX também está fusionado ao gene repórter GFP. As agrobactérias PVX-GFP (PVX-GW-GFP) foram cedidas pelo Dr. Cristiano Lacorte, da Embrapa Cenargen, DF. A fusão da GFP foi feita por meio da recombinação gateway (LACORTE *et al.*, 2010). Dessa forma, após a inserção do T-DNA no DNA da planta, ocorre a transcrição do RNA viral e sua tradução, logo, o ciclo viral se inicia na célula que é denominada como transformada transientemente. Os vírions formados deixam esta célula e se espalham pela planta e sua presença e espalhamento pode ser acompanhada pela fluorescência emitida pelo gene GFP. A presença de partícula viral nas células pode ser analisada dias após-agroinfecção, onde são analisadas e comparadas a resposta celular das plantas selvagens (*wild type*) e a resposta das que apresentam superexpressão de gene associado à resistência de infecção (35S:ATE1), no caso de plantas de *Arabidopsis*, ou respostas à infecção na presença de proteínas adicionadas, no caso de plantas de *N.benthamiana*.

As culturas bacterianas foram infiltradas na superfície abaxial de folhas com uma seringa de 1 ml sem agulha, como é apresentado na figura 14. Dessa forma, o inóculo de *Agrobacterium* com vetor binário PVX + gene repórter de GFP ultrapassa a barreira física da planta (parede celular) e, caso tenha expressão gênica do genoma viral, será emitido fluorescência entre 6-14 dias após a agroinoculação (a fluorescência é causada pela GFP ao ficar sob emissão de UV). Outras agrobactérias com vetores binários diferentes foram utilizadas nos experimentos. A proteína p19, imunossupressora de silenciamento em vírus do gênero *Tospovirus*, presente em um vetor binário de outra cepa de *A. tumefaciens*, foi utilizada para minimizar a resposta de silenciamento da planta.

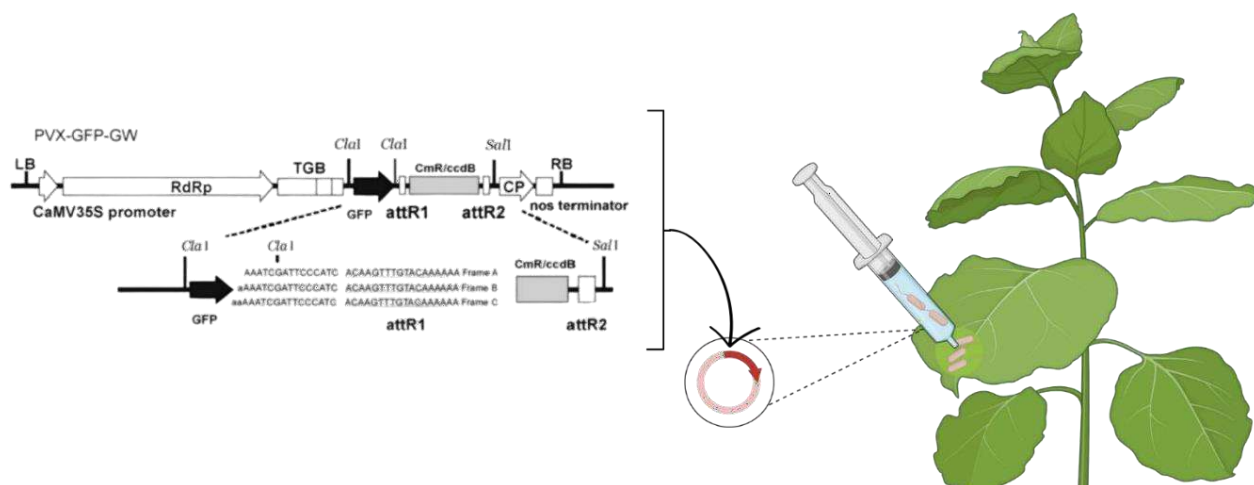


Figura 14: Construção de PVX clonado em vetor binário de *Agrobacterium tumefaciens*. No vetor há as regiões LB e RB que demarcam o T-DNA, há a região promotora CaMV35S e, em seguida o genoma completo do PVX contendo os genes que codificam a RNA polimerase (RdRp), a proteína de movimento (TGB), a proteína do capsídeo e a GFP. ClaI e SalI correspondem a sítios de enzimas de restrição e attR a região de recombinação utilizada na clonagem.

Utilizou-se também em alguns experimentos a agrobactéria com vetor vazio (\emptyset), (pART) a qual não possui adição de genes ou genoma de interesse no vetor binário, sendo apenas a construção do T-DNA. Por fim, também foi utilizada nos experimentos uma cepa que possui o gene da enzima ATE de *G. hirsutum* inserido no T-DNA como ilustrado na tabela 1.

Tabela 1: Cepas de *Agrobacterium tumefaciens* a serem utilizadas para os experimentos em *N. benthamiana* wt e em *A. thaliana* wt e 35S:ATE.

	Cepas de <i>A. tumefaciens</i>	Nome do vetor
<i>Arabidopsis thaliana</i> WT e 35S:ATE	p19	pJL3
	PVX-GFP	PGR207
<i>Nicotiana benthamiana</i> WT e 16 C	p19	pJL3
	PVX-GFP	PGR207
	ATE	pART
	Vetor \emptyset	pART

1.1 Crescimento de agrobactérias

As culturas de agrobactérias foram crescidas em meio LB (Luria Bertani) sólido (10ml) em placa de petri ou LB líquido em tubo Falcon de 15 ml contendo seus antibióticos de resistências. Para a semeadura das diferentes cepas de Agrobactérias utilizou-se soluções estoque

de Kanamicina 50 mg/ml, Gentamicina 30 mg/ml, Rifampicina 50 mg/ml e Espectromicina 50 mg/ml que foram diluídas no meio de crescimento (Luria Bertani - LB). Colônias frescas e isoladas das placas de agrobactérias foram semeadas em tubo Falcon contendo 3 ml de LB, a fim de preparar o inóculo para agroinfiltração. Como mostra na tabela 2, a concentração final deve ser de 50 µg/ml de Kanamicina e Rifampicina e 30 µg/ml de gentamicina em cepas de Agrobactérias com vetor para PVX-GFP e P19. Nas Agrobactérias com vetor de pART e ATE a concentração final deve ser 50 µg/ml de Rifampicina, Gentamicina e Espectromicina.

Tabela 2: Adição de antibióticos de resistência na concentração ideal para cada volume em ml de LB (3 ou 20ml).

	PVX-GFP	P19	pART	ATE
Kanamicina	50 µg/ml	50 µg/ml	-	-
Rifampicina	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
Gentamicina	30 µg/ml	30 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
Espectromicina	-	-	50 µg/ml	50 µg/ml

Cada cepa de *A.tumefaciens* possui seu antibiótico de resistência. Sendo que em pART e ATE os antibióticos rifampicina, gentamicina e espectromicina ficam em 50 µg/µl. Distintivamente, em p19 e PVX-GFP a rifampicina e kanamicina ficam em 50 µg/µl e a gentamicina fica em 30 µg/µl.

2) Material Vegetal

N. benthamiana selvagem, *N. benthamiana* 16c e *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia Col-0 (WT) e 35S:ATE foram utilizadas nos experimentos. As sementes de *A. thaliana* transgênicas para a superexpressão do gene *AtATE1* (35S:ATE1) foram obtidas através da colaboração com a Dra. Emannuelle Graciet (Trinity College Dublin, Irlanda). Tanto a *A. thaliana* wt quanto a *A. thaliana* 35S:ATE foram agroinfiltradas com GV3101 PVX-GFP e GV3101 P19 em fase exponencial de crescimento apresentando uma densidade óptica de 1. Na figura 15 é ilustrado como foram preparados os experimentos.

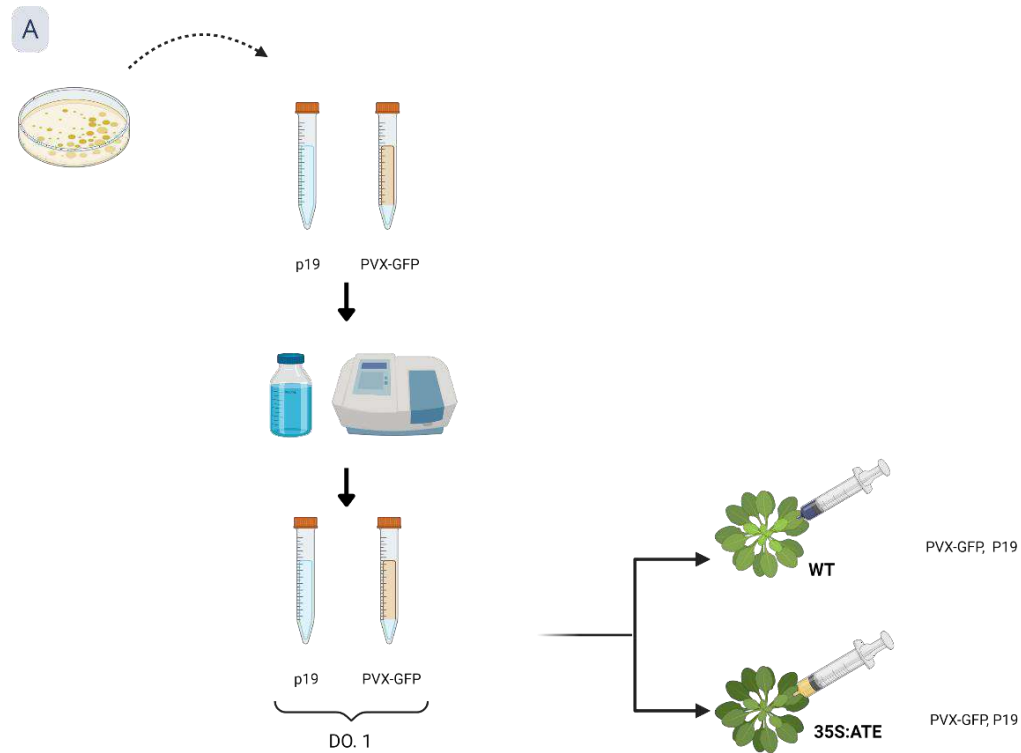


Figura 15: Nos experimentos com *Arabidopsis thaliana* foram germinadas plantas selvagens e transgênicas 35S:ATE. Ambas serão agroinoculadas com PVX:GFP por meio de um inóculo com *A. tumefaciens* PVX-GFP e P19. DO final de 0,5 para PVX e 0,5 para ATE no inóculo contendo as duas culturas.

No experimento com *N. benthamiana*, plantas selvagens foram co-agroinfiltradas com dois inóculos diferentes. Primeiramente, dois grupos de 15 plantas selvagens foram agroinfiltrados; um deles com o inóculo contendo *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 com PVX-GFP, ATE e a cepa com p19, e o segundo grupo com *A. tumefaciens* com PVX-GFP, vetor vazio (pART) e p19. O vetor \emptyset será utilizado como controle e para manter a concentração de agrobactérias em ambos inóculos, visto que em um grupo não há tratamento com a ATE, como mostra na figura 16.

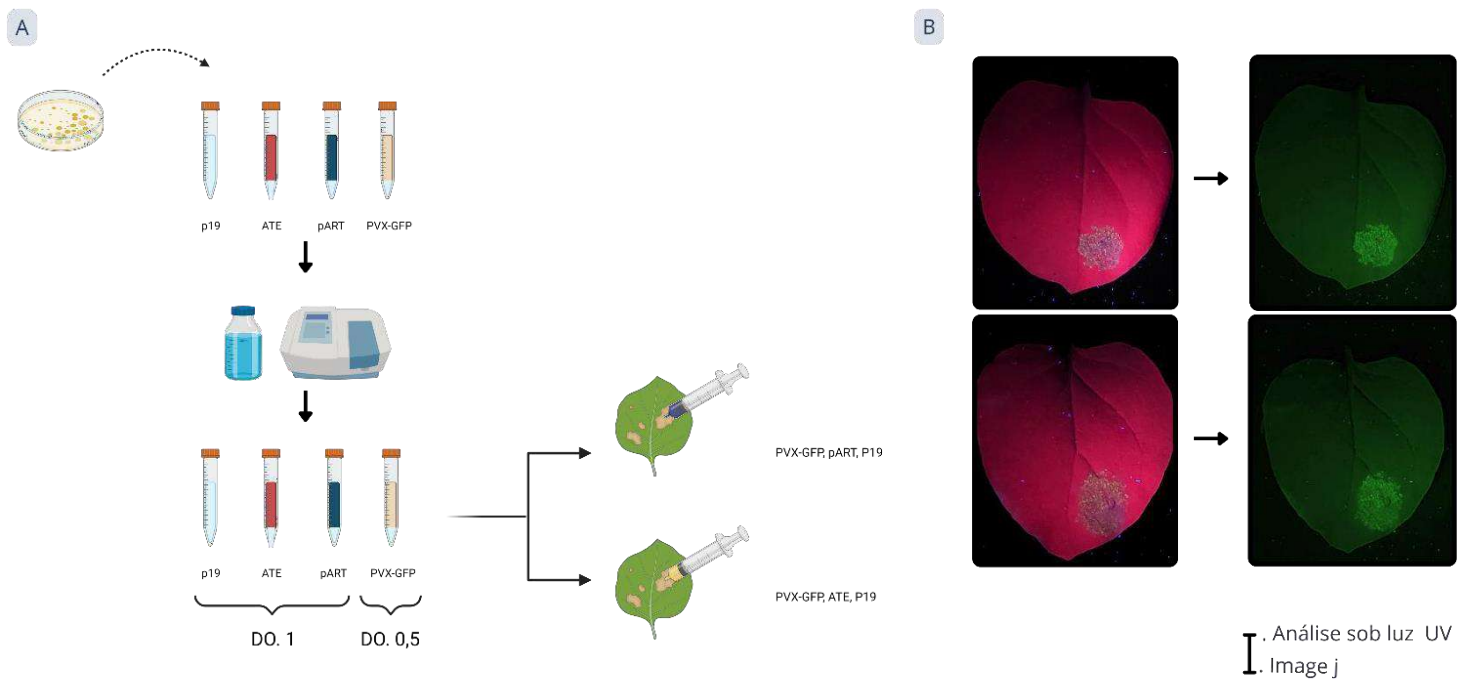


Figura 16: Nos experimentos com *N. benthamiana*, mostrados na figura A, a agroinfiltração ocorreu em dois grupos de 15 plantas cada: em um grupo foi agroinfiltrado ATE + PVX-GFP + P19 e o outro PVX-GFP + vetor vazio + P19. A agroinfiltração foi feita em duas folhas de cada planta. A densidade óptica de dos inóculos de p19, ATE e Vetor \emptyset (pART) foram mantidas em 1 nas culturas iniciais, mas quando feito o inóculo final cada uma terá DO de 0,33. Enquanto a densidade óptica de PVX-GFP foi mantida em 0,5 na cultura inicial, sendo no inóculo final então uma DO de 0,166 (Figura A). Posteriormente, após 4, 5 e 6 dias após a agroinfiltração (dpi) foram registradas fotos sob luz UV de cada amostra de grupos com diferentes tratamentos e analisadas no Image J FIJI com filtro para cor verde.

Além da agroinfiltração individual, isto é, cada inóculo distinto em sua respectiva folha e planta foram feitas também agroinfiltrações de ambos os inóculos em uma única folha, uma vez que isto permite a melhor visualização e comparação dos diferentes tratamentos em uma única amostra (folha). As folhas com diferentes tratamentos de agroinfiltração em *N. benthamiana* foram analisadas e coletadas em 4, 5 e 6 dpi.

. *N. benthamiana* 16c

A *N. benthamiana* 16c é uma planta transgênica que expressa GFP, mas a planta também silencia o GFP. Sendo assim, em ausência de supressão do silenciamento, a GFP é silenciada (BALLY et al., 2018). Portanto, não há fluorescência intensa da GFP quando a *N. benthamiana* 16c é observada sob luz UV, mas por ainda ter a expressão de GFP a planta não tem a coloração vermelha característica da clorofila quando observada na luz UV. No entanto, quando é feito

tratamento com vírus que possuem proteína supressora de silenciamento é visto fluorescência de GFP sob luz UV, uma vez que o silenciamento da planta é suprimido.

Cerca de 5 folhas em cada planta de *N.benthamiana* 16c foram infectadas com 4 inóculos distintos na mesma folha : Inóculo com PVX - GFP com DO em 0,5; inóculo com PVX 0,5 de DO + ATE com 0,25 de DO; PVX com 0,5 de DO + ATE com 0,5 de DO; PVX com 0,5 de DO + ATE com 1 de DO.

Como foi feita a mistura de cultura de ATE e de PVX com diferentes valores de densidade óptica, quando junta-se as culturas ambas vão ter diluição no inóculo final, logo, a DO final de ambos vetores será menor. Como PVX teve a mesma DO em todos os inóculos (0,5 de DO inicial), quando misturado com outra cultura ficará em 0,25 de DO, uma vez que a proporção foi de 1:1 (50% PVX + 50% ATE). Agora, em ATE teve inóculos com diferentes valores de DO, então para cada inóculo de ATE terá diferentes valores para cada DO final. Sendo a DO final do inóculo com adição de ATE 0,25 igual à 0,125; a DO final do inóculo com adição de ATE 0,5 igual à 0,250; DO final do inóculo com adição de ATE 1 será igual a 0,5.

3) Esterilização de *Arabidopsis thaliana* e germinação em placa.

As sementes de *Arabidopsis* foram germinadas em placas de Petri para propiciar maior eficácia de germinação. O meio utilizado foi o meio Murashigue & Skoog (MS) sólido. Para o preparo de 300 ml de meio MS foram utilizados 0,875g de sais MS (Sigma), 3,5g de sacarose, 3,5 g de ágar e 35 ml de MES com pH 5,7. Para ajustar o pH de MES para 5,7 foi feita a adição de KOH com auxílio de pHmetro (Sartorius Co.). Antes de colocadas sobre o meio de cultura, as sementes foram esterilizadas com etanol 70% + Tween 20 (capaz de higienizar as sementes sem causar danos prejudiciais à germinação) na primeira etapa da esterilização. Em seguida, o etanol e tween foram descartados após 5 minutos de suspensão das sementes. Em seguida foi feita uma lavagem com etanol 96% por 1 minuto para retirar resíduos do Tween. As sementes esterilizadas secaram por 1 min em papel filtro e depois elas foram colocadas em placas de Petri com meio MS onde permaneceram por 48 horas na geladeira e, consecutivamente, por 1 semana em câmara de crescimento com fotoperíodo de 8h claro:16h escuro com lâmpada LED Full Spectrum 600w em temperatura de 23°C. Após o desenvolvimento das plantas nas placas, elas foram transplantadas para potes com substratos ‘MecPlant’ e vermiculita na proporção de 3:1. A agroinfiltração nas folhas da roseta foi realizada em torno do trigésimo dia.

4) Quantificação da fluorescência com Image J Fiji

As folhas agroinoculadas de *N. benthamiana* foram analisadas e fotografadas sob luz UV de alta intensidade (360-400 nm), utilizando lâmpada portátil BLACK-RAY B-100A em 4, 5 e 6 dias após a agroinfiltração. As imagens foram analisadas pelo programa Image J Fiji (versão image j 1.54f - win 64 - java 1.8_322), o qual é comumente utilizado avaliar imagens com fins científicos por meio de seu cálculo através dos pixels (Schneider, 2012). Primeiramente deve ser adicionada uma medida de referência nas fotos para permitir a análise de quantos pixels terão em um centímetro. Em cada imagem foi inserida a referência de medida por meio da adição de um cubo ao quadrado adicionado presente nas fotos. Depois, as fotos eram filtradas por meio do canal verde, a fim de filtrar somente o verde do GFP na região fluorescente, deixando a análise mais limpa. Em seguida foi realizada a demarcação da região fluorescente em formato livre, a fim de demarcar somente a região fluorescente, para avaliar a área e a média de intensidade de pixels presente na região. Os resultados foram devidamente repassados para uma tabela e depois analisados estatisticamente.

5) Extração de RNA

O RNA total foi extraído de amostras foliares utilizando Trizol (Ambion Co.) em todas as amostras obtidas de *N. benthamiana* e *A. thaliana* segundo protocolo do fabricante. As amostras de folhas de *N. benthamiana* foram maceradas em cadinhos e as amostras de *A. thaliana* em tubos de eppendorf. Depois foi feita pesagem das amostras para adicionar o volume ideal de Trizol em cada amostra de acordo com a proporção de 1 ml de trizol para cada 100 mg de tecido. Em seguida, foi adicionado clorofórmio (Sigma Aldrich Co.) para ser feita a separação de componentes liberados na lise celular. O RNA extraído foi então precipitado por meio da adição de 500 µl de isopropanol gelado seguido da centrifugação a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. Depois da precipitação, foi feita lavagem pelo acréscimo de 100 µl de etanol 75% seguida de centrifugação a 7.500 rpm por 5 min a 4°C. Os tubos ficaram abertos para evaporar o álcool. Uma vez secos, os RNAs foram ressuspensos em água miliQ seguida de eluição em termobloco a 55 °C por 15min.

A qualidade dos RNAs extraídos foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e Nanodrop para averiguar o grau de pureza e também a sua concentração. Para a obtenção do c-DNA, utilizou-se 1 µg de RNA total.

6) RT-PCR

Para obtenção do c-DNA, foi utilizada a enzima Superscript IV Transcriptase Reversa (Invitrogen Co). O processo foi feito em três etapas para cada amostra. Na primeira etapa os restos de DNA foram removidos das amostras de RNA utilizando-se o mix da DNase (Buffer + DNase RNase free) e deixando o RNA em 10 ul da solução (RNA + água mili-q + 1 ul de

buffer e 1 μ l de DNase) por 30 min a 37 °C em termobloco. Em seguida, foi adicionado 1 μ l de stop buffer para inativar a enzima DNase. Cada tubo permaneceu por 10 min a 70 °C para parar a atividade da DNase. Na segunda etapa foi feito uma mistura do primer que continha Oligo dT 50 μ M e dNTP 10 mM para cada amostra. Na terceira e última etapa, foi feita a adição Superscript IV Transcriptase Reversa da Invitrogen Co (200U/ μ L) + 4 μ l de Buffer + 1 μ l de 100 mM DTT + 1 μ l de RNase OUT.

7) PCR

Para avaliar a presença do PVX nas plantas agroinfiltradas, utilizou-se dois primers: forward e reverse que são capazes de anelar na região da sequência codificadora da proteína de movimento TGB2 (ORF3) do PVX-GFP e, assim, permitir que inicie a extensão da taq polimerase recombinant (Thermofisher Co). A Tabela 3 mostra os primers utilizados.

Tabela 3: Primers forward e reverse usados para amplificação da sequência da ORF3 (TGB2) do PVX por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Primer	Sequência	Amplicons
Forward	5' ATTTGGGACCAGCAACAGAG 3'	132 pb
Reverse	3' ATGCTGATTTTCGGTGACTCC 5'	132 pb

Primeiramente foram feitos mixes com os componentes necessários para que ocorra a amplificação da sequência. Foi feito um mix para ter a distribuição de 24 μ l para cada amostra. Cada amostra continha tampão da Taq polimerase (diluído para 1x); cloreto de magnésio em 1,5 mM; dNTP em 0,2 mM; primer forward e reverse em 0,4 μ M; Taq polimerase em 1.25 U. A Taq era adicionada por último e homogeneizada com pipeta. Com o mix feito para cada amostra em microtubos de eppendorf, ou seja, cada eppendorf com 24 μ l, 1 μ l da amostra era adicionado em seus respectivos tubos.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min; desnaturação 95°C por 1 min, anelamento a 64 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1min por 40 vezes; e finalização a 72 °C por 10 min e 1 °C ∞).

Por fim, após o PCR, as amostras foram analisadas em um gel de agarose com 12 poços (50 ml de TAE 0,5x e 0,4g de agarose). Antes de inserir 6 microlitros das amostras nos poços,

elas foram homogeneizadas com 4 microlitros de tampão de *loading* para aumentar a densidade das amostras e assim permitir que precipitem nos poços em que foram inseridos. Depois da corrida em cuba Bio-rad em 90 volts, o utiliza-se o brometo de etídio por 30-40 min a fim de que ocorra a marcação de ácido nucleico, visto que é intercalante de bases nitrogenadas. As bandas obtidas foram analisadas em transiluminador Foccus.

8) Análise estatísticas

Os resultados da intensidade de fluorescência e do tamanho da área fluorescente demarcadas pelo programa Image J Fiji (versão image j 1.54f - win 64 - java 1.8_322) foram organizados em tabelas no Excel de acordo com o experimento realizado. Posteriormente, os resultados foram analisados em Two Way Anova no Prism (GraphPad_Prism_8.0) para determinar se os valores obtidos apresentam diferenças significativas entre si.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de infecção do PVX em *Nicotiana benthamiana*

A fim de analisar se a presença de ATE pode influenciar o comportamento da infecção de PVX em *N. benthamiana* foram realizadas co-agroinfiltrações de folhas jovens combinando vetores que continham o genoma do vírus PVX acrescido do gene repórter (GFP) e um vetores contendo o gene da proteína ATE, como descrito no tópico 4.1. Dessa forma, pode-se avaliar se a super expressão transiente de ATE podia de alguma forma impactar a disseminação do vírus ou impactar a infecção da planta. A agroinfiltração foi feita com bactérias crescidas a 0,5 de DO (densidade óptica) com o vetor contendo o genoma de PVX + outras agrobactérias crescidas a DO de 1,0 que possuíam o gene de ATE no vetor e também foram crescidas agrobactérias a DO de 1,0 que continham o gene de p19 no vetor. Como controle folhas foram co-agroinfiltradas com inóculo final contendo GV3101 PVX à 0,166 de DO + GV3101 pART à 0,33 de DO e GV3101 p19 à 0,33 de DO final. Nestes experimentos, apenas uma agroinfiltração foi realizada por folha de *N. benthamiana*.

A fluorescência de GFP começou a poder ser observada por volta do quarto dia, como mostra a figura 17, e, observou-se que por volta do sexto dia tinha surgimento de uma região necrótica que pode ser proveniente de danos na agroinfiltração ou causada pela infecção pelo PVX.

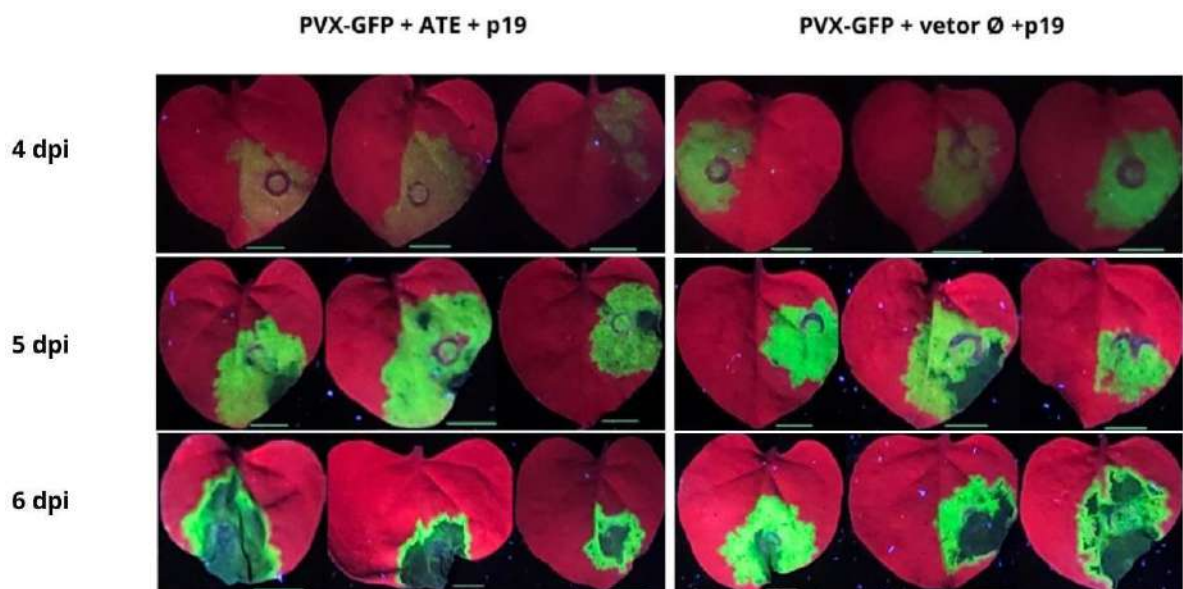


Figura 17: Folhas de *N.benthamiana* agroinfiltradas com PVX-GFP + ATE e p19 ou PVX-GFP + vetor vazio + p19 em 4, 5 e 6 dias após agroinfiltração analisadas sob luz UV. Cada régua indica 0,5 cm

Dez folhas tratadas com PVX + ATE + p19 e 10 folhas com PVX + vetor vazio + p19 foram analisadas pelo Image J FIJI em cada tempo a fim de avaliar se havia diferença no tamanho da área fluorescente e na intensidade da fluorescência. As áreas fluorescentes foram demarcadas e as medidas obtidas para cada co-infiltração foram analisados no GraphPad_Prism.

Como podemos observar na figura 18A, não houve diferença significativa das entre as médias das áreas fluorescentes entre os grupos tratados com e sem ATE tanto em 5 como em 6 dpi. Vale ressaltar que os desvios padrões obtidos foram altos e isto se deve provavelmente a um número amostral pequeno que pode ter impactado a análise. Apesar dos desvios padrões serem menores na análise da intensidade do GFP, ainda assim não houve diferença significativa entre as intensidades. Apesar de não validadas estatisticamente, as imagens obtidas mostram tendências que parecem indicar que as folhas tratadas com ATE poderiam apresentar menor fluorescência no 5 dpi quando comparadas com as tratadas com PVX e pART. Já no 6 dpi a fluorescência ficava equivalente em ambos os tratamentos.

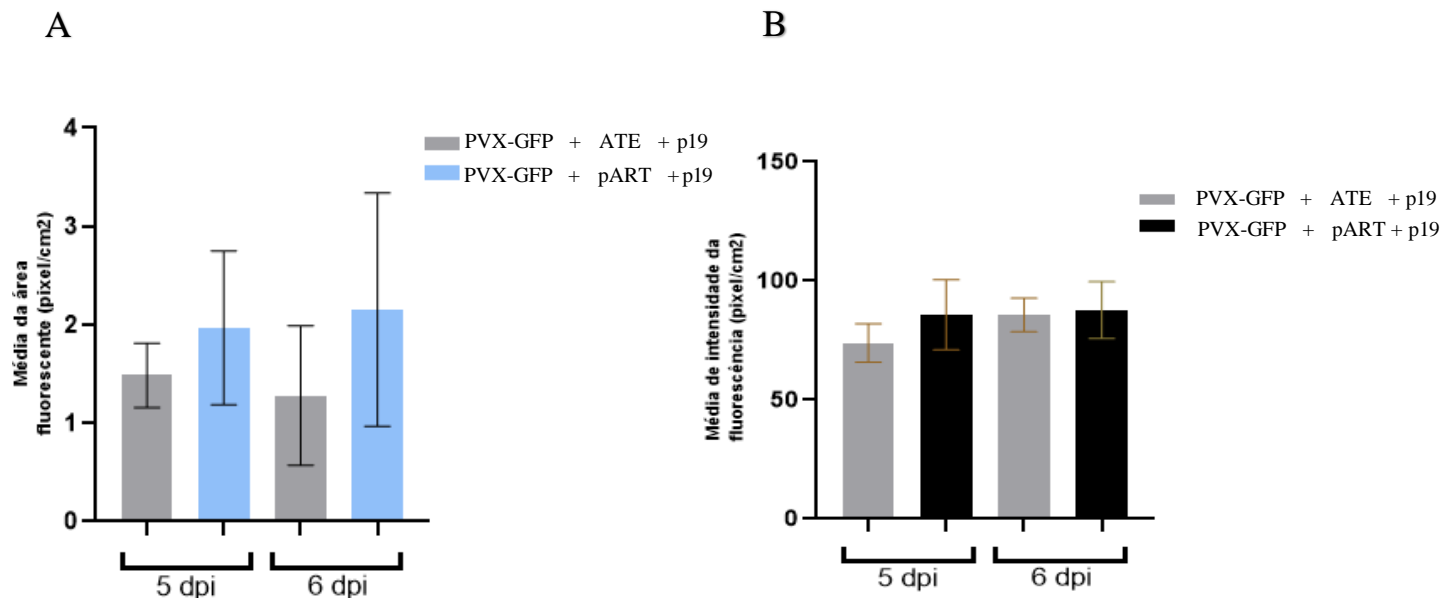


Figura 18: No gráfico A é visto a média das áreas de fluorescência das plantas tratadas com ou sem ATE. Ambos os grupos tinham p19. Foi feita análise estatística feita com Two way ANOVA e teste de Tukey com $p < 0,05$. No gráfico B é analisado a média da escala da fluorescência de plantas tratadas com ou sem ATE. A análise estatística também foi realizada com Two way ANOVA e análise multifatorial de Tukey nas médias de fluorescência do 5 e 6 dpi

Logo, o experimento foi repetido com um N maior (15 folhas analisadas em cada dia) e as

análises foram feitas novamente. Na figura 19A, é possível avaliar que não ocorreu diferença significativa entre a média das áreas fluorescentes de PVX + ATE ou PVX + pART, tendo valores equivalentes. No entanto, quando é feita a análise da média de intensidade do GFP, é observada uma tendência de aumento da fluorescência entre o grupo tratado sem ATE e com ATE no quarto dia e no quinto dia vemos que as diferenças de intensidade entre os tratamentos são significativas ($p < \text{valor de } 0,05$) (Figura 19B). No sexto dia a média da intensidade fica equivalente.

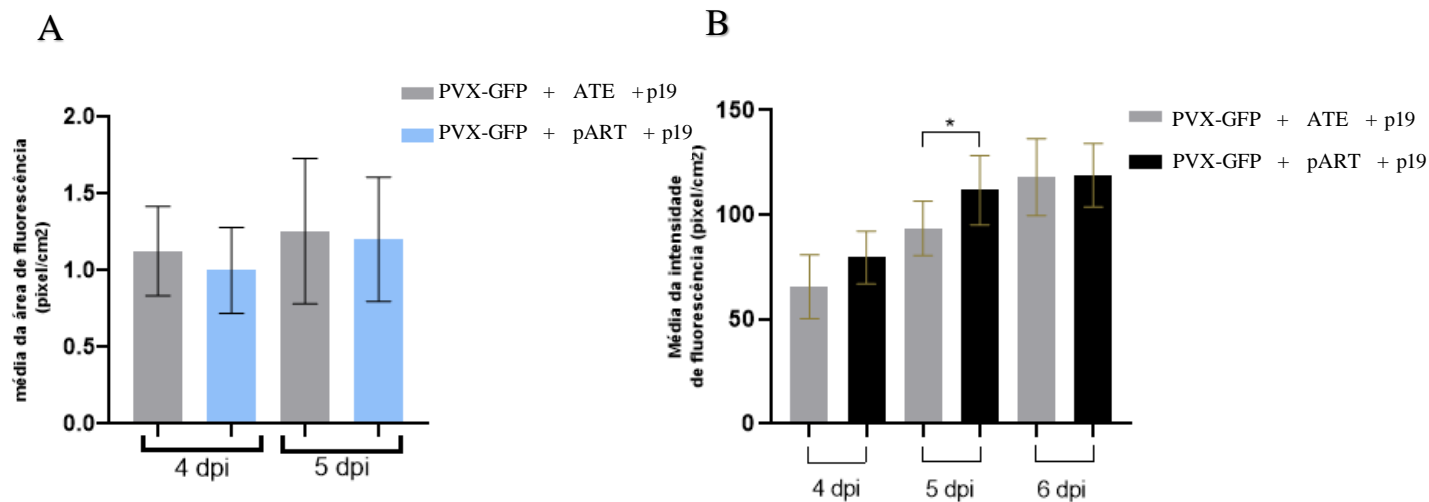


Figura 19: No gráfico A é analisada a média da área de fluorescência de plantas tratadas com ou sem ATE. Ambos os grupos tinham p19. A análise estatística foi feita com Two way ANOVA e teste de Tukey com $p < 0,05$. No gráfico B é analisado a média da intensidade da fluorescência por pixels/cm filtrada pelo canal verde no Image J FIJI. Os resultados foram analisados via Two way ANOVA e teste de Tukey $p < 0,05$

Paralelamente aos experimentos anteriores, foi feita a análise e comparação do surgimento de infecção sistêmica de 12 plantas de *N. benthamiana* agroinfiltrada com PVX + ATE + p19 e de 12 plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com PVX + pART + p19. O espalhamento viral pode ser observado a partir do 7º dia após a agroinfiltração nas folhas novas. O espalhamento sistêmico pode ser observado em 100% das plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas sem ATE (PVX + pART + p19). Entretanto apenas 58,3 % das plantas agroinfiltradas com PVX na presença de ATE apresentaram fluorescência no sétimo dia (tabela 4). Em 8 dpi 91,6 % das plantas agroinfiltradas com PVX + ATE + p19 apresentavam infecção sistêmica. O atraso de 1 dia no espalhamento sistêmico de quase metade das plantas em que ocorreu superexpressão de ATE no local da agroinfiltração pode ter impactado o movimento e

espalhamento do vírus pela planta. Uma hipótese é que a ATE poderia estar reconhecendo alguma proteína de movimento do PVX como um possível alvo impactando na diminuição ou no atraso do movimento do vírus via plasmodesma.

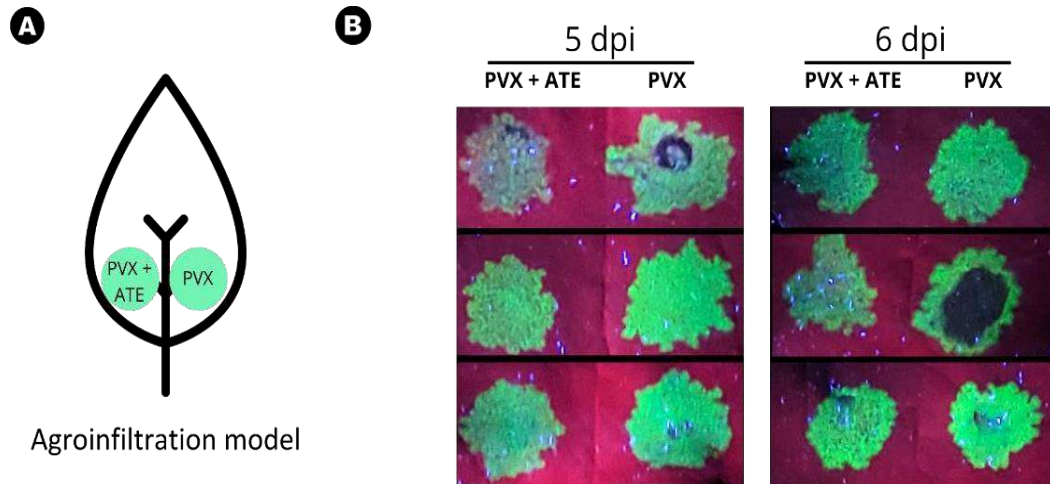
Tabela 4: Análise de infecções sistêmicas em plantas de *N.benthamiana* agroinfiltradas com PVX-GFP + ATE e PVX-GFP S.ATE em 7 e 8 dpi.

	% de infecção sistêmica 7 dpi	% de infecção sistêmica 8 dpi
PVX + pART + p19	100	100
PVX + ATE + p19	58,3	91,6

Observa-se acima que no oitavo dia cerca de 6 plantas tratadas com ATE + PVX-GFP não tinham desenvolvido a infecção sistêmica, enquanto somente 1 não havia apresentado infecção sistêmica na ausência de ATE. ATE pode estar associada a um possível atraso na movimentação do vírus célula a célula.

5.2 Co-agroinfiltração de diferentes inóculos em única folha de *N.benthamiana*

Para deixar as análises comparativas da atividade de ATE e para excluir possíveis alterações no metabolismo de plantas para a planta que afetem a replicação do PVX, foram feitas agroinfiltrações de inóculos PVX + ATE + p19 e controle PVX + pART + p19 na mesma folha. As folhas foram analisadas em 4, 5 e 6 dpi sob luz UV. Na figura 20 é possível observar diferenças na fluorescência emitida na presença e ausência de ATE. No quinto dia a fluorescência de GFP emitida quando há adição de ATE, é mais fraca e mais difusa, apresentando um padrão não uniforme com pontos mais escuros e outros mais claros. Nas folhas do grupo sem ATE pode-se observar uma fluorescência mais intensa e distribuída de forma uniforme. No sexto dia a diferença é menos acentuada, mas ainda é possível observá-la.



Modelo da Agroinfiltração

Figura 20: Observação de fluorescência após 5 e 6 dias de agroinfiltração em *N. benthamiana*. Na letra “A” é mostra esquema do experimento. Foram agroinfiltradas as combinações PVX + p19 + ATE e PVX + p19 + pART. Na letra “B” observa-se a fluorescência sob luz UV após 5 e 6 dpi.

Há aparentemente diferenças entre as áreas fluorescentes dos grupos tratados com PVX + ATE + p19 e PVX + pART + p19. No quinto e no sexto dia foram observados que a média da área fluorescente do inóculo que continha PVX + ATE + p19 eram menores do que quando o inóculo continha PVX + ATE + p19.

As imagens foram analisadas no Image J FIJI e observou-se uma tendência de menor intensidade da fluorescência no quinto dia, enquanto no sexto os resultados ficaram equivalentes (figura 21). Ressalta-se que o experimento era um teste, então seu número de amostras foi baixo (3 folhas para cada dia em diferente tratamento), implicando na ausência de diferenças estatisticamente significativas nas análises.

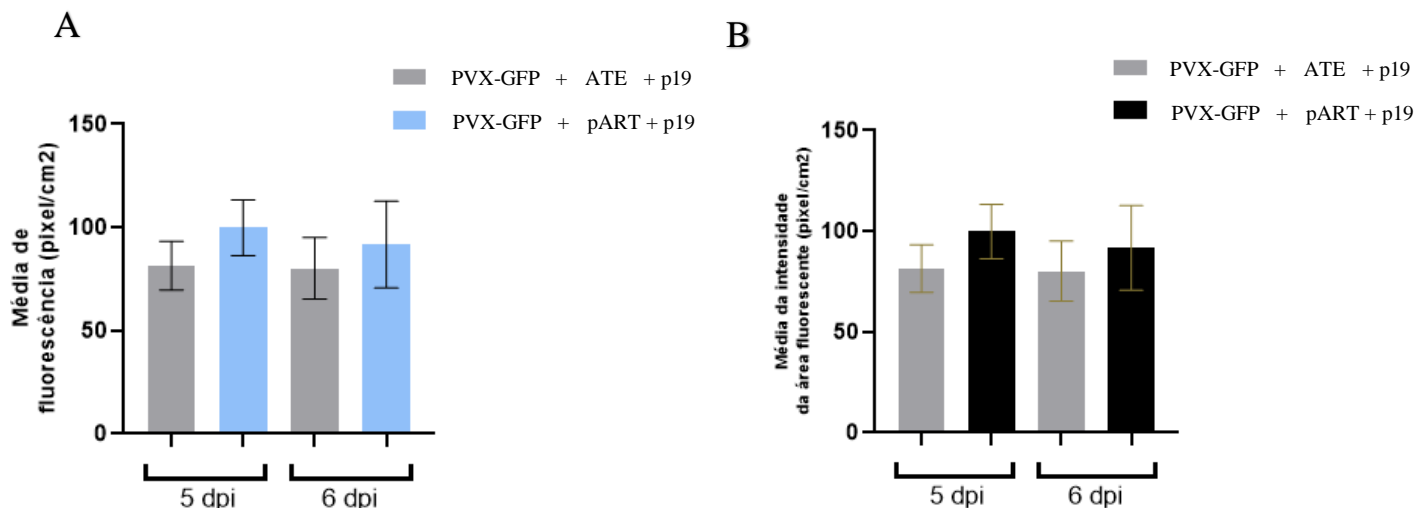


Figura 21: No gráfico A é analisada a média da área de fluorescência de plantas tratadas com PVX + ATE + p19 ou . A análise estatística foi feita com Two away ANOVA e teste de Tukey com $p < 0,05$. No gráfico B é analisado a média da intensidade da fluorescência por pixels/cm filtrada pelo canal verde no Image J FIJI. Os resultados foram analisados via Two away ANOVA e teste de Tukey $p < 0,05$

O experimento foi feito novamente com maior número de amostras (10 para cada tratamento em 4, 5 e 6 dias após agroinfiltração) e as imagens foram novamente analisadas no image J FIJI. Porém, dessa vez o experimento também foi feito com presença de p19 ou com sua ausência, a fim de verificar se teria diferença na supressão do silenciamento.

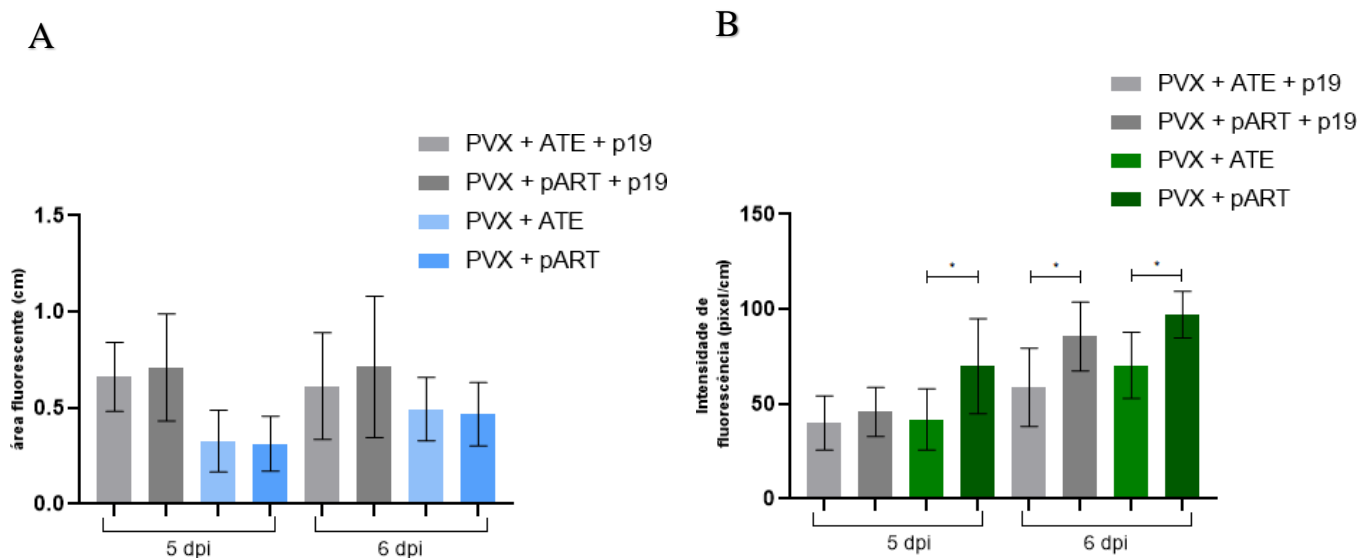


Figura 22: No gráfico A é analisada a média da área de fluorescência de plantas tratadas com ou sem ATE + p19 e também é visto a área de plantas tratadas com ou sem ATE e Ø p19 . A análise estatística foi feita com Two away ANOVA e teste de Tukey com $p < 0,05$. No gráfico B é analisado a média da intensidade da fluorescência por pixels/cm filtrada pelo canal verde no Image J FIJI. Os resultados foram analisados via Two away ANOVA e teste de Tukey $p < 0,05$

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias da área fluorescente do grupo tratado com ou sem p19 (Figura 22A). Entretanto, é possível observar que a média da área fluorescente mostrou uma tendência de ser maior na presença da p19, enquanto o grupo não tratado com p19 teve uma média menor tanto no quinto quanto no sexto dia após agroinfiltração. Quando analisadas as intensidades das áreas fluorescentes foi observado que a média da amostra tratada sem p19 e sem ATE é maior que a dos demais tratamentos em 5 dpi, sendo observada uma diferença significativa quando comparado com o grupo tratado sem ATE e com p19 ($p < 0,05$). Em 6 dpi é visto que os grupos tratados sem ATE possuem maior média da intensidade da

fluorescência quando comparados com o grupo tratado com ATE, tanto na presença como na ausência de p19. A ATE parece então impactar de alguma forma a replicação do PVX.

5.3 Avaliação do efeito de ATE na replicação do PVX em *Nicotiana benthamiana* 16c

A fim de aprofundar a compreensão do efeito de ATE na replicação e/ou espalhamento do PVX, foram feitas novas co-infiltrações em plantas de *N. benthamiana* 16c. Considerando os resultados obtidos anteriores a respeito das diferenças entre as médias da intensidade da fluorescência do grupo agroinfiltrado com ATE + PVX e PVX +pART, surge a hipótese que a ATE poderia estar degradando alguma proteína viral do PVX ou poderia estar atuando sobre alguma proteína endógena envolvida na defesa via RNAi. Plantas *N. benthamiana* 16c são transgênicas contendo o GFP endógeno. Nestas plantas GFP está silenciado por RNAi. Dessa maneira, nos experimentos com PVX-GFP, a replicação do vírus pode ser impactada tanto pela resposta de silenciamento da planta à GFP, quanto pela atuação de ATE em proteínas-alvo virais. Por outro lado, a intensidade de GFP tende a ser maior durante a infecção, uma vez que a atividade de TGB1 pode suprimir o silenciamento da GFP viral e endógena. Logo, caso ATE auxilie na degradação de TGB1, a atividade supressora de TGB1 seria impactada e, portanto, haveria maior silenciamento da GFP endógena e da GFP presente no genoma de PVX, o que também impactaria a fluorescência. Levando tudo isso em conta, a fluorescência pode ter sua intensidade duplamente afetada de forma positiva ou negativa; enquanto a replicação viral pode ser atenuada por ambas as formas (silenciamento de GFP e atividade de ATE).

O impacto na supressão de silenciamento em 16c pode diminuir a resposta de silenciamento do GFP na planta e devido a isso não se utilizará nos inóculos a proteína supressora de silenciamento p19, uma vez que a p19 ia suprimir o silenciamento e, consequentemente, aumentaria a quantidade de GFP endógeno. Sendo assim, não saberia se o aumento da GFP seria proveniente da atividade da supressora do PVX.

No experimento, cada folha de *Nicotiana benthamiana* 16 C foi agroinfiltrada com concentrações crescentes de ATE e um inóculo de PVX a 0,25 de DO. Foram infiltradas na mesma folha: PVX à 0,25 de DO + ATE à 0,125 de DO; PVX à 0,25 de DO + ATE à 0,250 de DO; PVX à 0,25 de DO + ATE 0,5 DO e PVX à 0,5 DO sozinho. Importante informar que como não foi feita equivalência da proporção do inóculo de PVX sozinho, portanto, há maior concentração do vírus nesse inóculo quando comparado com os que possuem ATE. A fluorescência foi analisada em 4, 5 e 6 dias após a agroinfiltração, como mostra na figura 23.

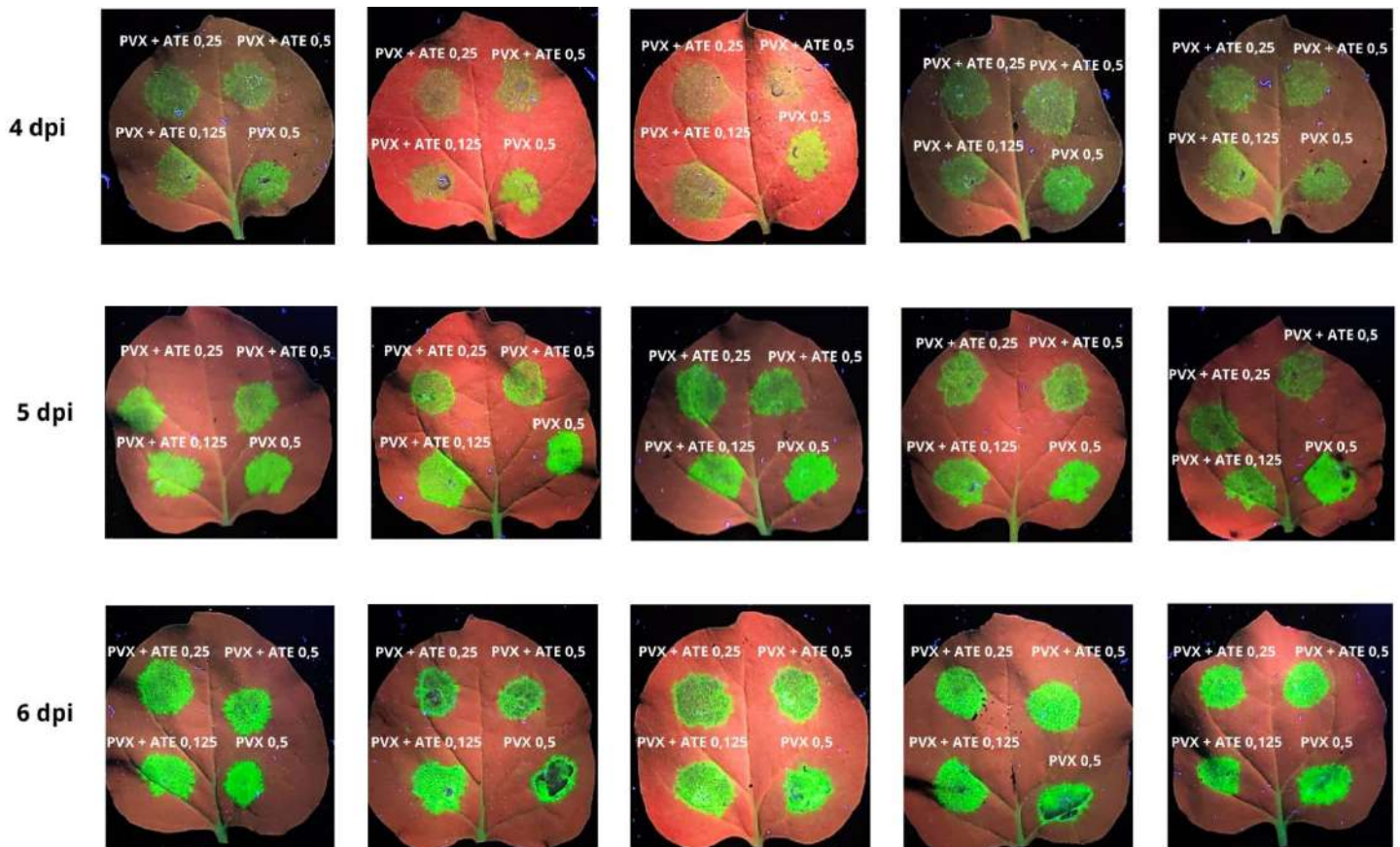


Figura 23: Folhas de *N.benthamiana* 16C após 4, 5 e 6 dias da agroinfiltração com 4 tipos inóculos em uma única folha observadas sob luz UV. Na região 1 foi agroinfiltrado somente com DO de 0,5 de PVX; na segunda região o inóculo continha 0,25 PVX + 0,5 de ATE; na terceira região o inóculo continha 0,25 de PVX + 0,25 ATE; na quarta região o inóculo continha 0,25 PVX + 0,125 ATE.

A dimensão de cada área fluorescente e a sua intensidade em 4 e 5 dpi foi analisada e, posteriormente, foi feita a análise estatística (Figura 24). A região agroinfiltrada com PVX + ATE 0,5 em 4 dpi apresentou a menor área média quando comparada com as regiões agroinfiltradas com PVX; PVX + ATE 0,125; PVX + ATE 0,25. No quinto dia a área fluorescente da região agroinfiltrada com PVX apresentou a menor média de área fluorescente, enquanto as áreas tratadas com PVX + ATE 0,5; ATE 0,25; 0,125 apresentaram áreas de fluorescência maiores. Entretanto estas diferenças não foram suportadas pelas análises estatísticas. Mostrando que não houve diferença entre as áreas.

Na análise da intensidade de GFP em 4 dpi (figura 24) observou-se que as regiões tratadas com PVX à 0,25 de DO + ATE à 0,5 ou a 0,25 de DO apresentaram menores médias quando comparadas com as regiões com PVX apenas ou PVX + ATE a 0,125 de DO. Na presença de ATE nas três concentrações ocorreu diminuição da intensidade da fluorescência em 4 dpi. Também foram observadas diferenças de intensidade entre as distintas concentrações de ATE,

mostrando que há um efeito aparentemente dose dependente. Foram observadas diferenças significativa entre as intensidades de fluorescência de regiões com ATE a 0,25 e a 0,5 de DO. Também foi observada diferença da intensidade da fluorescência entre a região com PVX 0,25 DO + ATE 0,25 DO e somente com PVX ($p < 0,001$). Em 5 dpi, as regiões tratadas com PVX 0,25 DO + ATE 0,5 DO apresentaram diferenças significativas quando comparadas com as regiões com PVX 0,5 somente ($p < 0,001$) e com PVX 0,25 + ATE 0,125 DO ($p < 0,01$). Assim como em 4 dpi, a região com PVX 0,25 DO + 0,125 DO teve diferenças significativas quando comparada com a região com PVX 0,5 DO ($p < 0,001$) e com PVX 0,25 DO + ATE 0,125 DO (0,01). As regiões com ATE 0,25 e 0,5 tiveram resultados equivalentes no 5 dpi.

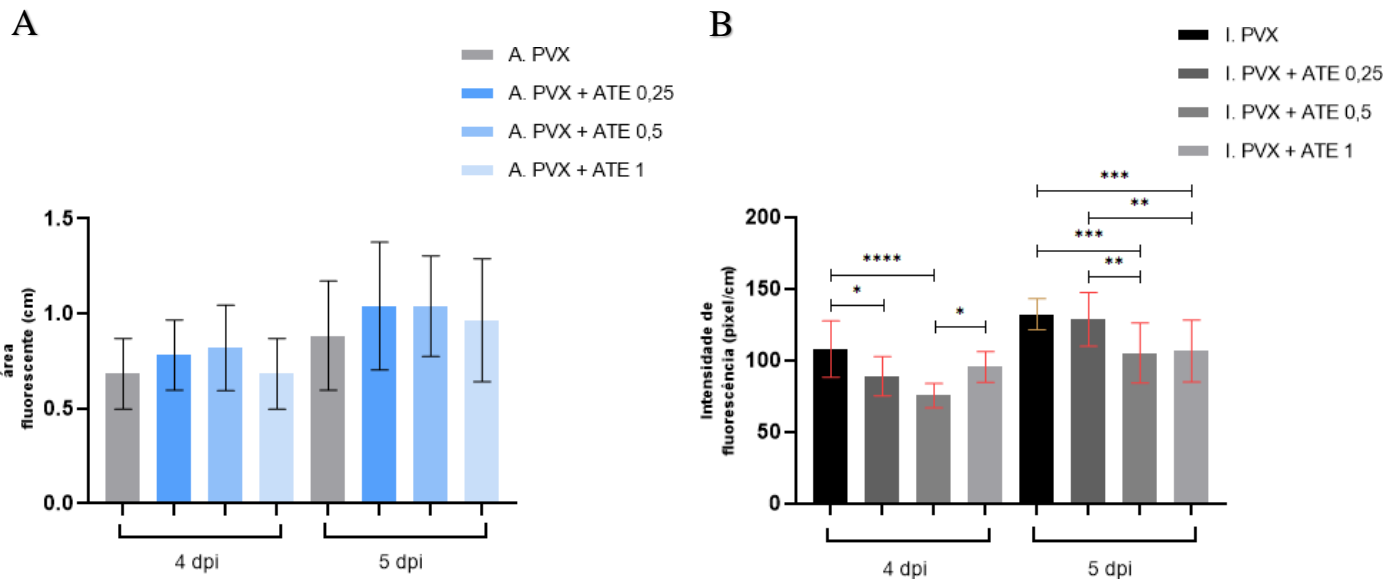


Figura 24: No gráfico A é feita a análise da média da área de fluorescência de regiões com diferentes inóculos em 4 e 5 dpi. Foi feita agroinfiltração com somente PVX e as outras regiões foram agroinfiltradas com PVX mais diferentes concentrações de ATE (1 DO, 0,5 DO e 0,25 DO). No segundo gráfico é analisada em 4 e 5 dpi, a média da intensidade da fluorescência por pixels/cm filtrada pelo canal verde no Image J FIJI. Os resultados foram analisados via ANOVA bidirecional e Tukey. * equivale a $p < 0,5$, ** equivale a $p < 0,01$, *** equivale a $p < 0,001$, **** equivale a $p < 0,0001$.

5.4 Análise da infecção do PVX em *Arabidopsis thaliana* wt e 35S:ATE

A fim de verificar se a superexpressão de ATE em plantas transgênicas de *Arabidopsis* poderia reprimir a infecção pelo PVX, foram feitas agroinfiltrações destas plantas com inóculos de PVX-GFP + p19. As observações foram iniciadas a partir do 6º dia após a agroinfiltração. Não foram visualizadas áreas fluorescentes de GFP delimitadas nas plantas. No entanto, as plantas selvagens agroinoculadas com PVX apresentaram menor fluorescência vermelha da clorofila do que plantas selvagens não agroinfiltradas. As plantas selvagens apresentavam um padrão mais esverdeado quando comparada com as plantas 35S:ATE (com padrão mais vermelha associado à clorofila).

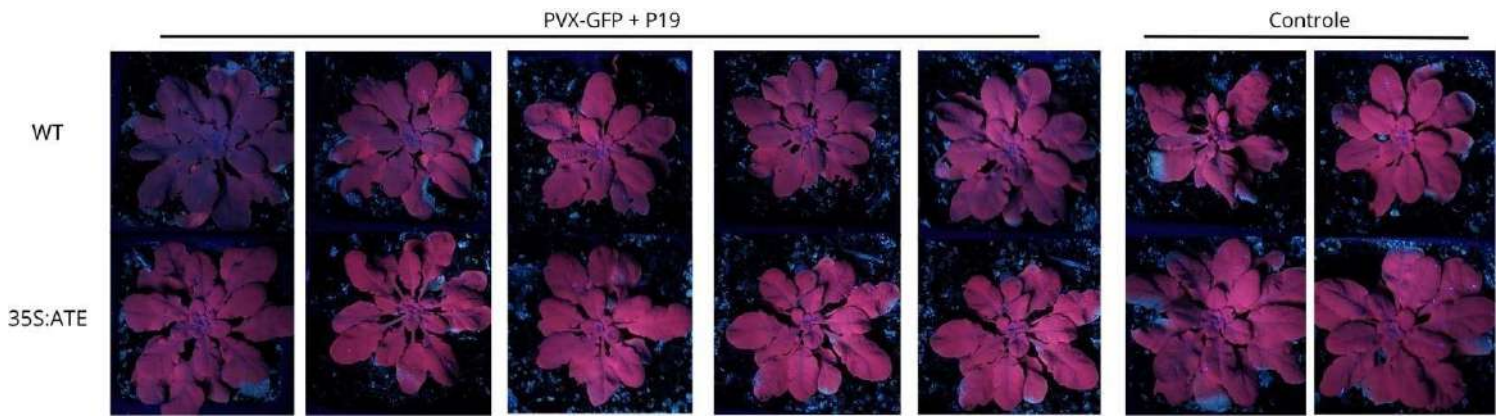


Figura 25: *Arabidopsis thaliana* WT e 35S:ATE infectadas com PVX GFP + p19 analisadas o 9 dia após agroinfiltração sob luz UV.

As amostras de folhas novas sistêmicas de *A. thaliana* WT e 35S:ATE foram coletadas para posteriormente ser feita a detecção de transcritos de TGB2 do PVX por meio de RT-PCR.

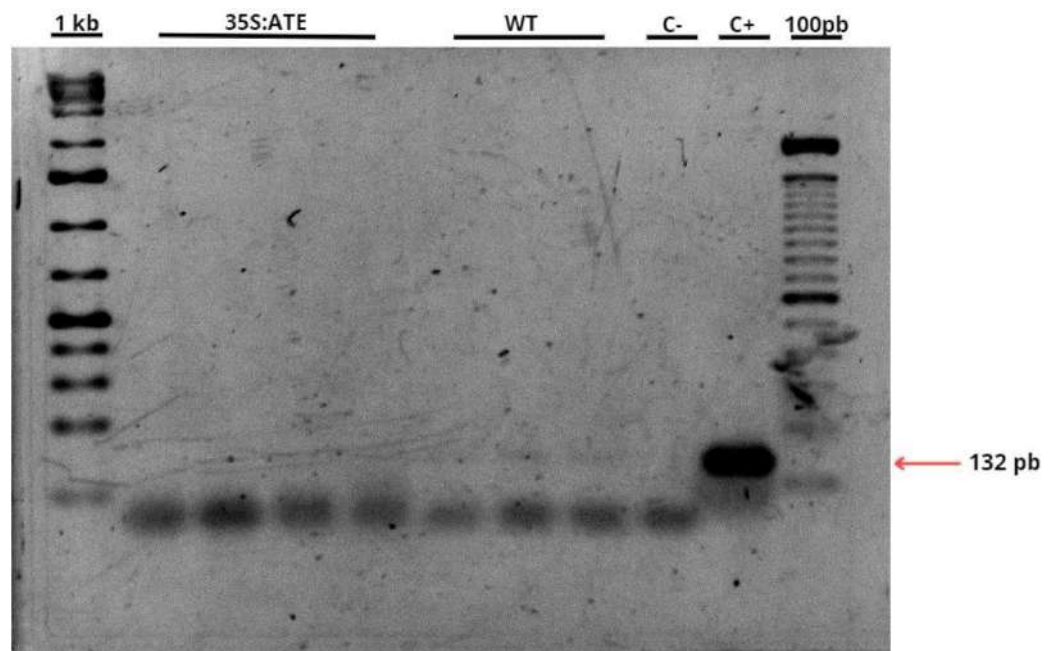


Figura 26: RT-PCR com amostras de folhas sistêmicas novas após 9 dias da agroinfiltração com PVX-GFP em *Arabidopsis thaliana* WT e 35S:ATE. (1) 1kb; (2) - 35S:ATE não infectada; (3) 35S:ATE c/PVX-GFP; (4) 35S:ATE c/PVX_GFP; (5) 35S:ATE c/PVX-GFP; (6) WT c/PVX-GFP; (7) WT c/PVX-GFP; (8) WT c/PVX-GFP; (9) controle negativo - sem DNA; (10) controle positivo - *N.benthamiana* infectada com PVX-GFP; (11) 100 pb. Espera-se que a banda com amplicom de PVX-GFP tenha 132 pb

No gel do RT-PCR é possível verificar que nas amostras de plantas superexpressoras de ATE (colunas 2, 3 e 4 e 5) não apareceram banda correspondentes à fragmento de 132 pb de TBG2. Já nas amostras selvagens apresentam bandas do tamanho esperado para o amplicom do transcrito

de TGB2 (132 pb). Dessa forma, parece que a superexpressão de ATE impacta a disseminação do vírus para folhas novas sistêmicas uma vez que não foi possível detectar o espalhamento sistêmico de PVX.

6 Discussão

As plantas possuem mecanismos de resistência contra as infecções virais, mas os vírus constantemente tendem a ter novos meios de evadir dos mecanismos de resistência das plantas. Desse modo, estudos para identificação a respeito de novos mecanismos de resistências das plantas a infecções virais são importantes para atenuar os danos ocasionados por infecções virais em cultivos.

Em estudos anteriores a respeito da ATE relacionada a infecções virais, a enzima ATE tem demonstrado estar associada à possível degradação da proteína de capsídeo do HIV, mas foi observado que essa degradação está associada ao maior êxito da formação de partículas virais infecciosas (KISHIMOTO et al., 2021). Em outro estudo é visto que a ATE pode impactar a infecção do vírus da doença de Newcastle (NDV), que é uma doença ocasionada em aves silvestres e selvagens, uma vez que a ATE é capaz de degradar a Hemaglutinina (glicoproteína do vírus) (SHOKEEN et al., 2024). Os estudos acima mostram que a atividade de ATE pode impactar vírus de diferentes espécies, mas o fato de ATE ter N-degrons alvo específicos, cada vírus pode ter uma proteína-alvo diferente e, portanto, o impacto da ATE sobre a infecção do vírus pode ser diferente para cada um (KISHIMOTO et al., 2021; SHOKEEN et al., 2024).

Nos estudos anteriores do nosso grupo, Laboratório de Virologia Molecular Vegetal – UFRJ, mostraram que a ATE está associada a resistência viral a infecções pelo CLRDV em plantas, como algodão e *Arabidopsis* (Fausto, et al., em preparação; Fausto A, 2016). No entanto, ainda não se sabe se este efeito é restrito ao polerovirus CLRDV ou é uma via de resistência antiviral geral em plantas. Em Fausto (2016), foi observado que em *Gossypium hirsutum* o aumento da expressão de ATE inibia a infecção sistêmica de CLRDV, quando infectado por pulgões. O mesmo comportamento também foi visualizado, posteriormente em Brito, Fernanda (2018), quando foi feita a agroinfiltração com outros vírus (PVX e TRV) em *Arabidopsis thaliana* superexpressora de ATE. A fim de ratificar esse comportamento e avaliar se a ATE pode ser uma via de defesa das plantas em infecções virais, buscou-se no presente trabalho analisar o comportamento de ATE em *N. benthamiana* e *A. thaliana* quando infectadas por PVX.

No presente estudo a ATE apresentou a capacidade de conter o vírus sistemicamente em *N. benthamiana*, uma vez que 58, 3% das plantas de *N. benthamiana* tratadas com ATE + PVX não apresentaram infecção sistêmica nos 10 dias após a agroinoculação, enquanto que todas as plantas tratadas com PVX e o vetor vazio apresentavam infecção sistêmica. Além disso, foi observada na figura 19 que a intensidade da fluorescência do GFP foi impactada em 4 e 5 dpi, o que indica que a replicação de PVX pode estar sendo afetada, visto que o GFP está associado

ao genoma viral no vetor. Sendo assim, a superexpressão local de ATE parece impactar a replicação e o espalhamento de PVX em *N. benthamiana*, principalmente no 5 dpi, onde diferenças significativas entre as plantas tratadas com e sem ATE foram observadas.

Outrossim, foi observado que no 6 dpi os resultados da intensidade da fluorescência entre os grupos ficam equivalentes, o que pode significar que a replicação do PVX chegou num limiar que não seja mais controlado pela atividade de ATE, uma vez que o vírus aumentar em uma progressão geométrica durante sua replicação e os níveis de ATE não aumentam, tendendo a diminuir ao longo do tempo após a infiltração. ATE não aumentará sua quantidade já que será produzida somente a partir do T-DNA transferido transientemente a partir da *A. tumefaciens*. Ademais, outro fator a ser levado em consideração é que o vírus consegue infectar outras células por meio do seu movimento célula a célula, enquanto ATE vai ficar contida naquela célula que tem o plasmídeo com o gene de ATE estiver e/ou o T-DNA tiver sido inserido ao genoma.

Nos experimentos que compararam as regiões de agroinfiltração de inóculos com e sem a presença de ATE em uma única folha (figura 20-21), foi visto no primeiro experimento um comportamento semelhante observado anteriormente quando feito com cada inóculo em folhas diferentes, tais como a maior diferença em 5 dpi e uma tendência de estabilidade da intensidade entre os grupos em 6 dpi. Quando o experimento foi feito com maior número de amostras os resultados apresentaram diferenças. Tendo uma tendência de maior intensidade da fluorescência no grupo tratado com ATE + PVX + p19 do que o grupo tratado com pART + PVX + p19 em 5 dpi, enquanto em 6 dpi apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Por fim, nas avaliações das áreas de fluorescência houve uma pequena diminuição da média no grupo tratado com ATE, mas não significativa.

A fim de avaliar se a ausência ou presença de p19 podia impactar o experimento, foram feitos também agroinfiltrações de inóculos sem sua adição (figura 22). Primeiramente, foi observado que em 5 dpi há uma diferença significava entre os grupos tratados com ATE e sem ATE; em 6 dpi, a intensidade aumenta, mas há diferença significativa se mantém. No entanto, os resultados dos experimentos parecem indicar de que a agroinfiltração sem p19 foi melhor para a replicação do vírus, uma vez que a média da intensidade de GFP na região da agroinfiltrada somente com pART foi mais alta do que a média da região do grupo tratado com pART + p19. As regiões tratadas com ATE + p19 ou ATE sem P19 tiveram médias equivalentes, porém esse comportamento pode ser um indício de que a ATE impactou a replicação e não necessariamente pela ausência de p19.

Tendo em mente esses resultados, a superexpressão de ATE vem demonstrando um

comportamento capaz de afetar a replicação do PVX. Em busca de entender como ATE pode estar impactando o vírus, foram feitas análises a respeito de possíveis proteínas do PVX que poderiam ser alvo de ATE. Verificou-se que as proteínas TGB1 e TGB3 poderiam ser reconhecidas por ATE (figura 27). A TGB1 e TGB3 são proteínas que estão associadas ao movimento do vírus, mas a TGB1 também está associada a supressão do silenciamento da planta (BAYNE et al., 2005; TILSNER et al., 2013). A TGB1 possui um o ácido aspártico na sua porção N-terminal e a TGB3 possui o ácido glutâmico, sendo ambos alvos de ATE (figura 27).

25K protein [Potato virus X] - TGB1 (supressora de silenciamento)

```
>BAA00250.1 25K protein [Potato virus X]
MDILISSLSKSLGYSRTSKSLDSGPLVVHAVAGAGKSTALRKLILRHPTFTVHTLGVPDKVSIRTRGIQKP
GPIPEGNFAILDEYTLDNTRNSYQALFADPYQAPEFSLEPHFYLETFRVPRKVADLIAGCGDFETNS
QEEGHLEITGIFKGPLLGVIAIDEESETLSRHGVFVKPCQVTGLELKVVTIVSAAPIEEIGQSTAFY
NAITRSKGLTYVRAGT
```

8K protein [Potato virus X] - TGB3 (proteína de movimento)

GenBank: BAA00252.1

```
>BAA00252.1 8K protein [Potato virus X]
MEVNTYLNAIILVLVVTIIAVISTSLVRTEPCVIKITGESITVLACKLDAETIKAIADLKPLSVERLSF
```

Figura 27: Proteínas do Potato Virus X (PVX) que possuem aminoácidos N-terminais alvo para ATE. Proteína de TGB1 com ácido aspártico (D) depois da metionina; Proteína TGB 3 com ácido glutâmico (E) depois da metionina. PubMed (2024)

Nos experimentos de *Nicotiana benthamiana* 16c buscou-se avaliar se a ATE em diferentes concentrações poderia impactar a supressão do silenciamento de TGB1. E foi observado que a ATE em 0,25 e 0,5 de densidade óptica impactaram a supressão de silenciamento, enquanto a ATE com concentração óptica de 0,125 teve resultado semelhante ao da amostra que só continha o vírus (PVX). Ainda não teve uma análise respeito da movimentação do vírus de forma sistêmica, visto que ocorreu a agroinfiltração de diferentes inóculos em cada folha e para avaliar de forma sistêmica precisaria ser feita a agroinfiltração de cada inóculo em plantas distintas.

Por fim, nos experimentos em *A. thaliana* wt e 35S:ATE foi visto o mesmo comportamento de inibição sistêmica do PVX analisado em Brito, Fernanda (2018), uma vez que não foi detectado transcrito da TGB2 do PVX em folhas sistêmicas novas de 35S:ATE. Porém, a análise do GFP em *A. thaliana* wt e 35S:ATE não foi possível de ser feita, pois nesta planta não ocorreu a expressão intensa de GFP como vista em *N. benthamiana*. A alteração visual mais perceptível nas plantas de *A. thaliana* foi uma diminuição da intensidade da clorofila quando

submetida a luz UV, visto que as plantas selvagens de *A. thaliana* tinham maior alteração da coloração vermelha (característica da clorofila na luz UV) quando comparadas com a 35S:ATE. A alteração do nível de clorofila não pode ser medida no Image J FIJI, sendo ideal medir com o fluorômetro modulado de clorofila.

7 Conclusão

Tendo como base que em *A. thaliana* 35S:ATE não foi detectado RNA de TGB1 em folhas novas sistêmicas e em *N. benthamiana* na presença de ATE ocorreu um atraso na disseminação do PVX em cerca de 50% das plantas, podemos concluir que a superexpressão de ATE parece ter um impacto na disseminação do PVX.

Além disso, as análises de intensidade de fluorescência indicaram que possivelmente o efeito de ATE é dose dependente. Os resultados suplementam a hipótese de que a ATE está associada a defesa antiviral em plantas, uma vez que foi visto este comportamento antiviral anteriormente em *G.hirsutum*, quando infectado pelo CLRDV (*Solemoviridae*), e em *A.thaliana*, quando infectada com PVX (*Alphaflexiviridae*), TRV(*Virgaviridae*).

7.1 Perspectivas

Como perspectivas para este trabalho pretendemos complementar os resultados com análises da fluorescência da clorofila em plantas em *A. thaliana* 35S:ATE e WT infectadas com PVX e comparar com plantas não infectadas e, dessa forma, busca avaliar se a alteração na clorofila entre as plantas saudáveis e infectadas com PVX e se a superexpressão de ATE pode inibir esse desnível da clorofila. Caso ocorra a inibição, a superexpressão de ATE pode estar diminuindo o impacto da infecção viral na planta.

Busca-se também quantificar os transcritos de TGB2 do PVX em folhas inoculadas de *N. benthamiana* selvagem tratada com e sem ATE para observar se a ATE pode afetar a replicação viral. Também busca-se avaliar se a ATE pode conter o vírus naquela região, para isso devemos analisar por meio de qPCR os transcritos de TGB2 na região fluorescente e na região não fluorescente da folha inoculada com PVX + ATE ou PVX + pART.

Além disto, serão refeitos os experimentos em *N. benthamiana* 16c utilizando PVX na mesma proporção/concentração no controle e na presença de ATE para ter uma visão mais fidedigna dos efeitos de ATE sobre a replicação de PVX. E fazer também infiltrações de ATE sozinhas nestas plantas para verificar se ATE pode ter algum impacto no silenciamento de GFP.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALLY, J. et al. The Rise and Rise of *Nbenthamiana*: A Plant for All Reasons. *Annual Review of Phytopathology*, v. 56, n. Volume 56, 2018, p. 405–426, 25 ago. 2018.
- BAYNE, E. H. et al. Cell-to-cell movement of Potato Potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal*, v. 44, n. 3, p. 471–482, 2005.
- Brito, FB. (2020). Estudo do papel da Arginil t-RNA transferase na resistência a vírus de planta. Monografia apresentada na conclusão de curso de graduação, UFRJ, 62 páginas.
- Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K., & Dent, M. (2013). Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Advanced techniques in biology & medicine*, 1(1), 103.
- Chiu, M. et al. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, n. 5, p. 641–649, 9 jun. 2010.
- Domitrovic, T., Fausto, A. K., Silva, T. da F., Romanel, E., & Vaslin, M. F. S. (2017). Plant arginyltransferases (ATEs). *Genetics and Molecular Biology*, 40(1 Suppl 1), 253–260.
- E, B., Aa, C., Sm, H., & Gj, H. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818).
- Fausto, A. K., Anna (2016). Identificação e análise funcional do gene de resistência associado à doença azul do algodoeiro. Tese de doutorado, UFRJ, 169 páginas.
- Fusaro, A. F., Barton, D. A., Nakasugi, K., Jackson, C., Kalischuk, M. L., Kawchuk, L. M., Vaslin, M. F. S., Correa, R. L., & Waterhouse, P. M. (2017). The Luteovirus P4 Movement Protein Is a Suppressor of Systemic RNA Silencing. *Viruses*, 9(10), 294.
- Graciet, E., Mesiti, F., & Wellmer, F. (2010). Structure and evolutionary conservation of the plant N-end rule pathway. *The Plant Journal*, 61(5), 741–751.
- Jin, L. et al. RNAi-Based Antiviral Innate Immunity in Plants. *Viruses*, v. 14, n. 2, p. 432, 20 fev. 2022.
- Lee, L.-Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325–332.
- Lindbo, J. A., & Dougherty, W. G. (1992). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology*.
- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M., & Dougherty, W. G. (1993). Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *The Plant Cell*.
- Lobaina, D. P., Tarazi, R., Castorino, T., & Vaslin, M. F. S. (2022). The Ubiquitin–Proteasome System (UPS) and Viral Infection in Plants. *Plants*.
- Melnyk, C. W., Molnar, A., & Baulcombe, D. C. (2011). Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *The EMBO Journal*.

- Mérai, Z. et al. Double-Stranded RNA Binding May Be a General Plant RNA Viral Strategy To Suppress RNA Silencing. *Journal of Virology*, v. 80, n. 12, p. 5747–5756, 15 jun. 2006.
- Nbenbase (2024). Banco de dados do genoma de *N. benthamiana*. Disponível em <https://nbenthamiana.jp/>.
- Nguyen, Q.-M., Iswanto, A. B. B., Son, G. H., & Kim, S. H. (2021). Recent Advances in Effector-Triggered Immunity in Plants: New Pieces in the Puzzle Create a Different Paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Sanjuán, R., & Domingo-Calap, P. (2016). Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*.
- Tair (2024). Banco de dados genético e de biologia molecular de *Arabidopsis thaliana*. Disponível em <https://www.arabidopsis.org/>.
- Tasaki, T., Sriram, S. M., Park, K. S., & Kwon, Y. T. (2012). The N-End Rule Pathway. *Annual review of biochemistry*.
- Tilsner, J., Linnik, O., Louveaux, M., Roberts, I. M., Chapman, S. N., & Oparka, K. J. (2013). Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata. *Journal of Cell Biology*, v. 201(7), 981–995.
- Tilsner, J., Linnik, O., Wright, K. M., Bell, K., Roberts, A. G., Lacomme, C., Santa Cruz, S., & Oparka, K. J. (2012). The TGB1 movement protein of Potato virus X reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory. *Plant Physiology*.
- Varshavsky, A. (2011). The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*.
- ViralZone (2024). Recurso de conhecimento para entender a diversidade de vírus (PMID: 20947564, DOI: /10.1093/nar/gkq901). Disponível em <https://viralzone.expasy.org/872>.
- Wang, J., Han, X., Saha, S., Xu, T., Rai, R., Zhang, F., Wolf, Y. I., Wolfson, A., Yates, J. R., & Kashina, A. (2011). Arginyltransferase is an ATP-independent self-regulating enzyme that forms distinct functional complexes in vivo. *Chemistry & Biology*.
- Wang, L.; Poque, S.; Valkonen, J. P. T. Phenotyping viral infection in sweetpotato using a high-throughput chlorophyll fluorescence and thermal imaging platform. *Plant Methods*, v. 15, p. 116, 2019.
- Wu, X., Liu, J., Chai, M., Wang, J., Li, D., Wang, A., & Cheng, X. (2019). The Potato Virus X TGBp2 Protein Plays Dual Functional Roles in Viral Replication and Movement. *Journal of Virology*.
- Yoshida, S., Ito, M., Callis, J., Nishida, I., & Watanabe, A. (2002). A delayed leaf senescence mutant is defective in arginyl- tRNA: protein arginyltransferase, a component of the N- end rule pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*.