

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**Caraterização dos supressores p20 e p23  
do *Citrus tristeza virus* e avaliação da  
possibilidade da sua inibição**

**ÂNGELA MARIA ARAÚJO DA COSTA**

**Dissertação**

Doutoramento em Ciências Biológicas  
Área de Especialização: Virologia

Trabalho efetuado sob a orientação de:

**GUSTAVO NUNO BARBOSA NOLASCO**  
**NATÁLIA TOMÁS MARQUES**

**2014**



# **Caraterização dos supressores p20 e p23 do *Citrus tristeza virus* e avaliação da possibilidade da sua inibição**

## **DECLARAÇÃO DE AUTORIA DO TRABALHO**

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

Copyright© Ângela Maria Araújo da Costa

A Universidade do Algarve tem o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outra meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## AGRADECIMENTOS

Quero expressar a minha sincera gratidão a todas as pessoas que contribuíram de forma mais ou menos explícita para a realização desta tese.

Ao Professor Doutor Gustavo Nolasco e à Professora Doutora Natália Marques, os meus orientadores que tornaram possível a realização deste projeto, quero deixar o meu profundo agradecimento pela forma como nestes últimos anos me receberam, apoiaram e acarinharam.

Professor Gustavo, muito obrigada pela partilha do conhecimento, pela inestimável orientação, pelas críticas, encorajamento e pela excelente revisão da tese que foram essenciais para a concretização da minha tese de doutoramento.

Professora Natália, agradeço-lhe por todo o empenho como orientadora, pelo apoio, disponibilidade e pela revisão cuidada da presente tese.

Quero deixar também um reconhecimento à Fundação para a Ciência e Tecnologia por ter concedido esta bolsa de doutoramento (FCT, SFRH/BD/62248/2009).

Durante a realização do Doutoramento tive o prazer de conviver com pessoas que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho. Ao Paulo Gouveia, ao Gonçalo Silva, à Susana Dandlen, à Florinda Gama e ao João Costa, um muito obrigada pelo apoio, sugestões, prestabilidade, pelo bom ambiente de trabalho, carinho e especialmente pela amizade que recorro com a maior estima.

Por fim, agradeço e dedico este trabalho a todos aqueles que de forma indireta me incentivaram e motivaram a abraçar este projeto:

Ao meu pai, à minha irmã e aos meus amigos pelo apoio incondicional, compreensão e principalmente nos momentos de desânimo carinhosamente me animaram.

À minha querida mãe, que me ensinou-me o que de mais importante há para aprender – Amar.

Ao meu marido, que esteve sempre ao meu lado, transmitiu-me força e encorajamento nos momentos mais difíceis, pelo suporte, pela compreensão e todo o amor que me dedica.



## RESUMO

No presente trabalho pretendeu-se caracterizar a capacidade supressora das proteínas p20 e p23 de diferentes grupos filogenéticos do CTV e o possível silenciamento da p23 de forma a ser incluída numa estratégia de proteção.

A atividade supressora local da proteína p23 de todos os grupos filogenéticos foi caracterizada em *Nicotiana benthamiana* da linha 16C. Todas as proteínas testadas foram capazes de suprimir o silenciamento local, mas não o silenciamento a curta distância. A supressão local mais eficiente verificou-se para a p23 do Gp 5 e a menos eficiente para os isolados dos Gps 2 e M. Surpreendentemente, a p23 do Gp 5 aboliu completamente o silenciamento sistêmico, sugerindo que existe uma relação entre a intensidade do silenciamento local e sistêmico.

A capacidade supressora local conjunta das proteínas p20 e p23 foi avaliada. A coexpressão de ambas as proteínas revelou atividade supressora mais forte comparada com a capacidade de cada proteína individual, mesmo quando inoculada com metade da densidade ótica, sugerindo a existência de sinergismo entre as proteínas p20 e p23.

Para analisar as propriedades supressoras a longo prazo, as proteínas p20 e p23 foram inseridas no vetor viral TRV que assegurou a sua disseminação pela planta e expressão por um período mais alargado. Foram observados sintomas em *N. benthamiana* para todas as modalidades testadas, tais como, nanismo da planta, lesões necróticas severas nas folhas inoculadas e nas folhas novas ligeiros sintomas de mosaico e enrolamento. Contudo, sistemicamente não foram registadas diferenças na capacidade supressora das proteínas p20 e p23.

A possibilidade para silenciar sistemicamente a proteína p23 quando incluída num genoma viral foi avaliada através do uso de plantas e enxertos transgênicos para a p23. A estratégia que envolve o uso de enxertos transgênicos parece indicar resultados promissores que conduzem ao silenciamento da p23, contudo, são resultados que devem ser encarados como preliminares.

**Palavras-chave:** *Closterovirus*, Silenciamento de RNA, Supressor viral, Resistência

## ABSTRACT

In this study the suppressing activity of p20 and p23 from isolates of different phylogenetic groups of CTV was characterized and the possibility to silence p23 was evaluated in order to be included in a protection strategy.

Local suppressor activity of p23 was characterized in 16C *Nicotiana benthamiana* plants. The p23 protein of the seven phylogenetic groups tested was able to transiently suppress the local but not the short-range silencing. P23 from Gp 5 was the most efficient local suppressor and Gps 2 and M were the less efficient. A dissimilar development of systemic silencing was induced by p23 proteins along 10 days of analysis. This was most conspicuous for Gp 5, which completely blocked the systemic silencing, suggesting that a quantitative relationship might exist between local and systemic silencing.

The single expression of p20 and p23 from mild and stem pitting isolates was evaluated and compared with the suppressor activity of double expression of suppressors of the same isolate. Co-expression of both proteins showed a stronger local suppression activity than either suppressor alone, even when inoculated with half OD<sub>600</sub>, suggesting the existence of a synergistic effect between proteins p20 and p23.

To analyze long-term suppressor properties, p20 and p23 proteins were cloned into the viral vector TRV to ensure its dissemination in the plant and expression for an extended period. All proteins elicited symptoms in *N. benthamiana*, such as stunting, severe necrotic lesions in the inoculated leaves and mild mosaic and leaf curling on the new leaves. Although, no differences on the suppressive capacity were recorded for both proteins in terms of systemic silencing.

The possibility to systemically silence p23 protein was evaluated when cloned in a viral genome, through the use of p23 transgenic plants and grafts. The strategy involving the use of transgenic grafts showed promising results, however are preliminary results requiring confirmation.

**Keywords:** *Closterovirus*, RNA silencing, Viral suppressor, Resistance

## ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

|                   |   |
|-------------------|---|
| AGO               | Argonaute   |
| APS               | Persulfato de Amónia  |
| BCIP              | <i>5-bromo4-chloro3'-indolyphosphate p-toluidine salt</i>         |
| BYV               | <i>Beet yellow virus</i>  |
| CaMV              | <i>Cauliflower mosaic virus</i>                                   |
| CMV               | <i>Cucumber mosaic virus</i>                                      |
| CP                | Proteína da cápside   |
| CRISPRs           | <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>  |
| CTV               | <i>Citrus tristeza virus</i>                                      |
| DEPC              | Dietil dicarbonato  |
| DIG-11-dUTP       | Digoxigenina-11-2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato                   |
| DMSO              | Dimetilsulfóxido  |
| DNA               | Ácido desoxirribonucleico   |
| DO                | Densidade ótica   |
| dpi               | Dias após a inoculação  |
| dsRNA             | RNA sob a forma de cadeia dupla                                   |
| DCL               | Dicer   |
| EDC               | <i>N-3-dimethylaminopropyl-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride</i> |
| EDTA              | Tetra-acetato de etileno diamina                                  |
| fmol              | Femtomoles  |
| g                 | Gramas  |
| GFP               | Proteína <i>green fluorescent</i>                                 |
| HCl               | Ácido clorídrico  |
| kDa               | kilodalton  |
| MES               | Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidratado                     |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloreto de Magnésio   |
| mRNA              | RNA mensageiro  |
| miRNA             | micro RNA   |
| MQ                | MiliQ   |
| NaCl              | Cloreto de sódio  |
| NBT               | Cloreto de nitro azul de tetrazolium                              |
| ng                | nanogramas  |
| nt                | nucleótido  |
| ORF               | <i>Open Reading Frame</i>   |
| pb                | par de bases  |
| PCR               | <i>Polymerase chain reaction</i>                                  |
| PEBV              | <i>Pea early-browning virus</i>                                   |
| PTGS              | Silenciamento génico pós-transcricional                           |
| PVX               | <i>Potato virus X</i>   |

|          |   |
|----------|---|
| QD       | Declínio rápido   |
| qRT-PCR  | PCR quantitativo em tempo real                              |
| RdDM     | Via de metilação de DNA dependente de RNA                   |
| RDR      | RNA polimerase dependente de RNA                            |
| RISC     | Complexo de silenciamento induzido por RNA                  |
| RITS     | Complexo de silenciamento transcricional induzido por vírus |
| RNA      | Ácido ribonucleico  |
| rpm      | Rotações por minuto   |
| RT-PCR   | <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>      |
| SD       | Desvio Padrão   |
| SDS      | Dodecil-sulfato de sódio                                    |
| SDS-PAGE | Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida                  |
| siRNA    | RNA de interferência  |
| SP       | <i>Stem pitting</i>   |
| sRNA     | Pequenos fragmentos de RNA de cadeia dupla                  |
| SY       | <i>Seedling yellows</i>                                     |
| TAE      | Tris Acetato EDTA   |
| TAV      | <i>Tomato aspermy virus</i>                                 |
| TBE      | Tris Borato EDTA  |
| TCV      | <i>Turnip crinkle virus</i>                                 |
| TE       | Tris EDTA   |
| TEMED    | Tetrametil-etilenodiamino                                   |
| TGS      | Silenciamento génico transcricional                         |
| TRV      | <i>Tobacco ratlle virus</i>                                 |
| UTR      | Região terminal não traduzida                               |
| UV       | Radiação ultravioleta                                       |
| VIGS     | Silenciamento génico induzido por vírus                     |
| WT       | <i>Wild type</i>  |

# ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| <b>Declaração de autoria do trabalho</b> | I   |
| <b>Agradecimentos</b>                    | III |
| <b>Resumo</b>                            | V   |
| <b>Abstract</b>                          | VI  |
| <b>Abreviaturas</b>                      | VII |
| <b>Índice</b>                            | IX  |

## Capítulo 1

### Introdução Geral

|  |    |
|--|----|
| 1.1 Citrinos e a Tristeza                              | 2  |
| 1.2 <i>Citrus tristeza virus</i>                       | 3  |
| 1.2.1 Posição taxonómica e características moleculares | 3  |
| 1.2.2 Diversidade genética e sintomatologia            | 6  |
| 1.2.3 Estratégias de controlo e prevenção da doença    | 10 |
| 1.3 Visão global do silenciamento de RNA               | 13 |
| 1.3.1 Mecanismo de silenciamento de RNA na planta      | 13 |
| 1.3.2 Supressão viral do silenciamento de RNA          | 16 |
| 1.4 Objetivos e visão global da tese                   | 18 |

## Capítulo 2

### Material e Métodos

|  |    |
|--|----|
| 2.1 Isolados de <i>Citrus tristeza virus</i>                           | 20 |
| 2.2 Construções plasmídicas  | 20 |
| 2.2.1 Vetores <i>Gateway</i> <sup>TM</sup>                             | 20 |
| 2.2.1.1 Clonagem no Vetor pDONR <sup>TM</sup>                          | 21 |
| 2.2.1.2 Clonagem no Vetor de Destino                                   | 24 |
| 2.2.2 Clonagem no Vetor viral TRV                                      | 25 |
| 2.3 Material Vegetal   | 28 |
| 2.3.1 Cultura de <i>Nicotiana benthamiana</i>                          | 28 |
| 2.3.2 Plantas <i>Nicotiana benthamiana</i> transgênicas p23 e dsp23    | 29 |
| 2.3.3 Enxertia de plantas <i>Nicotiana benthamiana</i>                 | 30 |
| 2.4 Infiltração mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>           | 30 |
| 2.4.1 Expressão transiente de supressores do silenciamento de RNA      | 30 |
| 2.4.2 Expressão transiente simultânea dos supressores p20 e p23 do CTV | 31 |
| 2.4.3 Expressão dos supressores do CTV através do vetor viral TRV      | 32 |
| 2.5 Observação visual das plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>      | 33 |
| 2.6 Métodos moleculares de análise de RNA e proteínas                  | 34 |
| 2.6.1 Análise por <i>Western blot</i>                                  | 34 |
| 2.6.1.1 Extração de proteínas  | 34 |
| 2.6.1.2 Separação de proteínas   | 34 |
| 2.6.1.3 Eletrotransferência de proteínas                               | 34 |
| 2.6.2 Análise por <i>Northern blot</i>                                 | 35 |
| 2.6.2.1 Extração de RNA  | 35 |
| 2.6.2.2 Preparação de sondas marcadas com Digoxigenina                 | 36 |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 2.6.2.3 Detecção de siRNAs       | 37 |
| 2.6.2.4 Detecção de mRNA         | 37 |
| 2.6.2.5 Detecção de 5S RNA       | 37 |
| 2.6.3 Análise do RNA por qRT-PCR | 38 |
| 2.6.3.1 Extração de RNA          | 38 |
| 2.6.3.2 qRT-PCR                  | 38 |
| 2.6.3.3 Análise estatística      | 39 |
| 2.7 Análise das sequências       | 40 |

### **Capítulo 3**

#### **O silenciamento sistêmico pode ser suprimido pela p23 do CTV, contudo, não está relacionado com a severidade do sintoma viral**

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Introdução  | 42 |
| 3.2 Resultados  | 44 |
| 3.2.1 A atividade supressora da p23 difere entre os grupos filogenéticos        | 44 |
| 3.2.1.1 Análise da fluorescência da GFP   | 44 |
| 3.2.1.2 Quantificação do mRNA da GFP  | 45 |
| 3.2.1.3 Análise de siRNAs específicos da GFP                                    | 46 |
| 3.2.2 Efeito dos supressores p23 no silenciamento a curta distância e sistêmico | 48 |
| 3.2.3 Comparação da estrutura da p23 entre os grupos filogenéticos              | 49 |
| 3.3 Discussão   | 51 |

### **Capítulo 4**

#### **As proteínas p20 e p23 do CTV apresentaram sinergismo na supressão local do silenciamento**

|  |    |
|--|----|
| 4.1 Introdução   | 55 |
| 4.2 Resultados   | 55 |
| 4.2.1 Atividade supressora combinada das proteínas p20 e p23               | 55 |
| 4.2.2 As proteínas supressoras p20 e p23 aparentam ter atividade sinérgica | 60 |
| 4.3 Discussão  | 62 |

### **Capítulo 5**

#### **Propriedades supressoras das proteínas p20 e p23 quando expressas sistemicamente e por um período alargado**

|  |    |
|--|----|
| 5.1 Introdução   | 65 |
| 5.2 Resultados   | 67 |
| 5.2.1 Modificações no vetor TRV RNA2 para gerar um vetor com elevada capacidade de expressão   | 67 |
| 5.2.2 Observação do efeito da produção sistêmica de p20 e p23 no silenciamento                 | 70 |
| 5.2.3 Os supressores do CTV expressos por TRV originam alterações no desenvolvimento da planta | 73 |
| 5.2.4 Efeito de p20 e p23 no silenciamento de GFP  | 74 |
| 5.3 Discussão  | 76 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Capítulo 6</b>  |     |
| <b>Avaliação da possibilidade de silenciamento por plantas e enxertos transgênicos (resultados preliminares)</b>     |     |
| 6.1 Introdução   | 81  |
| 6.2 Resultados   | 83  |
| 6.2.1 Geração de plantas de <i>N. benthamiana</i> transgênicas   | 83  |
| 6.2.2 Avaliação da possibilidade de silenciamento do supressor p23 em plantas <i>N. benthamiana</i> transgênicas p23 | 85  |
| 6.2.3 Avaliação da possibilidade de silenciamento do supressor p23 por um enxerto transgênico                        | 88  |
| 6.3 Discussão  | 92  |
| <b>Capítulo 7</b>  |     |
| <b>Conclusões Gerais</b>   | 95  |
| <b>Referências Bibliográficas</b>  | 99  |
| <b>Anexo I</b>   | 109 |



---

# Capítulo

# 1

---

**INTRODUÇÃO GERAL**

## 1.1 CITRINOS E A TRISTEZA

Os citrinos são a árvore de fruto economicamente mais importante a nível mundial, com mais de 115 milhões de toneladas produzidas em 2011 (FAO 2012). Em Portugal a produção representa menos de 1,5% da região Mediterrânica mas no país ocupa o 1º lugar nos frutos frescos comercializados (Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas, 2007).

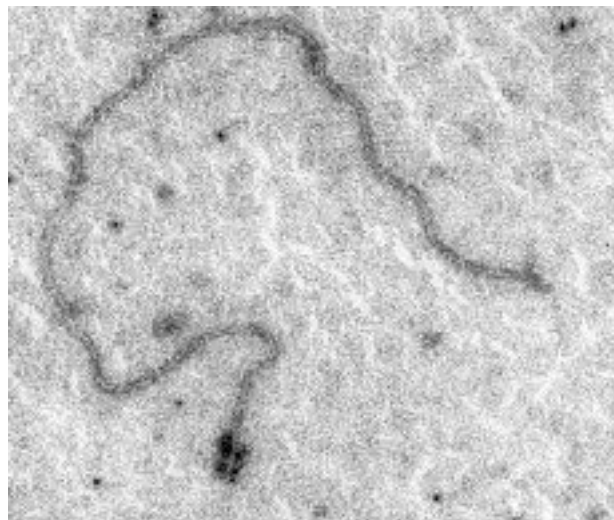
Os citrinos são nativos da China e de outras regiões orientais (Lacirignola and D'Onghia, 2009), inicialmente existiam poucas espécies mas através de hibridações e de ocorrência de mutações somáticas originou-se a maioria dos citrinos de importância económica. A laranjeira azeda (*Citrus aurantium* L.) tem sido usada como porta-enxerto de várias variedades de citrinos marcando a citricultura moderna devido à sua resistência a *Phytophthora spp.* (podridão radicular) e pelos seus excelentes atributos agronómicos, particularmente a sua capacidade de induzir frutos com elevado porte e qualidade e pela sua adaptação a todo o tipo de solos. Contudo, o uso de porta-enxertos de laranjeira azeda em determinadas zonas não foi bem sucedido pois as plantas entravam em colapso. Foi mais tarde proposto que esta incompatibilidade observada entre o enxerto e porta-enxerto era causada por um vírus e transmitida por vetores (Webber, 1943). Esta doença dos citrinos foi denominada Tristeza para descrever os sintomas de declínio e a morte de laranjeira doce (*Citrus sinensis*) enxertada em laranjeira azeda (Müller, 1976). A Tristeza afeta a maioria das regiões produtoras de citrinos e continua a ser um dos principais problemas da citricultura mundial (Moreno *et al.*, 2008). O melhoramento dos sistemas de transportes que foi contemporâneo com o aumento do interesse botânico e económico nos citrinos em muitos países levou à rápida disseminação do vírus para outras partes do mundo através de material vegetal infetado e também dos vetores de transmissão (Bar-Joseph and Dawson, 2008; Moreno *et al.*, 2008). Estima-se que a Tristeza tenha destruído mais de 100 milhões de árvores de fruto em todo o mundo (Moreno and Garnsey, 2010). O agente causal é o vírus da tristeza do citrinos (CTV – *Citrus tristeza virus*), um membro do género *Closterovirus*, da família *Closteroviridae* que é transmitido por várias espécies de afídeos, sendo o *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) o vetor mais eficiente na transmissão de estirpes severas de CTV (Yokomi *et al.*, 1994).

Em Portugal o CTV foi identificado pela primeira vez em 1988 em material de propagação vegetativa certificada de origem Espanhola. Atualmente, o vírus está presente em várias regiões do país, mas encontra-se essencialmente na região algarvia, a principal região produtora de citrinos com cerca de 70% da produção nacional (Nolasco, 2009).

## 1.2 *Citrus tristeza virus*

### 1.2.1 Posição taxonômica e características moleculares

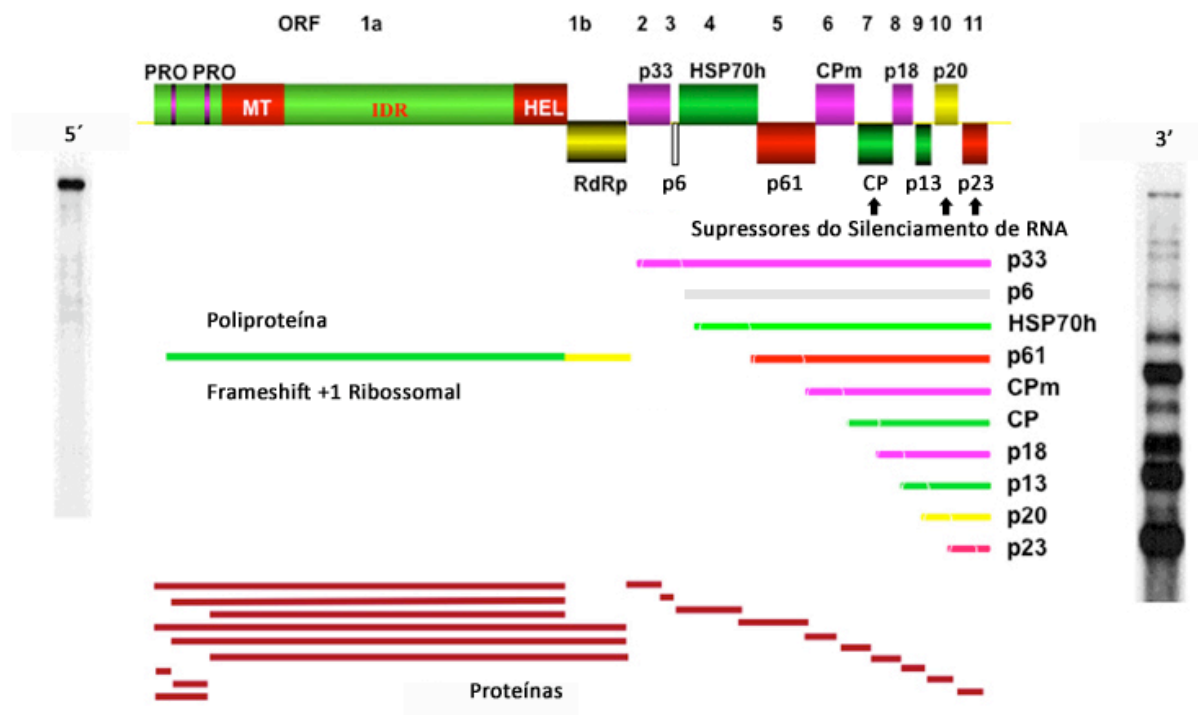
O CTV pertence ao grupo dos closterovirus que é constituído por três géneros virais: *Closterovirus*, *Ampelovirus* e *Crinovirus* (Martelli *et al.*, 2002). Os membros deste grupo partilham algumas características únicas comuns, nomeadamente possuem viriões morfologicamente polares, filamentosos e flexíveis, com genomas mono ou bipartidos de cadeia simples de RNA, um módulo de cinco genes altamente conservados e estão limitados às células do floema das plantas infetadas (Bar-Joseph and Dawson, 2008). Para além destas características comuns, o CTV possui um conjunto de proteínas sem homologia nos outros closterovirus (Dawson *et al.*, 2013). As suas partículas têm cerca de 2000 nm de comprimento e 11 nm de diâmetro e são encapsidadas por duas proteínas da cápside: um corpo longo, a proteína da cápside p25 (ou CP) que cobre cerca de 95% da partícula viral e uma pequena cauda, a proteína da cápside p27 (ou CPm) que cobre apenas uma das extremidades (Febres *et al.*, 1996) (Figura 1.1).



**Figura 1.1** | Partícula viral de CTV observada ao microscópio eletrónico. [Fonte: (Niblett *et al.*, 2000)]

O CTV é o maior vírus de entre os vírus de RNA de plantas, com um genoma de cadeia simples de RNA com aproximadamente 19,3 kb, organizado em 12 ORFs (*Open Reading Frame* – região genômica codificante) que potencialmente codificam 19 proteínas e contém duas regiões não traduzidas (UTRs) nas extremidades 5' e 3' (Bar-Joseph and Dawson, 2008; Karasev *et al.*, 1995) (Figura 1.2). As extremidades 3' são altamente conservadas (90% de homologia nucleotídica), enquanto que na extremidade 5' observa-se muito maior dissimilaridade (homologia apenas de 42%) (Gowda *et al.*, 2003).

O CTV utiliza três mecanismos para expressar o genoma: o processamento proteolítico, a mudança do quadro de leitura (*translational frameshifting*) e a formação de pelo menos 9 RNAs subgenômicos na região 3'. Os dois primeiros mecanismos são utilizados para expressar proteínas codificadas pelas ORF 1a e 1b na extremidade 5' que estão relacionadas com a replicação e são traduzidas diretamente a partir do RNA genômico, enquanto que, o último mecanismo é usado para expressar as restantes 10 ORFs localizadas na extremidade 3' (Hilf *et al.*, 1995), promovido por elementos de controlo internos (Gowda *et al.*, 2001) (Figura 1.2).



**Figura 1.2** | Esquema representativo do genoma de CTV: as 12 regiões codificantes e os produtos proteicos esperados e as regiões 5' e 3' não codificantes. À esquerda e à direita estão as análises por *Northern blot* de RNA total hibridado com sondas 5' (esquerda) e 3' (direita) específicas. Não está desenhado à escala [Adaptado de Dawson *et al.* (2013)].

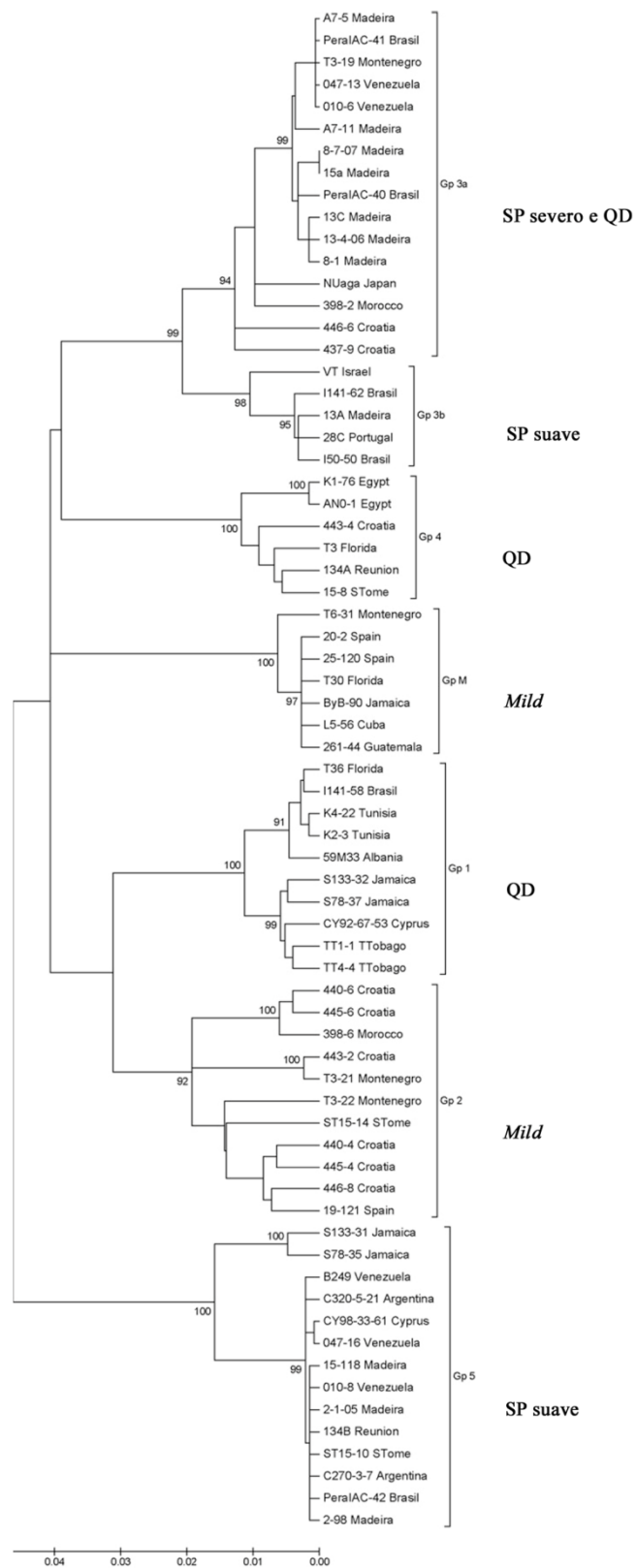
A região 3' codifica um módulo de 5 genes conservado para todos os membros da família *Closteroviridae*, que codifica proteínas envolvidas na interação com o hospedeiro (p6, p65, p61, p27 e p25) (Hilf *et al.*, 1995). A ORF 3 codifica a proteína hidrófoba e transmembranar de 6-kDa (p6) que se localiza no retículo endoplasmático e está associada ao transporte do vírus célula a célula (Dolja *et al.*, 2006). A proteína p65 é homóloga à proteína *heat shock* HSP70 que juntamente com a p61 e as duas proteínas da cápside a p25 e a p27, são essenciais para uma eficiente montagem dos viriões (Satyanarayana *et al.*, 2000). A proteína p20 codificada pela ORF 10 é homóloga ao gene p21 do *Beet yellow virus* (BYV). É o componente maioritário acumulado nos corpos de inclusão das células infetadas por CTV (Gowda *et al.*, 2000) e tem um papel na infecção sistêmica do vírus (Tatineni *et al.*, 2008). Há, no entanto, 4 genes que codificam proteínas sem homologia noutros closterovirus (p33, p18, p13 e p23) (Dolja *et al.*, 2006) que parecem estar relacionados com o movimento e interação com as defesas do hospedeiro (Dawson *et al.*, 2013). As funções das proteínas p33, p18 e p13 permanecem ainda desconhecidas. Foi observado que não são necessárias para a infecção sistêmica da maioria dos hospedeiros (Tatineni *et al.*, 2008) mas, a infecção de plantas com deleções destes genes revelou que estes são necessários em diferentes combinações, para a infecção de certas espécies de citrinos, o que sugere que o CTV adquiriu genes para ampliar a sua gama de hospedeiros (Tatineni *et al.*, 2011). A ORF 11 está localizada junto à extremidade 3' UTR e codifica a proteína p23, sendo o seu correspondente RNA subgenómico o segundo mais abundante nas plantas infetadas (Hilf *et al.*, 1995). Acumula-se preferencialmente no nucléolo (corpos de Cajal) e nos plasmodésmios (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013) e estas principais zonas de acumulação provavelmente determinam algumas das suas funções (Flores *et al.*, 2013a). De todas as proteínas do CTV a p23 foi até hoje a mais escrutinada: está envolvida na acumulação assimétrica das cadeias positivas e negativas de RNA ao regular a síntese durante a replicação de RNA (Satyanarayana *et al.*, 2002); é um determinante patogénico que origina sintomas de *seedling yellows* (SY) em várias espécies de citrinos (Albiach-Marti *et al.*, 2010; Fagoaga *et al.*, 2005); e tem um domínio *zinc finger* com capacidade para se ligar a ácidos nucleicos (Lopez *et al.*, 2000). As proteínas p20, p23 e p25 foram também identificadas e caracterizadas como supressores do mecanismo de defesa das plantas baseado no silenciamento de RNA (Lu *et al.*, 2004). A proteína p25 suprime o silenciamento intercelular, a p23 inibe o silenciamento intracelular e a p20 suprime ambos (Lu *et al.*, 2004). A atividade supressora das proteínas p20 e especialmente da p23 tem vindo a ser extensivamente caracterizada (Costa *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2012; Ruiz-Ruiz *et al.*,

2011; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013).

Para além dos RNAs genómicos e subgenómicos, nas plantas infetadas também se acumulam abundantemente moléculas de RNA de dupla cadeia denominados RNAs defetivos (D-RNAs), que são constituídos por segmentos de regiões terminais 5' e 3' do RNA genómico com extensas deleções, contendo menos de 10% do genoma viral (Bar-Joseph and Mawassi, 2013; Bar-Joseph and Dawson, 2008). O seu papel e funções biológicas permanecem desconhecidos, mas supõe-se que estes RNAs de dupla cadeia sejam usados como um sistema tampão de forma a proteger os genomas virais de cadeia simples de serem alvo do sistema de defesa de silenciamento de RNA pelo hospedeiro (Flores *et al.*, 2013b).

### **1.2.2 Diversidade genética e sintomatologia**

Existem diversos isolados de CTV que diferem no tipo e intensidade de sintomas que provocam em diferentes espécies de citrinos e na sua transmissibilidade por afídeos (Silva, 2011). Inicialmente, os isolados de CTV foram identificados com base nas suas atividades biológicas num grupo definido de espécies indicadoras de citrinos (Garnsey *et al.*, 1987). Contudo, os recentes avanços e evolução das técnicas de deteção, como a serologia (Cambra *et al.*, 2000), diagnóstico molecular (Hilf *et al.*, 2005; Niblett *et al.*, 2000) e o conhecimento das sequências nucleotídicas, mostraram-se mais adequadas para a diferenciação de estirpes de CTV. Várias abordagens para estudar a variabilidade biológica do CTV foram conduzidas (Ayllon *et al.*, 2001; Hilf *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 1998), mas apresentavam inconsistências (Nolasco *et al.*, 2009). Nolasco *et al.* (2009) estudaram a variabilidade genética do gene da CP de isolados de CTV de diferentes origens e através da análise filogenética propuseram a existência de 7 grupos (Gps) filogenéticos (Gps 1, 2, 3a, 3b, 4, 5 e M) que estão fenotipicamente relacionados com sintomas distintos induzidos pelo vírus em *Citrus* spp. (Figura 1.3). Recentemente, Harper (2013) examinou a filogenia usando as sequências completas do CTV e, pelo facto do gene da CP não refletir o genoma inteiro reclassificou-o em 6 genótipos distintos. Contudo, sendo a região 5' do genoma menos conservada e a divergência concentrada nesta região (Harper, 2013), esta classificação poderá não ser a mais adequada. Além disso, também um outro estudo de variabilidade genómica usando uma região genómica mais extensa da região 3' com cerca de 3000-nt do que a usada por Nolasco *et al.* (2009), verificou a mesma estrutura genética da população viral que foi encontrada para o gene da CP, constituindo os 7 grupos filogenéticos perfeitamente definidos (Silva, 2011).



**Figura 1.3** | Árvore filogenética do CTV baseada na análise de sequências do gene da CP (método *Neighbour-joining*, modelo de *Kimura 2* parâmetros) [Adaptado de Nolasco *et al.* (2009)]. SP – *stem pitting*; QD – declínio rápido; *Mild* – suave ou assintomático.

A análise das sequências nucleotídicas para além de ser a melhor maneira de diferenciar os isolados também permite estimar a variabilidade genética e evolução dos isolados de CTV (Rubio *et al.*, 2001). Os principais fatores que moldaram a estrutura genética e diversidade do CTV resultaram: i) de uma forte pressão seletiva negativa que parece ser responsável pela elevada estabilidade genética de alguns vírus (Rubio *et al.*, 2013); ii) da dispersão dos principais génotipos de CTV pelo mundo através da propagação vegetativa dos citrinos seguida de exposição durante décadas de citrinos infetados repetidamente inoculados pela população natural de afídeos com variantes genómicas de CTV divergentes; iii) de enxertia (Albiach-Martí, 2012a; Moreno *et al.*, 2008) e iv) de eventos de recombinação devido à presença de vários isolados no mesmo hospedeiro (Rubio *et al.*, 2001). As várias estirpes resultantes são agrupadas de acordo com o tipo de fenótipo e intensidade dos sintomas que podem induzir no hospedeiro. Esta interação pode ser patogénica ou assintomática (Albiach-Martí, 2012a).

Ainda que as condições ambientais possam influenciar o desenvolvimento da doença, os principais fatores para o seu desenvolvimento dependem essencialmente do isolado viral e da combinação variedade/porta-enxerto. Nas infeções naturais o CTV está confinado ao floema da maioria do género *Citrus* e géneros relacionados (Moreno *et al.*, 2008) estando, por isso, os sintomas associados com lesões no floema e nas suas funções. São três os principais quadros sintomatológicos provocados por CTV (Figura 1.4):

- i) declínio rápido ou tristeza propriamente dita da planta, associado às estirpes pertencentes aos grupos 1, 3a e 4 (Nolasco *et al.*, 2009). Este sintoma observa-se devido à interação do CTV com espécies de citrinos como a laranjeira doce ou toranjeira (*C. paradisi*) propagadas no porta-enxerto de laranjeira azeda ou limoeiro (*C. limon*) (Moreno and Garnsey, 2010). A presença do vírus origina necrose das células do floema imediatamente abaixo da zona de enxertia o que leva a uma distribuição irregular dos hidratos de carbono, impedindo a nutrição do sistema radicular levando ao declínio da planta em poucos meses (Bar-Joseph and Dawson, 2008; Moreno *et al.*, 2008).
- ii) Stem pitting (SP) é causado por estirpes pertencentes aos grupos 3a, 3b e 5 (Nolasco *et al.*, 2009). Este sintoma é caracterizado pela diferenciação e desenvolvimento vascular anormal originando caneladuras no lenho, aclaramento das nervuras e crescimento atrofiado das plantas independentemente do porta-enxerto (Moreno *et al.*, 2008; Nolasco *et al.*, 2009). Tatineni and Dawson (2012) observaram que a severidade desta doença no hospedeiro mais suscetível *Citrus macrophylla* está relacionada com os genes p33, p18 e

p13. A deleção de certas combinações destes genes (p33 e p18 ou p13) originou sintomas mais severos de SP enquanto que outras combinações (p13, ou p13 e p18) resultou na redução dos sintomas, sugerindo que o fenótipo de SP resulta de um balanço entre a expressão de diferentes genes virais. O vírus foi também encontrado fora da área normal do floema, tendo sido por isso, o SP associado não só com a prevenção da produção de xilema, mas também com a proliferação das células que suportam a replicação viral, sugerindo que a acumulação do vírus em determinadas áreas da planta pode provocar alterações na sua diferenciação celular e desenvolvimento. O SP não provoca a morte da planta mas afeta o seu crescimento e produtividade, resultando em enormes perdas económicas. As espécies comerciais que podem apresentar este tipo de sintomas são a limeira mexicana (*Citrus aurantifolia*), a toranjeira e a laranjeira doce.

- iii) *Seedling yellows* afeta essencialmente as plantas de laranjeira azeda, toranjeira ou limoeiro em condições experimentais (Garnsey *et al.*, 1979), mas também pode ser encontrado no campo em plantas enxertadas (Albiach-Marti, 2012a). É caracterizado pelo amarelecimento das folhas, clorose foliar e nanismo da planta (Moreno *et al.*, 2008).



**Figura 1.4** | Principais sintomas provocados pelo CTV. Declínio rápido de uma árvore com 30 anos enxertada em laranjeira azeda e as árvores atrás são saudáveis (Fonte: Yokomi, 2011). Sintoma severo de *stem pitting*, crescimento atrofiado das folhas e caneladuras no lenho (Fonte: Yokomi, 2011). Sintoma de *seedling yellows* em limoeiro (Fonte: Roistacher, em *Citrus Resources in Ecoport*).

As estirpes que produzem os sintomas QD, SP e SY são geralmente referidas como estirpes severas (Sambade *et al.*, 2003) e causam enormes prejuízos na citricultura. No entanto, existem também isolados de CTV que não causam efeitos visíveis na maioria das variedades de citrinos apesar de se multiplicarem e atingirem elevados títulos virais (Albiach-Marti *et al.*, 2000), sendo designados de isolados suaves (*mild*) ou assintomáticos. As infeções *mild* correspondem às estirpes agrupadas nos Gps 2 e M (Nolasco *et al.*, 2009) e podem ocorrer de

forma latente por longos períodos de tempo, induzindo geralmente sintomas pouco perceptíveis, tais como, aclaramento das nervuras e manchas nas folhas de plantas indicadoras como a limeira mexicana (Niblett *et al.*, 2000).

### 1.2.3 Estratégias de controlo e prevenção da doença

As estratégias para controlo de CTV diferem de acordo com a incidência e severidade dos isolados virais, bem como, da sensibilidade das variedades de citrinos infetados e das combinações porta-enxertos presentes em cada região (Moreno *et al.*, 2008). Enquanto que as limeiras mexicanas são sintomáticas para a maioria das estirpes de CTV e as tangerineiras (*C. reticulata* Blanco) são geralmente assintomáticas, em laranja doce e toranja apenas estirpes severas conseguem induzir sintomas (Albiach-Marti, 2012b). Por isso, para um melhor conhecimento da doença e de modo a poder tomar medidas de controlo adequadas, é fundamental caracterizar e diferenciar os isolados de CTV, como foi descrito anteriormente. Existem várias práticas para o controlo de CTV que têm sido aplicadas em diferentes contextos (Yokomi, 2009), para além da certificação que deveria ser sempre aplicada:

- i) quarentena para evitar a introdução do vírus, é um método de prevenção usado quando o CTV está ausente ou é raro;
- ii) programas de erradicação das árvores infetadas de forma a conter o vírus e, desta forma, atrasar o espalhamento da doença, sendo usado em regiões onde a incidência de CTV é baixa e o foco da infeção limitado a um pequeno grupo de árvores. É no entanto, um método muito caro pois envolve a remoção das árvores infetadas e, raramente é efetivo se a infeção já estiver disseminada;
- iii) proteção cruzada também designada de pré-imunização, consiste em infetar uma planta com um isolado suave que posteriormente irá proteger contra infeções causadas por isolados mais severos (Folimonova, 2013; Lee and Keremane, 2013; Albiach-Marti, 2012b). Este método foi desenvolvido empiricamente no Brasil nos anos 60 por Gerd Müller (Costa and Müller, 1980; Müller and Costa, 1968). A proteção cruzada é muito utilizada na proteção contra *stem pitting* em regiões onde as populações de vetores são endémicas, contudo, não oferece resistência contra isolados de CTV que levam ao declínio rápido dos citrinos (Bar-Joseph and Dawson, 2008; Roistacher *et al.*, 2010). Progressos no conhecimento deste mecanismo foram feitos recentemente por Folimonova *et al.* (2010) e demonstraram que a proteção cruzada sustentável contra isolados severos

de CTV só acontece entre variantes genéticas do mesmo isolado, isto é, pode apenas ser atingida através do uso de isolados menos severos do mesmo grupo (genótipo segundo a classificação usada por aqueles autores). A proteção cruzada é usada extensivamente com sucesso na proteção de laranja doce no Brasil (Costa and Müller, 1980), de toranja na África do Sul e Austrália, laranja de umbigo e lima no Peru e árvores de *C. hassaku* no Japão, permitindo a produção comercial destas variedades de citrinos apesar da presença de isolados SP agressivos nestas regiões (Folimonova, 2013; Lee and Keremane, 2013; Roistacher *et al.*, 2010). Contudo, a proteção cruzada nem sempre foi bem sucedida, como verificado na Califórnia (Folimonova, 2013; Roistacher *et al.*, 2010), pois um isolado protetor numa dada região não significa que seja eficaz noutra, para além de que a proteção cruzada depende da variedade de citrino, do isolado de CTV e das condições ambientais que prevalecem na região (D'Onghia, 2009; Folimonova, 2013). No caso da região Mediterrânica em que a produção é virada para o consumo em fresco, o que acarreta manchas varietais de reduzidas áreas, a proteção cruzada não se crê possível.

- iv) uso de porta-enxertos tolerantes ao CTV, geralmente híbridos de *P. trifoliata* (Carrizo citrange; Troyer citrange), citrumelo Swingle, Tangerineira Cleópatra ou algumas variedades de *C. aurantium* (Gou-Tou) ou o próprio *Poncirus* são usados em áreas onde o CTV é endêmico (Moreno *et al.*, 2008). É essencial para a produção económica de citrinos em muitas áreas, permitindo a produção de frutos de qualidade (Bar-Joseph and Dawson, 2008), contudo, já foram encontrados isolados de CTV com capacidade de superar a resistência a *P. trifoliata* provocando sintomas de SP (Harper *et al.*, 2010);
- v) um outro método utilizado é o controlo biológico do vetor afídeo. O controlo químico através do uso de inseticidas é mais eficaz mas pode não ser suficientemente rápido para prevenir a infeção primária (Yokomi, 2009).

Estas estratégias minimizam as perdas pela doença induzida pelo CTV, porém, nenhuma delas é efetiva no controlo completo de CTV.

A resistência derivada de um agente patogénico é uma outra estratégia de controlo de CTV, baseada no uso de plantas transgénicas que expressam genes virais (Fagoaga *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2010; Soler *et al.*, 2012). No entanto, os resultados obtidos têm sido inconsistentes, uma vez que, a expressão dos transgenes permitiu conferir resistência parcial nas plantas derivadas da linhagem transgénica, isto é, apenas algumas plantas ficaram imunes (Dominguez *et al.*, 2002; Fagoaga *et al.*, 2006) ou então esta resistência depende da

semelhança da sequência da construção transgênica e da estirpe de vírus testada (Soler *et al.*, 2012). A resistência ou suscetibilidade dos hospedeiros à infecção viral está associada ao silenciamento de RNA, um mecanismo que explica muitos casos de defesa das plantas contra infecções virais (Fagoaga *et al.*, 2006; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011). A existência de supressores sugere uma interação complexa entre o vírus e o hospedeiro no curso da infecção. Determinar as influências e papéis dos supressores individualmente no processo de infecção viral de forma a compreender a estratégia que os vírus usam para invadir o hospedeiro parece ser essencial (Senshu *et al.*, 2011), uma vez que até agora, o controle completo usando qualquer uma das estratégias anteriormente referidas não foi atingido.

## 1.3 Visão global do silenciamento de RNA

O silenciamento de RNA é um mecanismo conhecido por operar transversalmente nos reinos, designado de supressão (*quelling*) nos fungos, RNA de interferência nos animais e silenciamento génico pós-transcricional (PTGS) nas plantas (Burgyan, 2008; Li and Ding, 2006). É um mecanismo de silenciamento génico, originalmente identificado em plantas como um sistema natural de defesa que evoluiu contra parasitas moleculares (Baulcombe, 2004; Herr and Baulcombe, 2004). Inicialmente presumia-se que os procariotas não apresentavam este mecanismo de defesa considerado, por isso, uma aquisição ou inovação eucariota (Zamore, 2002). Porém, foi posteriormente observado que o sistema CRISPRs (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), um sistema de imunidade em procariotas que confere resistência a elementos genéticos estranhos, reconhecendo e silenciando estes elementos genéticos exógenos de forma semelhante ao silenciamento de RNA observado nos organismos eucariotas (Horvath and Barrangou, 2010; Marraffini and Sontheimer, 2010).

O silenciamento de RNA regula um grande número de processos biológicos, incluindo resistência a vírus, controlo de transposões, sequências de DNA repetitivas, integridade do genoma, formação de heterocromatina, desenvolvimento e diferenciação e resposta a stresses (Carrington and Ambros, 2003; Diaz-Pendon and Ding, 2008; Hohn and Vazquez, 2011). Este mecanismo refere-se a processos baseados na especificidade com a sequência de RNA que resultam na inibição da expressão génica através da transcrição, estabilidade do mRNA ou dos níveis de tradução (Brodersen and Voinnet, 2006). Existem três vias de silenciamento de RNA nas plantas: a via siRNA (RNA de interferência) ou PTGS que atua predominantemente na defesa antiviral das plantas (Diaz-Pendon and Ding, 2008; MacDiarmid, 2005), a via micro RNA (miRNA) que regula RNAs endógenos e a via de metilação de DNA dependente de RNA (RdDM) ou silenciamento génico transcricional (TGS) que regula a transcrição génica.

### 1.3.1 Mecanismo de silenciamento de RNA na planta

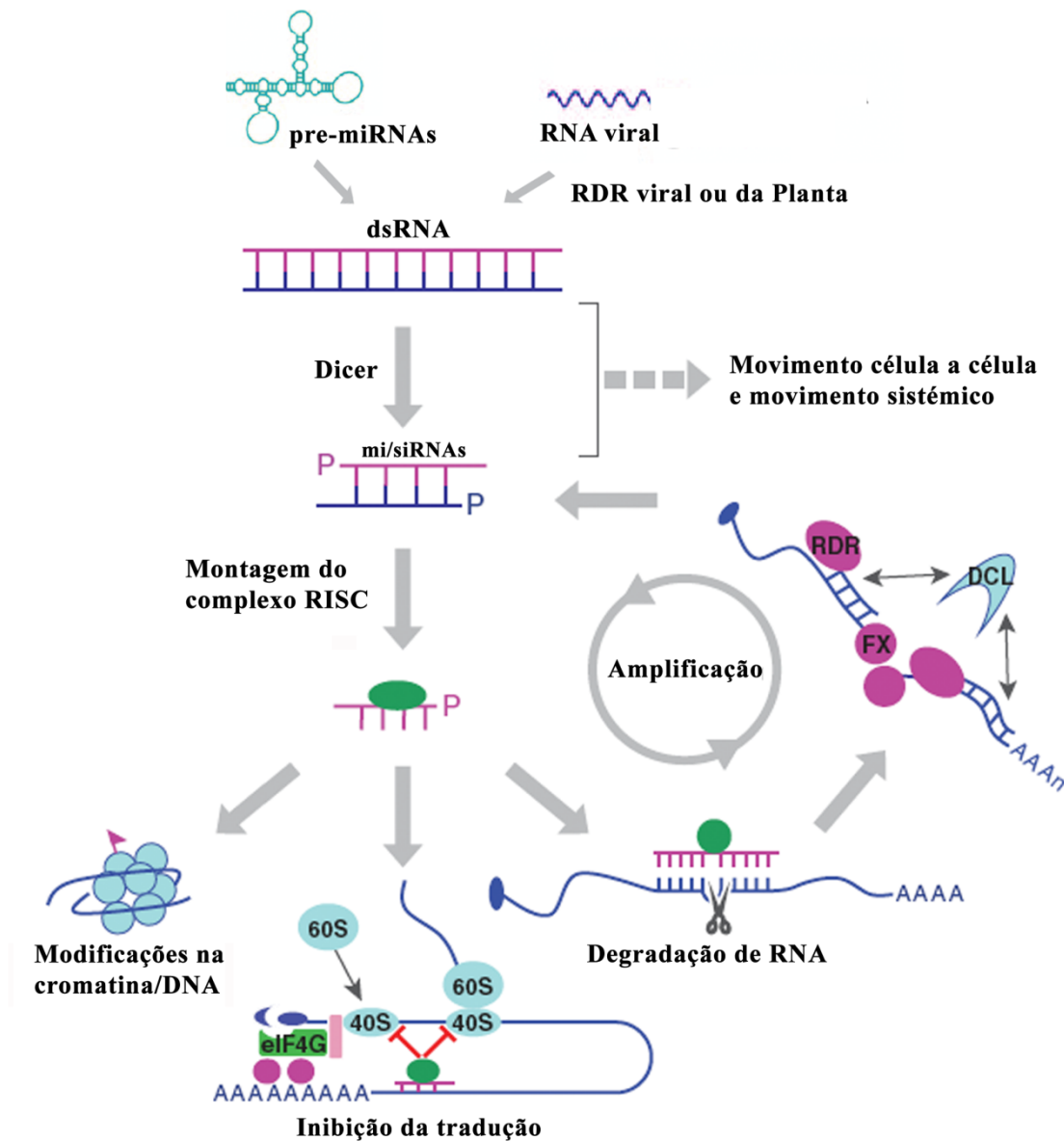
O sistema de defesa da planta reconhece a presença de estruturas de RNA de cadeia dupla (dsRNA) que variam no tamanho desde cerca de 30-nt a centenas de nt (Nagano *et al.*, 2014). Este reconhecimento é mediado pelas proteínas Dicer (DCL) que as degradam em pequenos fragmentos de RNA de cadeia dupla (sRNAs) com tamanhos entre 21-24 nucleótidos (nt),

responsáveis pelas diferentes vias do silenciamento (Nagano *et al.*, 2014). Estes sRNAs possuem nas extremidades 5' grupos monofosfato e nas extremidades 3' dois nucleótidos não emparelhados, sendo estabilizados através da metilação da extremidade 3' (Alvarado and Scholthof, 2009; Hamilton and Baulcombe, 1999; Szittyá *et al.*, 2008). As moléculas com 21-nt conduzem à degradação de mRNA homólogo, enquanto que as moléculas de 24-nt estão relacionadas com a integridade e estabilidade do genoma (Matzke *et al.*, 2009). Os sRNAs resultantes da via micro RNA são designados de miRNAs, enquanto que os sRNAs gerados pelo PTGS são designados de siRNAs. Outras classes de sRNAs foram descobertas e são classificadas com base na sua biogénese e função, nomeadamente, *trans-acting* siRNAs, siRNAs endógenos e os *PIWI-interacting* RNAs (Siomi and Siomi, 2009).

As DCLs são proteínas categorizadas como endonucleases do tipo III, constituídas por vários domínios, o domínio de ligação dsRNA (DRB), a RNA helicase, o domínio PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) e a RNase III que se liga e cliva dsRNA (Brodersen and Voinnet, 2006; Roth *et al.*, 2004). Estudos realizados na planta modelo *Arabidopsis thaliana* permitiram um melhor conhecimento deste mecanismo (Henderson *et al.*, 2006). Foram identificadas quatro DCLs envolvidas quer nos processos endógenos quer na defesa antiviral. A DCL3 gera siRNAs com 24-nt que funcionam no TGS através da via de metilação RdDM (Matzke *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2004); cliva preferencialmente pequenos dsRNAs (30 a 50-nt) com extremidades 5' de adenosina ou uridina fosforiladas e 1-nt não emparelhado na extremidade 3' (Nagano *et al.*, 2014). A DCL4 reconhece longas cadeias de dsRNA com mais de 100-nt (Fukudome *et al.*, 2011; Nagano *et al.*, 2014) com extremidades cegas ou 2-nt não emparelhados nas extremidades 3' (Nagano *et al.*, 2014) e gera ta-siRNAs com 21-nt a partir de alvos endógenos, bem como, serve também como sensor antiviral primário para a produção de siRNAs derivados de vírus. A DCL2 origina siRNAs virais com 22-nt, mas apenas quando a DCL4 não está completamente funcional e não se sabe de que forma os siRNAs de 22-nt podem substituir funcionalmente as moléculas de 21-nt (Brodersen and Voinnet, 2006; Deleris *et al.*, 2006). Esta redundância da DCL2 é também observada no núcleo quando a DCL3 está ausente (Akbergenov *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006). A DCL3 apenas produz siRNAs virais na ausência de atividade de DCL4 e DCL2 (Deleris *et al.*, 2006). A DCL1 é responsável pela biogénese de miRNAs com 21-nt e juntamente com a DCL2 sintetiza siRNAs antisense derivados de transcritos induzidos por stresses ambientais (Aliyari and Ding, 2009; Deleris *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2004).

Os sRNAs são desnaturados e uma das cadeias é incorporada no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que é composto por múltiplas subunidades de endonuclease e uma proteína Argonaute (AGO). Os sRNAs emparelham com o RNA complementar e medeiam a sua degradação ou impedem a tradução dos transcritos (Brodersen and Voinnet, 2006; Ding and Voinnet, 2007). O complexo RISC também está envolvido na modificação da cromatina sendo, por isso, denominado de complexo de silenciamento transcricional induzido por RNA (RITS) (Mallory and Vaucheret, 2010). A planta modelo *Arabidopsis* contém pelo menos 10 AGOs especificamente envolvidas em diferentes vias de silenciamento e com funções parcialmente redundantes (Hohn and Vazquez, 2011). A AGO1 AGO2, AGO5 e AGO7 ao incorporarem siRNAs virais sugerem que estes membros da AGO participam na defesa antiviral (Jiang *et al.*, 2012; Takeda *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Relativamente à proteína AGO4 observou-se que opera a nível do TGS não só no controlo endógeno mas também no controlo da expressão do genoma do vírus (Alvarado and Scholthof, 2009), através do seu envolvimento no controlo específico da tradução de transcritos virais mediado por proteínas de resistência (NB-LRR) a vírus codificadas pelas plantas (Bhattacharjee *et al.*, 2009).

Um dos aspetos que torna o silenciamento de RNA um forte sistema de defesa do hospedeiro é que, uma vez iniciado pode ser mantido através da libertação de um sinal de silenciamento que se espalha pela planta (Brigneti *et al.*, 1998; Szittyá *et al.*, 2008). Este sinal de silenciamento é amplificado de forma a aumentar a quantidade de siRNAs nas plantas, através da ação da RNA polimerase RNA dependente (RDR) do hospedeiro. Esta enzima catalisa a síntese de novas moléculas de dsRNAs que vão servir de substrato para a DCL formando os siRNAs secundários (Voinnet, 2008). Em *Arabidopsis* foram identificadas 6 RDRs, tendo sido a RDR1 e RDR6 descritas na participação da defesa antiviral. A RDR1 reconhece RNA viral que se forma durante a replicação, enquanto que as moléculas de RDR6 recrutam mRNA viral (Takeda *et al.*, 2008). Localmente o sinal de silenciamento move-se entre as células através dos plasmodésmios (Himber *et al.*, 2003), entrando de seguida nas células do floema iniciando o movimento a longa distância (Brodersen and Voinnet, 2006; Hohn and Vazquez, 2011). O silenciamento a curta distância parece envolver a RDR6 que forma siRNAs secundários com 21-nt. Por sua vez, o silenciamento sistémico parece estar relacionado não só com os siRNAs secundários mas também com os siRNAs que se formam ao nível do TGS, uma vez que, ambas as classes são encontradas no floema das plantas (Diaz-Pendon and Ding, 2008; Hohn and Vazquez, 2011; Li and Ding, 2006) (Figura 1.5).



**Figura 1.5** | Passos da via de silenciamento de RNA (Adaptado de Li and Ding, 2006).

### 1.3.2 Supressão viral do silenciamento de RNA

Os vírus adotaram estratégias que permitem superar os efeitos antivirais do silenciamento do hospedeiro. Uma estratégia é a expressão de proteínas supressoras que atuam em diferentes passos da via de silenciamento, incluindo o processamento de dsRNAs virais, estabilização e amplificação de siRNAs virais, montagem do complexo RISC e degradação dos RNAs virais, sendo a sua expressão geralmente necessária para a sua multiplicação e invasão sistêmica do hospedeiro (Alvarado and Scholthof, 2009; Qu and Morris, 2005; Voinnet *et al.*, 1999). As proteínas virais com atividade supressora foram originalmente descobertas em vírus de

plantas do género *Potyvirus* e *Cucumovirus* (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998) e após a sua descoberta, foram identificadas em quase todas as espécies virais (Burgyan, 2008; Diaz-Pendon and Ding, 2008). As proteínas supressoras são estruturalmente diversas e estão envolvidas em várias outras funções distintas básicas, como a replicação, movimento e encapsidação, o que sugere que as proteínas supressoras evoluíram independentemente (Burgyan, 2008; Burgyan and Havelda, 2011). O sucesso de uma infeção viral resulta da competição entre os processos de silenciamento génico e a sua supressão, até porque utilizam a mesma via intercelular (plasmodésmios e floema) para o silenciamento e a infeção sistémica (Carrington *et al.*, 2001).

Muitos dos supressores virais foram inicialmente identificados como determinantes patogénicos envolvidos no desenvolvimento de sintomas durante a infeção (Brigneti *et al.*, 1998; Torres-Barcelo *et al.*, 2008). Existe uma sobreposição substancial entre as vias de silenciamento miRNA e siRNA, o que significa que a supressão do silenciamento de RNA pelos vírus pode interromper os padrões normais de expressão génica da planta ou estimular determinada via de silenciamento o que pode conduzir a aberrações no seu desenvolvimento (Chapman *et al.*, 2004; Kasschau *et al.*, 2003; Qu and Morris, 2005). Os vírus parecem contudo, usar o silenciamento de RNA para manterem o título viral a níveis toleráveis nos tecidos das plantas, prevenindo efeitos prejudiciais do excesso de acumulação viral, assegurando a sobrevivência quer do vírus como do hospedeiro (Burgyan, 2008; Wang *et al.*, 2012).

A existência de três genes supressores codificadas pelo CTV que atuam em diferentes passos da via de silenciamento parece ser essencial para proteger o seu genoma de cadeia simples de RNA da defesa antiviral nas espécies hospedeiras (Lu *et al.*, 2004), uma vez que, durante a replicação acumulam níveis elevados de dsRNA derivados da replicação dos RNAs subgenómicos (Hilf *et al.*, 1995). Apesar das proteínas CP, p20 e p23 não terem sido ainda descritas como supressores do silenciamento em citrinos a acumulação de siRNAs virais de CTV em citrinos infetados com CTV já foi porém observada, o que indica ser uma resposta antiviral mediada pelo silenciamento de RNA (Fagoaga *et al.*, 2006; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011).

## 1.4 Objetivos e visão global da tese

O CTV é o agente causal de uma das mais graves doenças em citrinos. Nenhuma das medidas de controlo implementadas até hoje se revelou totalmente eficiente. Sabendo que a resistência ou suscetibilidade dos hospedeiros à infeção viral está associada ao silenciamento de RNA (Fagoaga *et al.*, 2006; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011) e que o CTV codifica três supressores do silenciamento de RNA, neste trabalho pretendeu-se caracterizar as capacidades supressoras dos genes p20 e p23 do CTV no PTGS e o possível silenciamento do gene supressor p23 de forma a ser incluído numa estratégia de proteção.

Para atingir estes objetivos, foram delineadas três linhas sequenciais de trabalho:

- i) Caracterização das capacidades supressoras da proteína p23 localmente e a curto prazo para cada um dos grupos filogenéticos (Capítulo 3) utilizando ensaios de expressão transiente em plantas de *Nicotiana benthamiana*. Sabendo que nas infeções virais mistas o aumento da severidade dos sintomas está associado à supressão do PTGS analisa-se ainda a ação conjunta de dois supressores de CTV, a proteína p20 caracterizada anteriormente (Marques *et al.*, 2012) e a proteína p23 (Capítulo 4).
- ii) Caracterização das capacidades supressoras sistémicas das proteínas p20 e p23 ao longo do tempo através do uso de vetores virais que asseguram que o supressor se espalha pela planta e sejam expressos por um período de tempo mais alargado (Capítulo 5).
- iii) Avaliação da possibilidade de silenciar sistemicamente o gene supressor p23 do CTV quando este está incluído num genoma viral, através do uso de duas estratégias envolvendo plantas transgénicas para a p23. Uma das abordagens envolve o uso de plantas *N. benthamiana* transgénicas da linha p23 que expressam constitutivamente o gene da p23. A segunda estratégia envolve a enxertia para fornecimento de sinal de silenciamento, nomeadamente através da enxertia de plantas WT *N. benthamiana* em plantas transgénicas *N. benthamiana* que formam dsRNA da p23, a linha dsp23 (Capítulo 6).

---

# Capítulo

# 2

---

## MATERIAL E MÉTODOS

As experiências e atividades desenvolvidas referentes a este trabalho foram realizadas no Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve.

## 2.1 Isolados de *Citrus tristeza virus*

Para a realização deste trabalho foram usados clones dos genes p20 e p23 do CTV disponíveis no laboratório de virologia e descritos na Tabela 2.1, que são representantes de cada um dos grupos filogenéticos descritos para o CTV (Nolasco *et al.*, 2009).

| Grupo filogenético | Origem do Isolado CTV | Isolado p20 | Isolado p23 | Sintoma associado ao isolado <sup>(1)</sup> |
|--------------------|-----------------------|-------------|-------------|---|
| 1                  | Albânia               | -           | Q3          | QD  |
| 2                  | Croácia               | -           | 440.8       | M   |
| 3a                 | Ilha da Madeira       | 11.4        | 11.5        | QD + SwO-SP (severo)                        |
| 3b                 | Portugal              | -           | Q32         | SP-GF ( <i>mild</i> )                       |
| 4                  | Croácia               | -           | 142.6       | QD  |
| 5                  | Ilha da Madeira       | 199.7       | 15.4        | SwO-SP ( <i>mild</i> )                      |
| M                  | Espanha               | 25.11       | 25.4        | M   |

**Tabela 2.1** | Origem dos isolados a que pertencem os genes p20 e p23 testados e respetivos sintomas revelados em plantas indicadoras (Nolasco *et al.*, 2009).

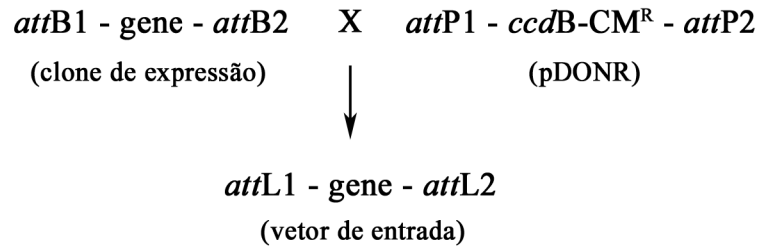
(1) QD: declino rápido de árvores enxertadas em laranjeira azeda; SwO-SP: *Stem pitting* em laranjeira doce; M: sintomas suaves na planta indicadora limeira mexicana; ausência de sintomas em laranjeira doce; SP-GF: *Stem pitting* em toranjeira.

## 2.2 Construções plasmídicas

### 2.2.1 Vetores *Gateway*<sup>TM</sup>

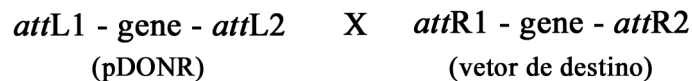
Os genes p20 e p23 do CTV foram clonados em vetores binários segundo a tecnologia *Gateway*<sup>TM</sup> (Invitrogen, Gaithersburg, MD, EUA) (Karimi *et al.*, 2002). Este método de clonagem universal toma partido das propriedades do fago  $\lambda$ , nomeadamente os locais de recombinação do bacteriófago no genoma bacteriano. Existem diversos vetores de expressão disponíveis para serem utilizados em estudos com plantas de acordo com objetivo do trabalho e que contêm origens de replicação para a estirpe de *Escherichia coli* (ColE1), bem como, para a estirpe de *Agrobacterium* (pVS1) (Karimi *et al.*, 2002). Neste trabalho foram usados alguns destes vetores e o processo de clonagem encontra-se detalhado nos próximos subcapítulos.

Os vetores pDONR<sup>TM</sup> foram desenhados para gerar vetores de entrada com regiões flanqueadoras *attL*, contendo o gene de interesse que resulta da recombinação do vetor pDONR<sup>TM</sup> com um clone de expressão ou com um produto de *Polymerase chain reaction* (PCR) com regiões flanqueadoras *attB*, proporcionada pela enzima BP *clonase* (Figura 2.1). Posteriormente, estes vetores podem ser utilizados em recombinações com diversos vetores de destino, desde que, possuam as respectivas regiões *attR* compatíveis (Karimi *et al.*, 2002).



**Figura 2.1** | Representação esquemática da reação de recombinação BP para obtenção do vetor de entrada.

A reação de recombinação LR vai permitir que o gene de interesse seja transferido do vetor pDONR para o vetor de destino. A recombinação ocorre entre dois locais específicos de recombinação *attL* no vetor de entrada e *attR* no vetor de destino, permitindo a clonagem de fragmentos no vetor de destino (Figura 2.2).



**Figura 2.2** | Representação esquemática da reação de recombinação LR para obtenção do vetor de destino.

### 2.2.1.1 Clonagem no Vetor pDONR<sup>TM</sup>

Foram gerados vetores de entrada pDONR com os genes p20 e p23 do CTV descritos na Tabela 2.1, que têm respectivamente sequências nucleotídicas com 549 e 630 par de bases (pb). Foi igualmente clonado no pDONR o gene GFP com 792-pb que codifica para a proteína *green fluorescent* [m-gfp5-ER (Haseloff *et al.*, 1997)], generosamente cedido pelo Dr. Sir David Baulcombe (Universidade de *Cambridge, UK*), usado como controlo negativo das experiências e o gene supressor 2b do *Tomato aspermy virus* (TAV), uma oferta do Dr. Garcia-Arenal (Universidade Politécnica de Madrid), usado como controlo positivo. Estas ORFs foram amplificadas por PCR com *primers* desenhados especificamente que incluem as

sequências parciais *attB* indicadas no manual de instruções da *Invitrogen* (*Gateway*<sup>®</sup> pDONR<sup>™</sup> *vectors*), descritos na Tabela 2.2. As sequências completas *attB* necessárias para a recombinação no vetor pDONR foram inseridas nas sequências amplificadas *attB* obtidas anteriormente, através de uma segunda reação de amplificação com os *primers attB adapter* (descritos na Tabela 2.2). As reações de amplificação foram efetuadas no termociclador *Gradient Biometra*, num volume final de 50 µl contendo 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos *primers*, 1U de *Dream Taq* DNA polimerase (*Thermo Scientific*) e o respetivo tampão. Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes: 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 92°C durante 30 segundos, 52°C durante 45 segundos e 72°C durante 40 segundos, com uma incubação final de 72°C durante 10 minutos. Os produtos resultantes da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose a 1% em tampão TAE. Os géis foram corados em brometo de etídio e a imagem processada mediante o sistema de captação e digitalização de imagens do *software* BIO-1D versão 6.02 (*Kodak, Vilber Luormat*). Nas amplificações bem sucedidas, o produto de PCR da segunda amplificação foi purificado com o *kit High Pure Purification* (*Boehringer Mannheim*), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O produto de PCR purificado foi quantificado com recurso ao espectrofotómetro *Nanodrop 2000* (*Thermo Scientific*).

A reação de recombinação BP foi preparada em tampão TE pH8 num volume total de 5 µl, misturando 25 fmol do produto de PCR-*attB*, calculado de acordo com a fórmula disponível no protocolo do fabricante, 150 ng.µl<sup>-1</sup> de vetor pDONR221 e 1 µl da enzima BP *Clonase*. A mistura ficou a incubar a 25°C durante a noite (cerca de 16 horas) e para parar a reação adicionou-se *Proteinase K* (*Invitrogen*), que ficou a incubar 10 minutos a 37°C. Usou-se 2,5 µl da mistura de reação de recombinação BP e fez-se a transformação genética usando as células competentes recomendadas, nomeadamente, *E. coli One Shot*<sup>®</sup> *Mach1*<sup>™</sup> *T1 Phage-Resistant Chemically Competent* (*Invitrogen*), seguindo as diretrizes gerais descritas no protocolo do fornecedor. As células foram plaqueadas em meio *Luria Bertani* (LB) suplementado com 50 µg.ml<sup>-1</sup> de canamicina (*Sigma*) para seleção das colónias transformadas e ficaram a incubar durante a noite a 37°C. A confirmação da presença do inserto nos transformantes foi feita por PCR com os *primers* dos respetivos genes descritos na Tabela 2.2 e usando como fonte de DNA uma porção de uma colónia selecionada. Os clones positivos cresceram durante a noite em 5 ml de meio LB líquido suplementado com canamicina (50 µg.ml<sup>-1</sup>), a 37°C com agitação e fez-se a extração plasmídica usando o *kit Gene JET*<sup>™</sup> *Plasmid Miniprep* (*Thermo Scientific*), seguindo as instruções do protocolo fornecido pelo

fabricante. A confirmação da sequência nucleotídica de cada um dos genes inseridos nos vetores pDONR foi feita através da sequenciação com os *primers* M13-Rv e pDONR-Fw listados na Tabela 2.2.

| <i>Primer</i>        | Gene       | Sequência nucleotídica (5' > 3')                 | Clonagem no Vetor             |
|----------------------|------------|--|-------------------------------|
| CTV27-GatW-Rv        | p23        | <u>GTACAAAAAAGCAGGCTTGTGAAAGTCTGCGAGTTA</u>      | pK7WG2-p23<br>pK7GWIWG2-dsp23 |
| CTV28-GatW-Fw        |            | <u>GTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTCCGTCCTCA</u>          |                               |
| CTVp20-GW-Rv         | p20        | <u>GTACAAGAAAGCTGGGTCTACACGCAAGATGGAGAG</u>      | pK7WG2-p20                    |
| CTV182-GW-FW         |            | <u>GTACAAAAAAGCAGGCTCCATGCGAGCTTACTTTAGTG</u>    |                               |
| GFP-GW-ER-Rv         | GFP        | <u>GTACAAGAAAGCTGGGTTTAAAGCTCATCATGTTTGTATAG</u> | pK7WG2-GFP<br>pK7GWIWG2-dsGFP |
| GFP-GW-ER-FW         |            | <u>GTACAAAAAAGCAGGCTAACAATGAAGACTAATCTTTTCTC</u> |                               |
| TAV2b-GW-Fw          | Tav-2b     | <u>GTACAAAAAAGCAGGCTATGGCAAGCATCGAGATC</u>       | pDONR-Tav-2b                  |
| TAV2b-GW-RV          |            | <u>GTACAAGAAAGCTGGGTCATTGATCGAGACACCAGT</u>      |                               |
| attB1 <i>adapter</i> | -          | <u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u>             | -                             |
| attB2 <i>adapter</i> |            | <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u>             |                               |
| M13-Rv               | -          | GGAAACAGCTATGACCATG                              | -                             |
| pDONR-Fw             |            | GGCCAGTCTTAAGCT                                  |                               |
| attB1 part-Kpn       | GFP        | <u>AAAAAGCAGGCTTGGTACCGAGCTCGAATT</u>            | pDONR-ZEO-pPEBV-GFP           |
| attB2 part-pPEBV     |            | <u>AGAAAGCTGGGTGTGCACACAAGGTTAAAAA</u>           |                               |
| EcoRI-p20            | p20        | TACCGAGCT <b>CGAATTC</b> Cctacaggaagatgga        | TRV-RNA2-p20                  |
| NcoI-p20             |            | AGTTAACGAG <b>CCATG</b> Ggagcttactttagtg         |                               |
| EcoRI-p23            | p23        | TACCGAGCT <b>CGAATTC</b> Ccagatgaagtgggttc       | TRV-RNA2-p23                  |
| NcoI-p23             |            | AGTTAACGAG <b>CCATG</b> Ggagcactagcggacaaa       |                               |
| TRV2-CP-Fw           | CP         | ATGGGAGATATGTACGATGAA                            | -                             |
| TRV2-CP-Rv           |            | CTAGGGATTAGGACGTATCG                             |                               |
| GFP-ER Taq-F         | GFP        | GCCAACACTTGTCACTACTTTCTC                         | -                             |
| GFP-ER Taq-R         |            | GTAGTTCCCGTCGTCCTTGAAG                           |                               |
| Ubi3-F               | Ubiquitina | GCCGACTACAACATCCAGAAGG                           | -                             |
| Ubi3-R               |            | TGCAACACAGCGAGCTTAACC                            |                               |
| FwTaq p23_3a         | p23        | GAAAGGGAGAAGACGAGATTGG                           | -                             |
| RvTaq p23_3a         |            | CGGAAACACTCAGACTTACTGG                           |                               |
| RT-TRV2-CP-Fw        | CP         | TGCCTCTACAGCTTTCCACA                             | -                             |
| RT-TRV2-CP-RV        |            | CTCCACCAAACCTTAATCCCGAA                          |                               |

**Tabela 2.2** | Sequência dos *primers* utilizados na amplificação por PCR dos genes designados e usados na quantificação de mRNA por qRT-PCR. As sequências específicas de recombinação para o sistema *Gateway* estão sublinhadas. As letras minúsculas correspondem à sequência do gene p20 ou p23 e as letras maiúsculas correspondem à sequência do vetor. As letras a negrito correspondem aos locais de restrição reconhecidos pelas enzimas *EcoRI* e *NcoI*, que são complementares às extremidades do vetor pDONR-ZEO-pPEBV linearizado.

### 2.2.1.2 Clonagem no Vetor de Destino

Os genes de interesse inseridos no vetor de entrada foram transferidos para um ou ambos os vetores binários: pK7WG2 e pK7GWIWG2 (Karimi *et al.*, 2002), através da reação de recombinação LR (Figura 2.2). O vetor pK7WG2 é um vetor de expressão, em que o gene clonado fica regulada a montante pelo promotor 35S, um promotor constitutivo na maioria das plantas e a jusante pelo terminador do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Foram inseridos neste vetor todos os genes clonados no vetor de entrada. O vetor binário pK7GWIWG2 contém um intrão pHANNIBAL (Wesley *et al.*, 2001) que quando expresso nas plantas vai gerar moléculas de dsRNA permitindo desencadear mais rapidamente o silenciamento de RNA (Fire *et al.*, 1998). Neste vetor foram apenas inseridos os genes da GFP e da p23 do isolado do grupo 3a.

A reação de recombinação LR foi preparada em tampão TE pH8, num volume final de 5 µl, misturando 5 fmol do vetor de entrada, 10 fmol do vetor de destino (calculados de acordo com as fórmulas disponíveis no manual do fabricante) e 1 µl da enzima LR *Clonase*, ficando a mistura de reação a incubar durante a noite a 25°C. A transformação genética, confirmação e obtenção dos clones, foi realizada de acordo com o descrito no subcapítulo anterior 2.2.1.1, com a exceção do antibiótico utilizado na seleção, que neste caso foi a espetinomicina (50 µg.ml<sup>-1</sup>) (*Sigma*). As sequências génicas inseridas no vetor de destino pK7WG2 foram a p20 e a p23 de cada um dos isolados descritos na Tabela 2.2, assim como o gene Tav-2b e o gene da GFP. As construções obtidas passarão a designar-se pela forma a seguir descrita, tendo em atenção o isolado de CTV de onde provêm cada gene: pK-GFP; pK-Tav2b; pK-p20 (3a; 5 e M) e pK-p23 (1; 2; 3a; 3b; 4; 5 e M). As sequências génicas inseridas no vetor de destino pK7GWIWG2 passarão a designar-se de pK-dsGFP e pK-dsp23.

### Transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1

Os vetores binários obtidos foram transferidos para *A. tumefaciens* C58C1 que contém um plasmídeo de apoio à infeção, o pMP90. As células competentes de *A. tumefaciens* foram preparadas pelo método do cloreto de cálcio (Seidman *et al.*, 1997). Plaqueou-se 150 µl de *A. tumefaciens* C58C1 em meio LB suplementado com 50 µg.ml<sup>-1</sup> de rifampicina (*Sigma*) e gentamicina (*Sigma*) e ficaram a crescer durante 2 dias a 28°C. Preparou-se o pré-inóculo a partir de uma colónia isolada *A. tumefaciens* em 5 ml de meio de cultura LB suplementado com os antibióticos referidos e ficou a crescer a 28°C a 200 rpm durante a noite. O inóculo

foi preparado adicionando 2 ml do pré-inoculo em 50 ml de meio LB suplementado com os antibióticos respectivos e ficou a crescer a 28°C com agitação até a cultura ter atingido a DO<sub>600</sub> de 0,5-0,8. Transferiu-se a cultura bacteriana crescida para 2 tubos *Falcon* e colocou-se 10 minutos no gelo. As células foram recuperadas por centrifugação a 3000 rpm, durante 5 minutos a 4°C. Foram ressuspensas em 1 ml de CaCl<sub>2</sub> (20 mM) frio e mantidas no gelo por mais 10 minutos. Adicionou-se 70 µl de DMSO, misturou-se suavemente agitando o tubo e foram colocadas novamente no gelo durante 15 minutos. Voltou a adicionar-se 70 µl de DMSO, misturou-se suavemente e rapidamente distribuiu-se 100 µl de células competentes por tubos de microcentrífuga frios. As alíquotas foram congelados em azoto líquido e guardadas a -80°C. A transformação genética foi realizada usando métodos químicos *standard* de transformação (Hofgen and Willmitzer, 1988). Adicionou-se 1 µl do plasmídeo às células competentes de *A. tumefaciens* C58C1, incubou-se a mistura a 37°C durante 5 minutos e de seguida colocou-se no gelo durante 30 segundos. Plaqueou-se 50 µl de células em meio LB suplementado com os antibióticos rifampicina e gentamicina (ambos a 50 µg.ml<sup>-1</sup>), para seleção do *A. tumefaciens* e do plasmídeo pMP90, respetivamente, e espetinomicina (50 µg.ml<sup>-1</sup>), para seleção do vetor binário *Gateway*. Ficou a incubar durante 2 dias no escuro a 28°C.

### 2.2.2 Clonagem no Vetor viral TRV

O vetor recombinante baseado no *Tobacco rattle virus* (TRV) (Liu *et al.*, 2002; Ratcliff *et al.*, 2001) foi usado para avaliar a capacidade de supressão do silenciamento de RNA pelas proteínas p20 e p23 ao longo do tempo. Este vetor é um sistema bipartido formado por duas entidades víricas em RNA de cadeia positiva que são propagadas separadamente, uma corresponde ao RNA1 (que é suficiente para causar infeções nas plantas) e a outra, o RNA2, que depende do RNA1 para conseguir infetar uma planta (Lu *et al.*, 2003; Padmanabhan and Dinesh-Kumar, 2008).

Liu *et al.* (2002) construíram um vetor baseado na sequência do RNA2 do TRV para funcionar como vetor *Gateway*, onde fosse possível clonar genes de interesse na orientação antisense, para estudos de silenciamento génico induzido por vírus (VIGS). O vetor TRV-*Gateway* de Liu *et al.* (2002), generosamente cedido pelo Dr. Dinesh-Kumar (Universidade de Yale, USA), foi aqui modificado de forma a que os genes de interesse ficassem clonados com uma orientação sense, sob o promotor da CP de *Pea early-browning virus* (PEBV), para

permitir a expressão de genes do CTV a longo termo. Foram gerados vetores binários TRV-*Gateway* contendo os genes p20 de isolados dos grupos 3a, 5 e M e, no caso da p23, os isolados dos grupos 1, 3a, 5 e M, descritos na Tabela 2.1.

A construção dos vetores envolveu vários passos. O primeiro consistiu na amplificação da sequência do promotor da CP de PEBV ligado ao gene GFP presente no vetor TRV RNA2-GFP (pTR9598), generosamente cedido pelo Dr. Stuart MacFarlane (Instituto de Pesquisa *Scottish Crop, UK*), com *primers* que contêm as regiões flanqueadoras *attB* (*attB1part-Kpn* e *attB2part-pPEBV*) listados na Tabela 2.2. A reação de amplificação foi feita num volume final de 50 µl contendo 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos *primers*, 1.25U de *Taq* Polimerase *Pfu* e o respetivo tampão (*Thermo Scientific*). Os ciclos de temperatura aplicados foram de 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, com uma incubação final de 72°C durante 5 minutos. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose e purificado com o *kit High Pure Purification* conforme o descrito em 2.2.1.1. O fragmento resultante foi então inserido no vetor pDONR-Zeo™ através da reação de recombinação BP, segundo a tecnologia *Gateway* descrita no subcapítulo 2.2.1.1. De forma a libertar o fragmento da GFP que estava ligado ao promotor CP do PEBV, foi promovida a digestão dupla incompleta do vetor pDONR-ZEO com as enzimas *NcoI* (*Thermo Scientific*) e a *EcoRI* (*Fastdigest, Thermo Scientific*). A reação de digestão foi realizada num volume total de 20 µl contendo 2 µl de tampão *Fastdigest*, 0,5 µl da enzima *NcoI*, 1 µl da enzima *EcoRI*, 2 µg de DNA e o volume foi ajustado com água MQ. Ficou a incubar 5 minutos a 37°C, inativou-se de seguida as enzimas a 80°C durante 5 minutos e colocou-se de imediato no gelo. Toda a reação de digestão foi separada por eletroforese em gel de agarose a 1% e a banda do gel com 2331-nt foi extraída e purificada utilizando o *kit NZYGelpure* (*NZYTEch, Lda.*), seguindo as instruções do fornecedor. Este fragmento que corresponde ao vetor pDONR-ZEO contendo o promotor da CP do PEBV foi denominado de pDONR-ZEO-pPEBV e foi utilizado para a clonagem dos genes p20 e p23.

Os genes p20 e p23 foram amplificados nas mesmas condições descritas acima para a amplificação do fragmento CP-PEBV-GFP, com os respetivos *primers* (*NcoI/EcoRI-p20* e *NcoI/EcoRI-p23*) descritos na Tabela 2.2. Foram especificamente desenhados e contêm as respetivas sequências flanqueadoras dos genes, seguidas dos locais de restrição *NcoI* ou *EcoRI* (enzimas usadas para libertar a GFP) e das extremidades respetivas do vetor pDONR-ZEO-pPEBV linearizado. A ligação no vetor de entrada pDONR-Zeo-pPEBV foi feita através

do método de clonagem da *In-Fusion HD* (Clontech Laboratories, Inc. US), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A presença dos genes de interesse nos vetores de entrada pDONR-pPEBV-p20 e pDONR-pPEBV-p23 foi confirmada através da sequenciação das regiões que contém o gene do CTV, com os *primers* M13-Rv e pDONR-Fw listados na Tabela 2.2.

Os vetores binários TRV RNA2-GW-p20 e o TRV RNA2-GW-p23 resultaram da ligação recombinante LR da *Gateway*, descrita anteriormente no subcapítulo 2.2.1.2, entre os vetores de entrada pDONR-pPEBV-p20 e pDONR-pPEBV-p23, respectivamente, com o vetor de destino TRV-*Gateway*. Foram usados dois métodos para confirmação destes vetores de destino. Alguns foram confirmados por digestão enzimática com a enzima *Bam*HI (*Thermo Scientific*), que reconhece apenas um local de restrição no vetor, seguindo as instruções do fabricante. O outro método de confirmação da construção obtida foi através de amplificação por PCR dos genes p20 e p23 inseridos no vetor em simultâneo com o gene CP do TRV, utilizando os respetivos *primers* descritos na Tabela 2.2. A reação de amplificação foi feita num volume final de 25 µl, contendo 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos *primers* e 1U de *Dream Taq* DNA polimerase (*Thermo Scientific*) e o respetivo tampão, utilizando os ciclos de temperatura descritos acima neste subcapítulo. Os vetores foram designados de TRV2-p20-3a; 5 ou M e TRV2-p23-1; 3a, 5 ou M, de acordo com o isolado do CTV de onde proveio o gene designado. Para além destes, também foi gerado o vetor TRV RNA2-GFP a partir do pDONR-ZEO-pPEBV-GFP, que foi usado como controlo do vetor TRV e foi designado de TRV2-GFP. O vetor TRV RNA1 descrito em Liu *et al.* (2002) usado na infeção das plantas foi também uma oferta do Dr. Dinesh-Kumar.

### **Transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1**

Os vetores virais TRV RNA1 e os vetores modificados TRV RNA2 foram usados na transformação genética da estirpe de *A. tumefaciens* C58C1, através do método de eletroporação usando o Eletroporador II da *Invitrogen*. As células competentes foram preparadas como o descrito no subcapítulo anterior, contudo, em vez de DMSO foram preparadas em 10% de glicerol estéril de acordo com métodos *standard* de preparação de células competentes para serem usadas no eletroporador (Seidman *et al.*, 1997) e mantidas a -80°C.

Misturou-se 50 µl de células competentes com 200 ng de DNA, transferindo-se a mistura para uma cuvete de eletroporação fria onde ficou a incubar 5 minutos no gelo. Procedeu-se ao

choque elétrico nas seguintes condições: resistência de 200  $\Omega$ ; capacidade de 50  $\mu\text{F}$  e diferença de potencial de 1800 V. Após o pulso adicionou-se 1 ml de LB frio diretamente na cuvete e misturou-se pipetando gentilmente. As células foram transferidas para um tubo de microcentrifuga e ficaram a incubar a 28°C com agitação durante 2 horas. As células foram plaqueadas em meio LB suplementado com 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  dos antibióticos rifampicina e gentamicina para seleção da estirpe de *A. tumefaciens* e do seu plasmídeo pMP90, e canamicina para seleção do vetor viral TRV. As placas de *Petri* ficaram a incubar durante 2 dias a 28°C no escuro.

## 2.3 Material Vegetal

A planta *Nicotiana benthamiana* é a planta modelo mais utilizada nos estudos de virologia de plantas, principalmente devido ao grande número de vírus de plantas que a conseguem infectar (Goodin *et al.*, 2008). Estas plantas podem ser facilmente transformadas geneticamente e são adequadas para ensaios de expressão transiente de genes, VIGS ou expressão de proteínas supressoras utilizando vetores virais. Outras vantagens da *N. benthamiana* são a fácil infiltração das folhas e a produção de grandes quantidades de proteína em resposta à agroinfiltração (Roth *et al.*, 2004).

### 2.3.1 Cultura de *Nicotiana benthamiana*

Neste trabalho foram usadas plantas de *N. benthamiana* WT e as linhas transgênicas 16C, p23 e dsp23. As sementes das plantas foram desinfetadas em lixívia comercial a 10% durante 5 minutos, seguidas de 3 lavagens com água estéril e colocadas em frascos estéreis apropriados contendo meio de cultura *Murashige e Skoog* (MS) (Murashige and Skoog, 1962). Para seleção das plantas transgênicas 16C o meio foi suplementado com canamicina (100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). As sementes ficaram a germinar durante 3 semanas no fitoclima a 25°C, durante o dia e a 21°C no período da noite, com um fotoperíodo de 14h de luz. As plantas no estágio de 2 folhas (fora as cotiledonares) foram transplantadas para turfa da marca *PlantFlor Humus* (*Verkauts GmbH*), previamente pasteurizado a 65°C durante 3h e foram tapadas com um plástico nos primeiros dias de forma a manter a humidade elevada. As plantas foram mantidas no fitoclima a 60% de humidade nas mesmas condições descritas acima e ficaram a crescer durante cerca de 10 dias até atingirem o estágio de 4 folhas, tamanho ideal para a realização dos ensaios.

As plantas transgênicas da linha 16C fornecidas pelo Dr. Sir David Baulcombe (Laboratório de *Sainsbury, Norwich, UK*), contêm uma única cópia de uma cassete que contém o transgene 35S:GFP:Tnos e o gene que confere resistência à canamicina, este último sob a ação do promotor 35S do CaMV (Ruiz *et al.*, 1998).

### 2.3.2 Plantas *Nicotiana benthamiana* transgênicas p23 e dsp23

As linhas transgênicas *N. benthamiana* designadas de p23 e dsp23 foram obtidas no laboratório de virologia num projeto paralelo com o auxílio da investigadora Susana Dundlen. A transformação genética de plantas WT *N. benthamiana* foi realizada de acordo com o método biológico de transformação de discos de folhas descrito por Horsh *et al.* (1985), com as respectivas construções pK7WG2-p23 e pK7WGIWG2-dsp23, ambas com o isolado do grupo 3a (11.5) descrito em 2.2.1.2 (Figura 2.3).

Proteína p23-3a (11.5) - 209 a.a.

MDDTSGQTFISVNLSDESNTASTEIKAVSSEADRLEFLRKMNPFIIDALIRKNSYQGARFRARLIIGVCDGGRKH  
 DKASRTERRCVNNNTQSQNEVAHMLMHPVKYLNKRKARAFSNAEMFAVDLVMHTKERQLAVDLAAEREKTRLAR  
 RHPMRSPEETPEHYKFGMTAKAMLPDINAVDVGDNEDTSSSEYPVLSVSGGVLRHHFI

**Figura 2.3** | Sequência deduzida de aminoácidos da proteína p23 do isolado 11.5. Os resíduos básicos do domínio de ligação ao RNA estão delimitados por quadrados vermelhos e os resíduos conservados do domínio *Zinc-finger* CCHC estão delimitados por círculos verdes.

As plantas transformadas cresceram em meio MS com o antibiótico de seleção canamicina ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). A integração do transgene nas plantas obtidas foi confirmada através da análise por RT-PCR de amostras de RNA extraídas das respectivas folhas (processo de extração descrito em 2.6.2.1). A reação de RT-PCR para ambos os grupos de plantas transgênicas foi feita utilizando os *primers* CTV27-GatW-Rv e CTV28-GatW-Fw listados na Tabela 2.2, num volume final de 25  $\mu\text{l}$  contendo 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (*Thermo Scientific*), 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada um dos *primers*, 1U de *Dream Taq*, 1U de *M-MuLV* (*Roche*) e o respectivo tampão. Os ciclos de temperatura foram iguais aos descritos em 2.2.1.1, com um ciclo inicial adicional de 38°C durante 45 minutos. O produto de RT-PCR foi observado em gel de agarose a 1% usando como marcador molecular o 10-kb *NZYDNA Ladder III* (*NZYTech* Lda.). A confirmação das plantas transgênicas p23 foi também realizada através da detecção da proteína p23 por *Western blot*, processo que vem descrito no subcapítulo 2.6.1.

### **2.3.3 Enxertia de plantas *Nicotiana benthamiana***

Plantas WT *N. benthamiana* foram enxertadas, utilizando a técnica de enxertia em garfo, em plantas transgênicas *N. benthamiana* da linha dsp23 (porta-enxerto), ambas com aproximadamente 12 semanas. As plantas foram mantidas no fitoclima com humidade relativa envolvente aproximadamente de 100%. Apesar de terem sido realizadas várias enxertias com sucesso, passadas 12 semanas em apenas duas delas o enxerto desenvolveu-se vigorosamente para poder ser usado nos ensaios.

## **2.4 Infiltração mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

A estirpe *A. tumefaciens* C58C1 foi o agente usado para infetar as plantas *N. benthamiana* no estágio de desenvolvimento de 4 folhas. O método baseia-se na coinfiltração de culturas de *Agrobacterium*, cada uma transportando um vetor de expressão, nas folhas da planta *N. benthamiana* onde a região T-DNA de cada vetor de expressão é transferida para o núcleo das células inoculadas.

### **2.4.1 Expressão transiente de supressores do silenciamento de RNA**

A estirpe de *A. tumefaciens* contendo a construção que expressa o gene da GFP (pK-GFP) foi usada para induzir o silenciamento de RNA nas plantas transgênicas 16C de *N. benthamiana* e a sua inoculação individual serviu como controlo negativo. Para observação da atividade dos supressores de silenciamento de RNA, foram realizados ensaios de coinfiltração. A estratégia baseia-se na coinfiltração de duas estirpes de *Agrobacterium* nas folhas das plantas, uma das culturas contendo a construção que é usada para induzir o silenciamento de RNA, neste caso a pK-GFP e a outra transporta o gene supressor. De seguida, examina-se a zona infiltrada ao longo do tempo para observar a expressão transiente, o silenciamento local e/ou a supressão do silenciamento da GFP (Figura 2.4) (Roth *et al.*, 2004). Como controlo positivo, usou-se o supressor 2b do TAV (pK-Tav-2b) cuja capacidade supressora foi anteriormente reportada (Li *et al.*, 1999).



**Figura 2.4** | Representação esquemática do ensaio de expressão transiente. Adaptado de Hamilton *et al.* (2002).

Os pré-inóculos das culturas de *A. tumefaciens* foram colocados a crescer durante a noite a 28°C, com agitação em 5 ml de meio LB suplementado com os respectivos antibióticos (50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) descritos em 2.2.1.2. Usou-se 1 ml da cultura do pré-inóculo para preparar o inóculo num volume final de 20 ml em meio LB suplementado com 10 mM MES, 20  $\mu\text{M}$  de acetoseringona e 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  dos respectivos antibióticos descritos em 2.2.1.2,  $\text{DO}_{600}$  atingir 0,5-0,6. Misturou-se cada uma das culturas contendo a construção que expressa o supressor testado com a cultura que expressa a GFP na mesma proporção 1:1 (20 ml de GFP + 20 ml de supressor), centrifugou-se a mistura a 5000 rpm durante 5 minutos e ressuspendeu-se numa solução aquosa estéril (pH 5.6) contendo 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM MES e 100  $\mu\text{M}$  de acetoseringona. As misturas ficaram em repouso, no escuro durante pelo menos 1h até se proceder à infiltração das plantas. Para a infiltração usou-se uma seringa de 2 ml sem agulha e inoculou-se a parte abaxial das folhas, no estágio de 4 folhas com a suspensão bacteriana (Brigneti *et al.*, 1998). No geral foram inoculadas 2 a 3 folhas por planta, 10 a 12 plantas por modalidade, tendo sido cada experiência repetida pelo menos duas vezes.

#### 2.4.2 Expressão transiente simultânea dos supressores p20 e p23 do CTV

O estudo da interação entre as proteínas p20 e p23 do CTV foi feita para isolados dos grupos 3a e M. Foram preparados os inóculos com as culturas à  $\text{DO}_{600}$  de 0,5-0,6, da mesma forma que o descrito no subcapítulo anterior. Misturou-se na proporção 1:1:1 a cultura que transporta a construção do indutor de silênciamento pK-GFP, a cultura com a construção do supressor p20 e a cultura com o supressor p23 do mesmo isolado, nomeadamente: pK-GFP + pK-p20 3a + pK-p23 3a ou pK-GFP + pK-p20 M + pK-p23 M. Foi também preparado um inóculo para os isolados do Grupo M, misturando na mesma proporção 1:1:1, pK-GFP e os supressores p20 e p23 mas à  $\text{DO}_{600}$  de 0,25.

### **2.4.3 Expressão dos supressores do CTV através do vetor viral TRV**

#### Plantas transgênicas 16C de *N. benthamiana*

O estudo da atividade supressora dos supressores p20 e p23 do CTV ao longo do tempo foi feito utilizando as construções TRV referidas em 2.2.2. A indução do silenciamento das plantas foi efetuada com o vetor pK-dsGFP e as plantas inoculadas apenas com a cultura de *A. tumefaciens* contendo este vetor foram usadas como controlo negativo. Este inóculo foi preparado de acordo com o descrito em 2.4.1. A expressão dos supressores foi induzida através da coinfiltração de culturas de *A. tumefaciens*, uma contendo o indutor de silenciamento pK-dsGFP, uma outra contendo o vetor viral TRV RNA1 e a outra correspondendo à construção TRV2 RNA2 contendo um dos supressores do CTV descritos no subcapítulo 2.2.2. Para controlo do vetor viral TRV, plantas WT e 16C de *N. benthamiana* foram infiltradas com uma mistura das culturas de *A. tumefaciens* contendo as construções TRV1 e TRV2-GFP. As culturas cresceram em meio LB suplementado com os respetivos antibióticos, tal como o descrito em 2.2.2. As misturas foram preparadas com volumes iguais de cada cultura contendo cada uma a construção pK-dsGFP, TRV1 e TRV2-supressor (p20 ou p23), na proporção 1:1:1. Os inóculos bacterianos foram centrifugados como o descrito em 2.4.1 e o *pellet* foi ressuspensão numa solução aquosa estéril (pH 5.6) contendo 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES e 200 µM de acetoseringona. As soluções ficaram três horas no escuro à temperatura ambiente antes de se proceder à infiltração das plantas. Foram inoculadas 2 a 3 folhas por planta, 12 plantas por modalidade. No caso das plantas controlo foram inoculadas 4 plantas 16C e 4 plantas WT com uma cultura contendo na mesma proporção as construções TRV1 e TRV2-GFP, preparadas tal como o descrito acima para as culturas que contêm os supressores.

#### Plantas transgênicas p23 de *N. benthamiana*

Neste estudo pretendeu-se avaliar a possibilidade de silenciar o supressor p23 do Gp 3a quando transportado por um vetor viral, neste caso o TRV. As plantas transgênicas p23 infiltradas apenas com a construção pK-dsp23 (descrita em 2.2.1.2) foram usadas como controlo negativo. A expressão do supressor TRV-p23 nas plantas transgênicas p23 foi realizada de acordo com o descrito acima para as plantas 16C, com a exceção da construção usada como indutor do silenciamento que neste caso corresponde à construção pK-dsp23.

### Plantas enxertadas

As Plantas 1 e 2 enxertadas, descritas em 2.3.3, foram inoculadas 6 semanas depois da enxertia. No dia 0, o porta-enxerto que corresponde à planta *N. benthamiana* transgênica dsp23 foi inoculado com uma suspensão de *A. tumefaciens* que expressa o indutor do silenciamento pK-dsp23. As plantas foram depois inoculadas na parte superior WT com um inóculo de *A. tumefaciens* contendo os vetores TRV1 e TRV2-p23-3a. A Planta 1 foi inoculada 4 dias após a inoculação (dpi) inicial com pK-dsp23 e a Planta 2 foi inoculada 9 dpi inicial com pK-dsp23. Todos os inóculos foram preparados como o descrito acima. As plantas infiltradas foram mantidas no fitoclima nas mesmas condições descritas em 2.3.3.

## **2.5 Observação visual das plantas *Nicotiana benthamiana***

As plantas transgênicas *N. benthamiana* da linha 16C foram observadas com recurso a uma lâmpada manual UV de 100 W (*BlackRay B-100AP, UV products, Upland, CA, USA*). As plantas foram fotografadas com uma máquina fotográfica digital *Cannon (Canon EOS 450D)* sob luz UV e/ou luz visível. Todas as imagens obtidas e usadas no trabalho foram editadas usando o *software Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA)*.

Para uma monitorização mais detalhada da zona inoculada das folhas, uma a duas folhas inoculadas por cada modalidade foram cortadas na base do pecíolo, lavadas em 10% lixívia comercial para garantir alguma esterilidade e colocadas em placas de *Petri* contendo meio semi-sólido MS suplementado com 6 g.l<sup>-1</sup> de carvão ativado (tem como objetivo eliminar a fluorescência de fundo). As folhas foram observadas e as imagens obtidas com o estereomicroscópio *Olympus SZX16* equipado com um sistema de luz fluorescente *X-Cite® 120Q* (comprimento de onda 330-385 nm), acoplado a uma câmara de vídeo digital *Model XC30* e o *software* de imagem *CellB (Olympus Soft imaging solutions GmbH)*.

## **2.6 Métodos moleculares de análise de RNA e proteínas**

### **2.6.1 Análise por *Western blot***

#### **2.6.1.1 Extração de proteínas**

Foram recolhidas amostras de tecido para confirmação das plantas transgênicas p23 (descritas em 2.3.2) pelo método *Western blot*. Procedeu-se à extração da proteína de acordo com o procedimento descrito no protocolo do *TriReagent* (*Sigma*). O doseamento das proteínas foi pelo feito pelo método de *Bradford* (Bradford 1976). Como controlo negativo foi usado uma amostra de proteína da planta transgênica dsp23 e como controlo positivo foram usadas amostras de plantas inoculadas com a construção pK-p23 do grupo 3a.

#### **2.6.1.2 Separação de proteínas**

As proteínas extraídas das plantas transgênicas foram separadas através de um gel SDS-PAGE. O gel inferior foi preparado num volume final de 5 ml contendo: 1,6 ml de água, 2 ml de acrilamida a 30%, 1,3 ml de Tris a 1,5 M (pH 8,8), 50 µl de SDS a 10%; 50 µl de APS a 10% e 2,5 µl de TEMED. O gel ficou a polimerizar cerca de 45 minutos. O gel superior de concentração foi preparado em 1,5 ml contendo: 1,020 ml de água MQ; 255 µl de acrilamida a 30%; 195 µl de Tris 1 M (pH 8,8); 15 µl de SDS a 10%; 15 µl de APS a 10% e 1,5 µl de TEMED e polimerizou sobre o primeiro gel durante cerca de 30 minutos.

As amostras foram preparadas num volume final de 12 µl contendo: 5 µg de proteína, 3 µl de tampão de carga (*Bio-Rad*) e água MQ até perfazer o volume. As amostras foram desnaturadas durante 5 minutos a 95°C e colocadas no gelo até serem aplicadas nos poços do gel. No 1º poço aplicou-se 3 µl do marcador molecular (*Pre-stained Broad Range Biorad*, cat. N° 161-0318). A eletroforese correu a 165V no tampão de corrida Tris-Glicina (25 mM Tris pH 8,3; 250 mM Glicina; 0,1% SDS).

#### **2.6.1.3 Eletrotransferência e deteção de proteínas**

Para a eletrotransferência usou-se uma membrana de fluoreto de polivinilideno (*Immobilon-PVDF*, *Millipore*), que foi ativada previamente em metanol. A membrana ficou de seguida a incubar no tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 190 mM Glicina; 0,1% SDS; 20% Metanol) durante cerca de 10 minutos e procedeu-se à montagem da sanduíche, com a

seguinte ordem: 3 folhas de papel 3MM (com as mesmas dimensões da membrana) previamente humedecidas no tampão de transferência, membrana, gel e novamente 3 folhas de papel 3MM (humedecidas no tampão de transferência). A transferência foi feita com recurso ao aparelho *Electroblotter LKB Multiphor II Novablot (Pharmacia)*, durante 30 minutos a 200 mA. As proteínas foram fixadas fervendo a membrana durante 30 minutos e procedeu-se à deteção.

Colocou-se a membrana a incubar 1 minuto em tampão TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) e, de seguida, ficou a incubar na solução de bloqueamento [5% leite em pó magro (*Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad*) em TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% *Tween 20*)] durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação. Descartou-se a solução de bloqueamento e ficou a incubar durante a noite a 4°C com agitação na solução de bloqueamento com o anticorpo primário anti-p23-3a, obtido em coelho para o péptido CPFIIIDALIRKNSYQ que corresponde a uma sequência *consensus* da proteína p23 do Gp 3a (já existia no laboratório), com uma diluição de 1:2000. Procedeu-se a duas lavagens de 5 minutos com o tampão TBST, seguida de 2 lavagens de 5 minutos com o tampão TBS e incubou-se a membrana durante 15 minutos na solução de bloqueamento para de seguida ser incubada com o segundo anticorpo anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina (*Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase antibody produced in goat, Sigma*), diluída 1:5000 na solução de bloqueamento, durante 1 hora à temperatura ambiente. Procedeu-se novamente a lavagens com os tampões TBST e TBS como o descrito anteriormente. A deteção foi feita com as soluções NBT (*Roche*) e BCIP (*Roche*) em tampão de revelação (0,1 M Tris, pH 9,5; 0,05 M MgCl<sub>2</sub>; 0,1 NaCl), de acordo com as instruções do fornecedor.

### **2.6.2 Análise por Northern blot**

A análise por *Northern blot* foi utilizada para a deteção de siRNAs específicos da GFP e da p23 do CTV e dos níveis de expressão da GFP através da deteção de mRNA da GFP.

#### **2.6.2.1 Extração de RNA**

O RNA total foi extraído a partir de aproximadamente 0,3 g de tecido vegetal da zona inoculada com *A. tumefaciens* e também de folhas não inoculadas. O tecido foi macerado em azoto líquido e o pó resultante homogeneizado em 1 ml de *TriReagent*. As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 16000 g e a 4°C para remover o material insolúvel, sendo

o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrifuga. Adicionou-se 200 µl de clorofórmio frio (*Sigma*), misturou-se vortexando durante cerca de 15 segundos e a mistura ficou a repousar à temperatura ambiente durante 5 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriormente selecionadas. Após a centrifugação a mistura ficou separada em 3 fases: a fase inferior com cor avermelhada corresponde à fase clorofórmio-fenol e contém as proteínas, a interfase contém o DNA e a fase aquosa superior transparente contém o RNA. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga e o RNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol frio, misturando-se suavemente. A mistura ficou a repousar 10 minutos à temperatura ambiente e o RNA foi recuperado por centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. O *pellet* foi lavado com 1 ml de etanol a 80% frio por ml de *TriReagent* e centrifugou-se imediatamente durante 5 minutos a 16000 g e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ficou a secar à temperatura ambiente durante cerca de 10 minutos. O RNA foi ressuspendido em 50 µl de água tratada com DEPC pré-aquecida a 65°C. As amostras foram quantificadas e a sua qualidade avaliada usando o espectrofotómetro *Nanodrop 2000*. As amostras foram guardadas numa arca -80°C até posterior utilização.

#### **2.6.2.2 Preparação de sondas marcadas com Digoxigenina**

Para a deteção por *Northern blot* é necessário preparar uma sonda específica para hibridar com os RNAs que queremos detetar. Foram, por isso, preparadas duas sondas em DNA marcadas com DIG-11-UTP, uma para a deteção da GFP e outra para a deteção do supressor p23. A sequência inteira dos genes GFP e p23 (o isolado 11.5 descrito na Tabela 2.1) foram amplificados por PCR num volume final de 50 µl contendo 0,4 µM de cada *primer* (GFP-GW-ER-Fw; GFP-GW-ER-Rv para amplificação da GFP e CTV27-GatW-Rv; CTV28-GatW-Fw para amplificação da p23, descritos na Tabela 2.2), 16 µM de dATP, dGTP, dCTP, 10,4 µM de dTTP, 70 µM de Dig-11-dUTP (*Roche Diagnostics GmbH*), 1U de *Dream Taq* DNA polimerase e o respetivo tampão suplementado com 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Os ciclos de temperatura foram iguais aos descritos em 2.2.1.1. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 1,4% e os fragmentos de DNA marcados purificados a partir do gel. As sondas foram dissolvidas num volume de 20 µl em água DEPC, quantificadas no *Nanodrop* e armazenadas a -80°C.

### 2.6.2.3 Detecção de siRNAs

O RNA total das folhas de cada modalidade testada foi separado por eletroforese em mini-géis (85 mm/ 65 mm/ 0.75 mm) 15% de poliacrilamida (19:1), 7 M de ureia em tampão TBE. Após a polimerização do gel e antes da aplicação das amostras, os poços foram lavados com TBE para remover a ureia. As amostras de RNA foram preparadas num volume final de 12 µl misturando 10 µg de RNA com ¼ do volume de solução de carregamento (preparado com 98% formamida, 2% de 0,5 M EDTA e uma pitada de xileno cianol e azul bromofenol), ajustando o volume final com água DEPC. As amostras foram desnaturadas durante 5 minutos a 65°C e mantidas no gelo até serem aplicadas no gel. Para a detecção de siRNAs da GFP foi usado como marcador uma sequência sintética de RNA com 24-nt complementar à GFP (Pho-24-AGAACGGCAUCAAAAGCCAACUUCA), preparado nas mesmas condições das amostras de RNA. No caso da detecção dos siRNAs da p23 foi utilizado um marcador molecular de DNA com 42-nt complementar à p23, obtido através de digestão enzimática do produto de PCR do gene p23 com a enzima de restrição *MspI* (*Thermo Scientific*). Foi preparado nas mesmas condições das amostras de RNA, contudo, sendo em DNA foi desnaturado a 96°C durante 2 minutos. A eletroforese correu entre 150-200V até o azul bromofenol ter atingido o fundo do gel. O gel foi dividido a meio, pela posição do xileno cianol. Com a parte inferior do gel contendo os siRNAs foi montada uma sanduíche com folhas de papel de filtro embebidas em tampão TBE 0,5 X e a membrana da *Amersham Hybond™-NX* (*GE Healthcare*). O RNA foi transferido para a membrana usando o *Electroblotter LKB Multiphor II Novablot* durante 20 minutos, a 4 mA.cm<sup>-2</sup>. A fixação do RNA à membrana foi promovida usando uma solução EDC preparada como o descrito em Pall *et al.* (2007). A membrana foi colocada num frasco de plástico apropriado com a solução de hibridação do *kit Dig Northern Starter* (*Roche Diagnostics GmbH*) e a respetiva sonda (1 µl de sonda por ml de solução de hibridação) previamente desnaturada a 96°C durante 2 minutos. Utilizando uma incubadora com agitação (*Ecogen*), a membrana ficou a hibridar durante 16 horas a 40°C. Após a hibridação, a membrana foi lavada e incubada com várias soluções preparadas previamente, de acordo com as instruções descritas no protocolo do *kit Dig Northern Starter*. As bandas de RNA foram reveladas por quimiluminescência usando 1 ml do reagente *CDP-star* (*Roche Diagnostics GmbH*) diretamente aplicado sobre a membrana. O sinal foi gravado durante 15 minutos usando a câmara de visualização de astros adaptada *Starlight Xpress MX7C CCD* (*Starlight Express, UK*).

#### **2.6.2.4 Detecção de mRNA**

O RNA foi separado em mini-géis a 6% de poliacrilamida (19:1), 7 M de ureia em TBE. Usou-se 3 µg de RNA total por amostra, preparadas como o descrito no subcapítulo anterior. Como marcador usou-se o produto de PCR da GFP amplificado como o descrito em 2.2.1.1, preparado do mesmo modo que as amostras, contudo a desnaturação foi a 96°C durante 2 minutos. A eletroforese correu a 200V até o xileno cianol sair. O RNA foi transferido para membranas de *nylon* carregadas positivamente (*Boehringer Mannheim GmbH, Germany*) durante 45 minutos no *Electroblotter LKB Multiphor II Novablot* e foi fixado à luz UV durante 10 minutos. Todo o procedimento seguinte: hibridação, lavagens e detecção foi igual ao descrito para a detecção de siRNAs, com a exceção da temperatura de hibridação que foi neste caso de 60°C.

#### **2.6.2.5 Detecção de 5S RNA**

A detecção das bandas 5S do RNA foi usada como controlo da quantidade de RNA aplicado na análise por *Northern blot*. Na detecção de siRNAs estas bandas foram observadas na parte superior do gel. Na detecção de mRNA as bandas foram observadas no gel após a transferência do RNA para a membrana. Os géis foram corados em brometo de etídio e observados no transiluminador sob luz UV.

### **2.6.3 Análise do RNA por qRT-PCR**

Foi usado o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para a quantificação relativa de mRNA da GFP, do supressor p23 do CTV, da CP do TRV2 e da ubiquitina da planta *N. benthamiana*.

#### **2.6.3.1 Extração de RNA**

As amostras de RNA foram extraídas pelo método descrito em 2.6.2.1, contudo, a maioria das amostras de RNA foi extraída com o *kit E.Z.N.A.<sup>TM</sup>Plant (Omega Bio-tek)*, seguindo as instruções do fabricante. Cada modalidade reúne 3 réplicas biológicas extraídas de tecido vegetal com cerca de 60 mg. As amostras foram tratadas com a enzima DNase, usando o *kit TURBO DNA-free<sup>TM</sup> (Ambion)*, de acordo com o descrito no protocolo fornecido, para eliminar contaminações com DNA genómico. Foram depois quantificadas e a sua qualidade avaliada no *Nanodrop* e foram guardadas a -80°C até posterior utilização.

### 2.6.3.2 qRT-PCR

Para a quantificação relativa de mRNA por qRT-PCR usou-se o *kit* “*iScript™ One-Step RT-PCR with SYBR-Green*” (Bio-Rad) e a amplificação foi realizada no equipamento *iCycler IQ* da Bio-rad. A mistura de reação foi preparada num volume final de 25 µl, usando 12,5 µl do tampão *2X SYBR® Green RT-PCR mix*, 0,2 µM de cada *primer* respectivo (GFP-ER Taq-F/R; Ubi3-F/R; Rv/Fw Taq p23\_3a; RT-TRV2-CP-Fw/Rv) descritos na Tabela 2.2, 1µl da *iScript Reverse Transcriptase*, aproximadamente 20 ng de RNA total por amostra e o volume final ajustado com água MQ. Cada amostra correu em duas réplicas técnicas. Os ciclos de amplificação foram os seguintes: 10 minutos a 50°C para a síntese de cDNA; 5 minutos a 95°C para inativação da enzima *iScript Reverse transcriptase* e finalmente 35 ciclos a 95°C durante 5 minutos e 55°C durante 30 segundos.

Para quantificar os níveis de expressão de cada gene foi gerada a respectiva curva de calibração seguindo o método descrito em Pfaffl (2001). O valor da eficiência obtido para cada um dos transcritos foi: 96% para o transcrito da GFP; 90,3% para o transcrito da p23; 93% para o transcrito da CP do TRV2 e 92,5% para o transcrito da ubiquitina (Anexo I). Os valores do *threshold cycle* obtidos para cada amostra foram normalizados com os valores do transcrito do gene endógeno ubiquitina (Pfaffl 2001). Na quantificação do mRNA da GFP foi amplificado um fragmento de 147-pb e os níveis basais relativos de mRNA da GFP das plantas 16C não inoculadas foram usadas como referência. Na quantificação do mRNA da p23 foi gerado um fragmento de 175-pb. A quantificação do mRNA da CP do TRV2 gerou um fragmento de 107-pb.

### 2.6.3.3 Análise estatística

Foram usados dois métodos estatísticos para análise dos resultados obtidos na quantificação relativa de mRNA, nomeadamente, o teste de comparação múltiplo de *Duncan*, com o nível de significância ajustado para  $p < 0,05$  e o *T-test* de grupos com o nível de significância também estabelecido para  $p < 0,05$ . Ambos os testes foram realizados com o *software* estatístico SPSS da IBM.

## **2.7 Análise das sequências**

O alinhamento das sequências nucleotídicas da p23 de isolados do CTV com diferentes origens, obtidas em laboratório e no *GenBank*, e a construção da árvore filogenética, foi realizado no *software Geneious 6.5* (Biomatters Ltd.).

O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos das proteínas p23 dos sete grupos filogenéticos em estudo, bem como as comparações realizadas foi levado a cabo no programa *Bioedit* (Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA).

A estrutura tridimensional (3D) da proteína p23 foi obtida submetendo as sequências deduzidas de aminoácidos no servidor *I-TASSER* (Zhang, 2008). Este servidor tem a vantagem de não requerer dados prévios cristalográficos para modelar a proteína. A análise gráfica e estrutural foi efetuada no pacote *UCSF Chimera* que foi desenvolvido na unidade *Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics* na Universidade da Califórnia, São Francisco (Pettersen *et al.*, 2004).

---

# Capítulo

## 3

---

### **O SILENCIAMENTO SISTÊMICO PODE SER SUPRIMIDO PELA P23 DO CTV, CONTUDO, NÃO ESTÁ RELACIONADO COM A SEVERIDADE DO SINTOMA VIRAL**

Baseado no artigo:

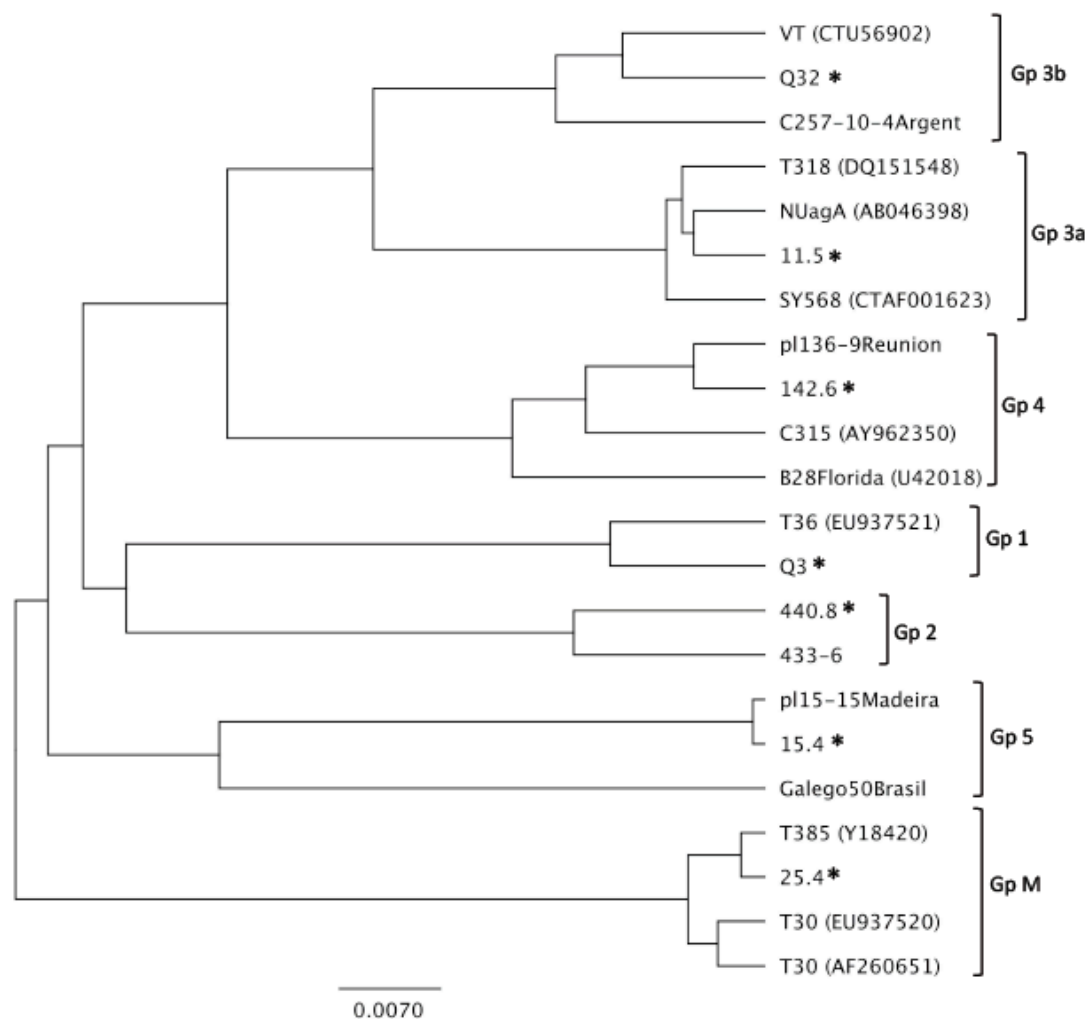
Costa Â., Marques N., Nolasco G. (2014). *Citrus tristeza virus p23 may suppress systemic silencing but is not related to the kind of viral syndrome. Physiological and Molecular Plant Pathology* 87: 69-75.

### 3.1 Introdução

As plantas possuem diferentes vias de silenciamento de RNA baseadas em sRNAs, as quais regulam um vasto número de funções fisiológicas, incluindo a regulação da expressão génica e a entrada de material exógeno, como por exemplo vírus (Chapman and Carrington 2007). A maioria dos vírus de plantas, como estratégia de contra defesa, apresenta no seu genoma genes que codificam para proteínas que atuam como supressores virais, que interferem em quase todos os passos da via de silenciamento de RNA (Hohn and Vazquez 2011, Li and Ding 2006, Burgyan and Havelda 2011). Para identificar e caracterizar os supressores virais no CTV, Lu *et al.* (2004) analisaram nove proteínas codificadas na região 3' do genoma e identificaram três proteínas supressoras, a p20, a p23 e a p25, que atuam em diferentes passos da via de silenciamento. A p23 suprime o silenciamento de RNA ao nível intracelular, a p25 ao nível intercelular e a p20 suprime os dois tipos de silenciamento.

A proteína p23, constituída por 209 aminoácidos, para além da sua capacidade supressora no silenciamento é uma proteína multifuncional (Flores *et al.*, 2013a) de ligação a RNA, que apresenta vários aminoácidos básicos e um domínio *Zn-finger* (Lopez *et al.*, 2000). É única no CTV, uma vez que, não foram encontrados genes homólogos noutros closterovirus, incluindo o BYV com o qual o CTV partilha um elevado grau de homologia nalgumas regiões génicas (Dolja *et al.*, 2006). Foi assim sugerido que a p23 possa ter evoluído para regular interações específicas do CTV com os seus hospedeiros (Flores *et al.*, 2013a). Estas características particulares da p23 suscitaram interesse no aprofundamento das suas propriedades supressoras. Lu *et al.* (2004) avaliaram a atividade supressora da proteína p23 do isolado T36 que pertence ao Gp 1. Contudo, o CTV foi agrupado em sete grupos filogenéticos com base no gene da CP (p25), que de um modo geral, se relacionam fenotipicamente com os sintomas induzidos pelo vírus nas espécies indicadoras (Nolasco *et al.*, 2009). Posteriormente verificou-se a mesma estrutura da população viral ao longo da região terminal 3' do genoma, ou seja, para o gene da p23 (Silva 2011) (Figura 3.1). Desta forma, neste estudo pretendeu-se caracterizar a atividade supressora da proteína p23 de um isolado representativo de cada um dos sete grupos filogenéticos reconhecidos para o CTV (Figura 3.1). O estudo envolveu ensaios de expressão transiente em plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* da linha 16C, que expressam constitutivamente a GFP (Brigneti *et al.*, 1998), através da coinfiltração das folhas com construções que expressam a GFP e outras que expressam os supressores p23. A atividade supressora das proteínas p23 nas plantas foi avaliada através da observação da

fluorescência emitida pela GFP sob luz UV, pela quantificação dos níveis de mRNA da GFP por qRT-PCR e pela detecção de siRNAs específicos da GFP.



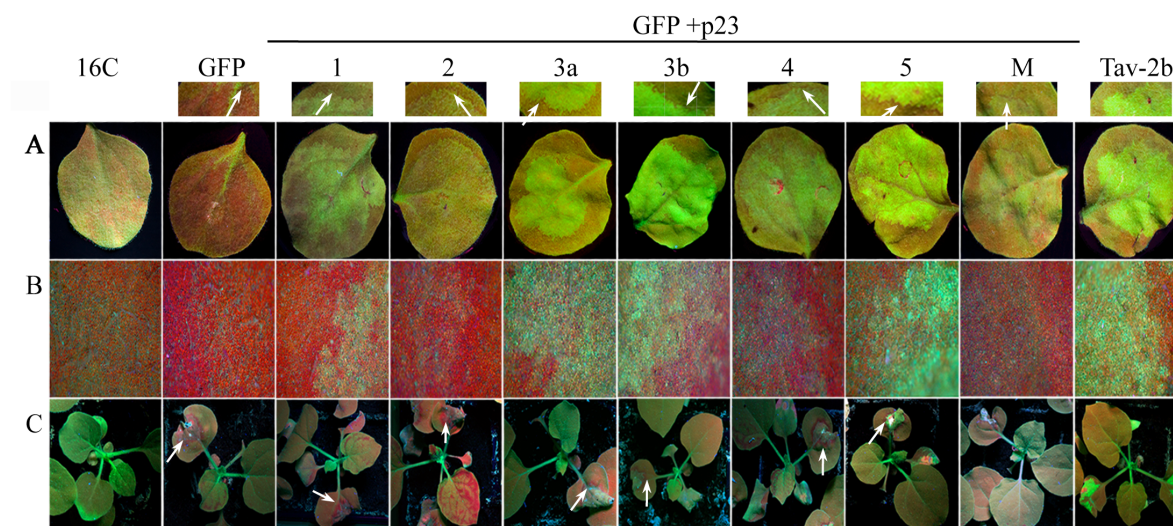
**Figura 3.1** | Árvore filogenética (segundo o método UPGMA, modelo *Tamura-Nei*) de sequências gênicas da p23 de isolados de CTV com diversas origens geográficas. As sequências obtidas no *GenBank* estão identificadas através dos números de acesso. As sequências testadas neste trabalho estão marcadas com um asterisco.

## 3.2 Resultados

### 3.2.1. A atividade supressora da p23 difere entre os grupos filogenéticos

#### 3.2.1.1 Análise da fluorescência da GFP

A atividade supressora da p23 dos 7 grupos filogeneticamente distintos descritos na Tabela 2.1, foi avaliada através da coinfiltração de plantas transgênicas de *N. benthamiana* da linha 16C com duas culturas de *Agrobacterium tumefaciens*, uma delas contendo uma construção que foi usada para induzir o silenciamento de RNA (pK-GFP) e a outra transportando uma construção com o supressor p23 de cada um dos isolados do CTV testados (pK-1, pK-2, pK-3a, pK-3b, pK-4, pK-5 ou pK-M) ou o controlo positivo Tav-2b (pK-Tav-2b). Para observar a expressão transiente da GFP, a zona infiltrada das folhas e as folhas novas que se desenvolveram foram examinadas à luz UV a partir do 2º até ao 10º dpi. As plantas inoculadas apenas com pK-GFP foram usadas como controlo negativo, observando-se a expressão máxima da GFP aos 3 dpi, contudo, praticamente desapareceu no dia seguinte. Nos ensaios de coinfiltração de pK-GFP com as construções que expressam as proteínas p23, a expressão da GFP foi mantida durante mais tempo, pelo menos 5 a 7 dpi (Figura 3.2). Ao 4º dpi foi possível observar diferenças entre as modalidades testadas (Figura 3.2A e B). Enquanto as proteínas dos grupos 2 e M foram as que induziram a fluorescência verde mais fraca, as p23 dos restantes grupos provocaram uma fluorescência verde intensa no local inoculado. Ao 10º dpi a fluorescência verde diminuiu significativamente: o local inoculado com os supressores p23 dos grupos 1 e 2 ficou vermelho semelhante ao observado com o indutor de silenciamento pK-GFP; na presença dos supressores dos grupos 3a, 3b, 4 e M manteve-se uma ligeira fluorescência verde; por sua vez, o local inoculado com o supressor do grupo 5 continuou a exibir uma fluorescência verde intensa, semelhante ao observado para o controlo positivo Tav-2b (Figura 3.2C).



**Figura 3.2** | Caracterização da atividade supressora p23 de sete isolados filogeneticamente distintos, através da expressão transitória mediada por *A. tumefaciens* nas plantas *N. benthamiana* da linha 16C. 16C: plantas controlo não inoculadas; GFP: infiltração com pK-GFP; 1, 2, 3a, 3b, 4, 5, M: coinfiltração de pK-GFP com a construção da p23 designada; Tav-2b: coinfiltração de pK-GFP com o controlo positivo pK-Tav-2b. Observação de folhas destacadas aos 4 dpi **A.** sob luz UV; **B.** sob luz UV, ampliada 4x usando um estereomicroscópio. **C.** Observação da planta inteira à luz UV aos 10 dpi. As setas brancas apontam para o anel vermelho que corresponde ao movimento do silenciamento a curta distância.

### 3.2.1.2 Quantificação do mRNA da GFP

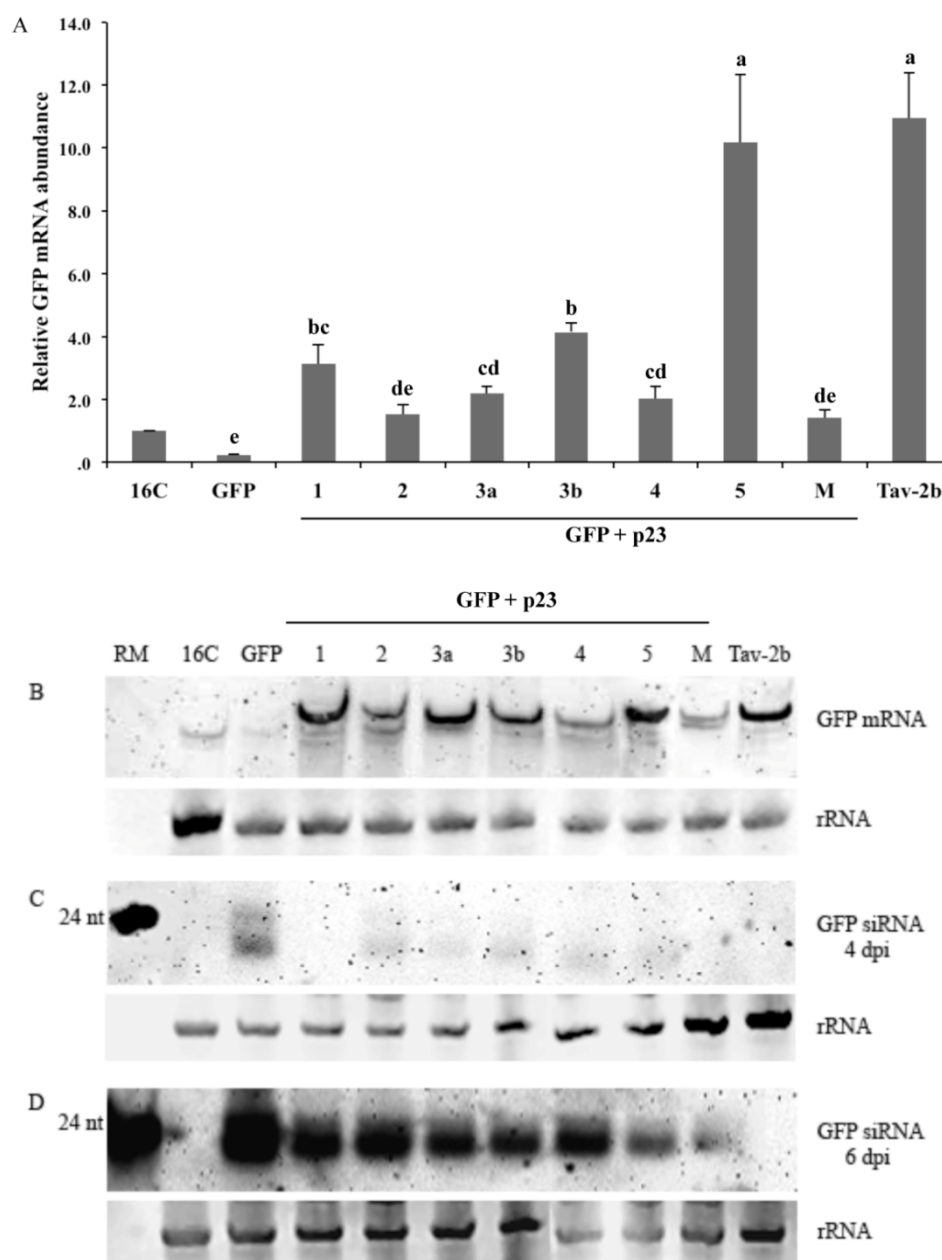
A quantificação do mRNA da GFP através de qRT-PCR permitiu avaliar melhor as diferenças na atividade supressora das proteínas p23 testadas e foi realizada aos 4 dpi (Figura 3.3A). Os tecidos inoculados apenas com o indutor do silenciamento pK-GFP revelaram um decréscimo significativo do mRNA da GFP. Por sua vez, nos tecidos coinfiltrados com pK-GFP e os supressores da p23 observou-se um aumento da acumulação do mRNA da GFP relativamente ao nível de referência, o mRNA da GFP das plantas 16C não inoculadas. As folhas inoculadas com o isolado do Gp 5 foram as que registaram o maior aumento, cerca de 10 vezes superior, atingindo valores semelhantes ao controlo positivo Tav-2b. Os tecidos inoculados com os Gps 2 e M originaram os níveis de acumulação do mRNA da GFP mais baixos, não se conseguindo demonstrar serem estatisticamente distintos dos níveis de acumulação de GFP das plantas inoculadas apenas com pK-GFP (Teste de *Duncan*). Para os restantes Gps da p23, os Gps 1, 3a, 3b e 4 observou-se níveis intermédios de acumulação do mRNA da GFP, sendo no entanto, estatisticamente diferentes dos níveis acumulados nas plantas inoculadas apenas com pK-GFP. A corroborar os dados obtidos por qRT-PCR, a acumulação do mRNA da GFP

detetada por *Northern blot* revelou diferenças significativas em todas as p23 testadas e o controlo negativo pK-GFP (Figura 3.3B). Além do mais, as diferenças de intensidade da fluorescência da GFP observadas nas plantas infiltradas condizem com a acumulação de mRNA da GFP registada.

### 3.2.1.3 Análise de siRNAs específicos da GFP

De forma a testar se as diferenças quantitativas do mRNA da GFP foram acompanhadas de alterações na acumulação de siRNAs, foi analisada a presença de siRNAs específicos da GFP nos tecidos inoculados aos 4 dpi (Figura 3.3C). A planta 16C não inoculada foi usada como controlo negativo. Nos tecidos inoculados apenas com pK-GFP foi onde se detetou maior acumulação de siRNAs da GFP, distinguindo-se duas classes: uma banda intensa que corresponde presumidamente a siRNAs com 21/22-nt e uma banda menos intensa com 24-nt. Na presença das proteínas p23, a acumulação de siRNAs da GFP reduziu drasticamente e na presença do controlo positivo Tav-2b não foram detetados siRNAs (Figura 3.3C). Os resultados obtidos a partir das observações sob luz UV, da quantificação do mRNA e da análise dos siRNAs sugerem que todas as proteínas p23 testadas são capazes de suprimir o silenciamento local, ainda que com diferentes eficiências.

Uma discrepância aparente foi notada para o Gp M quando se comparou os baixos níveis de expressão da GFP com os níveis de siRNAs que permaneceram reduzidos, tendo sido este resultado verificado noutros ensaios adicionais que foram efetuados. Devido à menor sensibilidade e precisão do processo de deteção de siRNAs comparativamente com a quantificação por qRT-PCR, considerou-se que as diferenças na acumulação de siRNAs pudessem ser mais evidentes numa fase posterior. O ensaio para a deteção de siRNAs foi então repetido ao 6º dpi, uma vez que, de acordo com as observações sob luz UV, a expressão da GFP encontrava-se completamente silenciada nas plantas infiltradas com o controlo negativo pK-GFP, sugerindo uma maior acumulação de siRNAs e, desta forma, estes seriam mais facilmente detetados. Como pode ser observado na Figura 3.3D, ao 6º dpi houve um aumento significativo na acumulação de siRNAs em todas as modalidades testadas, incluindo para o supressor do Gp M.



**Figura 3.3** | **A.** Níveis relativos do mRNA da GFP nas folhas *N. benthamiana* inoculadas aos 4 dpi, obtidos por qRT-PCR e normalizados com os níveis de mRNA da ubiquitina. GFP: inoculação com pK-GFP; 1, 2, 3a, 3b, 4, 5, M: coinoculação de pK-GFP com o supressor p23 designado; Tav-2b: coinoculação de pK-GFP com o controlo positivo Tav-2b. 16C: plantas não inoculadas usadas como referência para a expressão relativa. As barras de erro representam o desvio padrão (SD) de três determinações independentes. As letras indicam as diferenças significativas das médias obtidas pelo Teste de *Duncan* ( $p < 0.05$ ). **B.** Bandas de mRNA específico da GFP obtidas por análise *Northern blot* aos 4 dpi, de folhas inoculadas de *N. benthamiana*. **C e D.** Bandas de siRNAs específicos da GFP obtidas por análise *Northern blot* ao 4° e 6° dpi, respetivamente, de folhas inoculadas de *N. benthamiana*. RM: marcador de RNA sintético com 24-nt. rRNA: parte superior do gel de poliácridamida corado com brometo de etídio, revelando as bandas do 5S rRNA, usado como controlo da quantidade de RNA carregada.

### 3.2.2 Efeito dos supressores p23 no silenciamento a curta distância e sistêmico

O silenciamento quer a curta distância como o silenciamento sistêmico foi seguido através da observação direta das folhas de *N. benthamina* sob luz UV. O silenciamento a curta distância foi revelado pela visualização de um anel vermelho adjacente à zona infiltrada com *A. tumefaciens* (Figura 3.2A e 3.2C). Este silenciamento surgiu aos 4 dpi nas plantas inoculadas com o indutor de silenciamento pK-GFP, assim como em todas as modalidades das proteínas p23 testadas, com largura e intensidade vermelha semelhantes. Apenas nas plantas infiltradas com o controlo positivo Tav-2b este anel não se desenvolveu durante o período de observação.

O silenciamento sistêmico foi observado nas folhas jovens não inoculadas e desenvolveu-se de forma diferente entre as modalidades testadas (Figura 3.2C). Ao 7º dpi o número de plantas inoculadas com a p23 dos Gps 1, 2 e 4 encontrava-se tão ou mais silenciadas sistemicamente comparadas com o controlo negativo pK-GFP (Tabela 3.1). Contudo, ao 10º dpi a tendência inverteu-se, apresentando o controlo negativo um maior número de plantas silenciadas sistemicamente. Ainda assim, para as inoculações com a p23 dos Gps 1, 2 e 4, verificou-se um valor semelhante, com 83% das plantas silenciadas sistemicamente. Já a proporção de plantas com silenciamento sistêmico, inoculadas com o supressor dos Gps 3a, 3b e M foi bastante inferior e, surpreendentemente, para a p23 do Gp 5 não foi observado silenciamento sistêmico, verificando-se o mesmo para o controlo positivo Tav-2b.

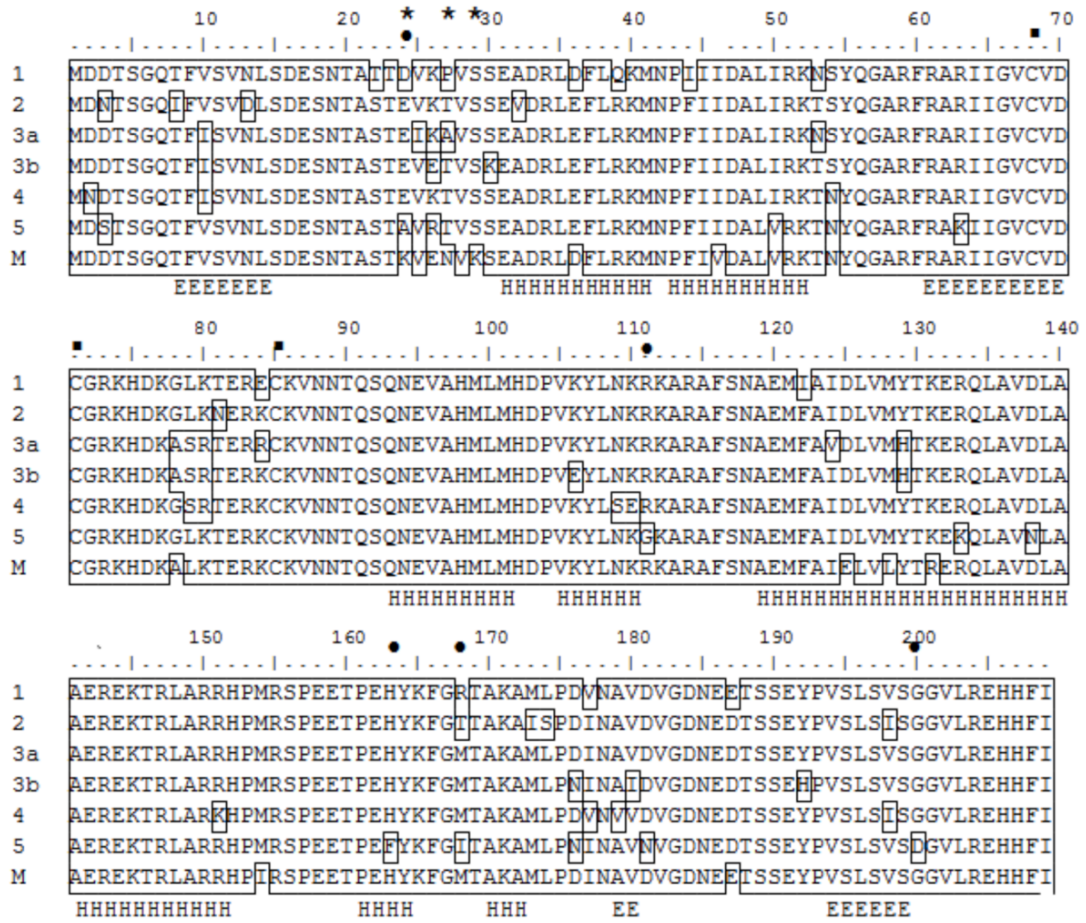
| Modalidade | Percentagem de plantas silenciadas sistemicamente (%) |        |
|------------|---|--------|
|            | 7 dpi   | 10 dpi |
| GFP        | 33.   | 87.    |
| 1          | 58.   | 83.    |
| 2          | 67.   | 83.    |
| 3a         | 17.   | 25.    |
| 3b         | 0.  | 58.    |
| 4          | 33.   | 83.    |
| 5          | 0.  | 0.     |
| M          | 8.  | 25.    |
| Tav-2b     | 0.  | 0.     |

**Tabela 3.1** | Percentagem de plantas silenciadas sistemicamente aos 7 e 10 dpi. As plantas foram coinfiltradas com pK-GFP e com as construções que expressam os supressores p23 do grupo filogenético designado. O controlo negativo consistiu na infiltração das plantas apenas com pK-GFP e o controlo positivo na coinfiltração das plantas com pK-GFP e pK-Tav-2b.

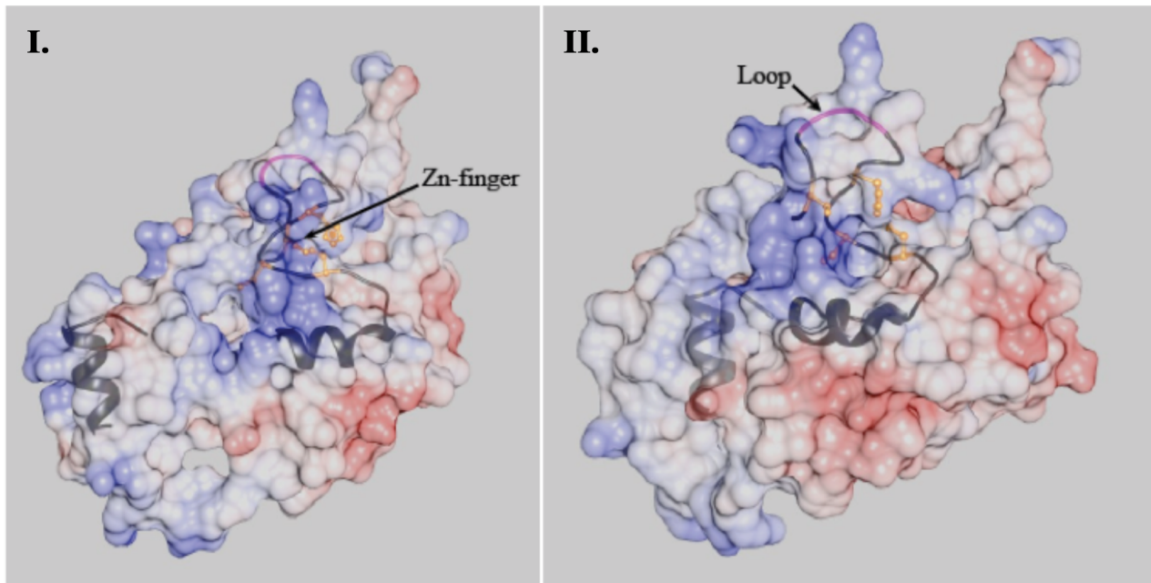
### 3.2.3. Comparação da estrutura da p23 entre os grupos filogenéticos

O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos das proteínas p23 testadas neste estudo revela 53 posições polimórficas (Figura 3.4A). Destas posições polimórficas, 10 ocorrem dentro do sinal de localização nucleolar (aminoácidos 51-86 e 143-155), onde se insere também o domínio *Zn-finger*, referidos como essenciais para a atividade da p23 (Figura 3.4B) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). De notar que os resíduos chave CCHC do domínio *Zn-finger* indicado por Lopez *et al.* (2000) que se encontram nas posições 68, 71, 75 e 85 (Figura 2.3 e 3.4A) apresentam-se conservados nas sete sequências deduzidas de aminoácidos da p23. Para ter uma visão de como estas substituições podem afetar a estrutura da proteína a 3D, as sequências de aminoácidos foram submetidas no servidor *I-TASSER* (Zhang 2008). Este servidor tem a vantagem de não necessitar de dados cristalográficos prévios para modelar a proteína. A qualidade dos modelos foi avaliada através do *C-score* (de acordo com os autores do *software* os valores de *C-score* aceitáveis variam entre -5 e 2), que variou entre -3,34 para a p23 do Gp 2 e -4,23 para a do Gp M. Apesar dos modelos estruturais resultantes partilharem os aspetos essenciais da estrutura secundária, foi difícil de os sobrepor em 3D. Para contornar este aspeto, cada um dos três melhores modelos 3D (Gps 1, 2 e 5) foi submetido independentemente no *software UCSF-Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004) e usado para deduzir as estruturas das restantes sequências. Estes foram então espacialmente sobrepostos e os resíduos cujos átomos alfa-C estavam separados mais do que 1Å foram marcados. Um curto troço saliente de 4 aminoácidos situado dentro do domínio *Zn-finger* (posições 79-82) não pôde ser sobreponível entre as 7 variantes da proteína p23, independentemente do modelo usado para deduzir as restantes estruturas no *UCSF-Chimera* (Figura 3.4 – *loop* rosa). As restantes zonas das regiões essenciais do sinal de localização nucleolar referidas por Ruiz-Ruiz *et al.* (2013) foram sobrepostas com uma interrupção de 1Å.

A.



B.



**Figura 3.4** | A. Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos da p23 de cada um dos isolados testados, representantes dos sete grupos filogenéticos. Os aminoácidos delimitados por uma linha são os resíduos não-conservados. (■) Resíduos de cisteína no

motivo de ligação ao RNA inserido entre a região rica em resíduos básicos e a posição do domínio *Zn-finger* (posição 68-86). (•) Resíduos de aminoácidos que distinguem a p23 do Gp 5 dos restantes (\*) e que distinguem a p23 do Gp 5 e do Gp M dos restantes. Blocos de letras H e E correspondem à previsão da estrutura secundária da sequência de aminoácidos da p23 do Gp M, correspondendo às  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ , respetivamente. As restantes proteínas p23 apresentam uma previsão da estrutura secundária semelhante. **B.** Visualização do modelo tridimensional da proteína p23 do Gp1. As regiões coloridas a azul e a vermelho correspondem, respetivamente, às regiões carregadas positiva e negativamente. Os aminoácidos correspondentes ao sinal de localização nucleolar e ao domínio *Zn-finger* estão representados por uma linha preta. Os aminoácidos pertencentes ao motivo CCHC que coordena o íon  $Zn^{2+}$  estão representados a amarelo. **I.** A imagem mostra à direita a primeira parte do sinal de localização nucleolar e o domínio *Zn-finger* (aminoácidos 51-86) e à esquerda, a segunda parte do sinal de localização nucleolar (aminoácidos 143-155). **II.** Rotação da imagem I que permite visualizar a primeira parte do sinal de localização nucleolar e o domínio *Zn-finger* em primeiro plano (aminoácidos 51-86). O *loop* a cor de rosa corresponde à região para a qual não se observa qualquer sobreposição entre as proteínas dos 7 grupos filogenéticos.

### 3.3 Discussão

O facto de isolados distintos do CTV induzirem sintomas diferentes nas plantas citrinos indicadoras, levou ao estudo da atividade supressora da proteína p23, descrita anteriormente como um determinante patogénico (Albiach-Marti *et al.*, 2010). Neste estudo foi analisada a proteína p23 de um isolado representativo de cada um dos sete grupos filogeneticamente distintos e com diferente atividade biológica (Nolasco *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos mostram que as proteínas p23 testadas têm capacidade de suprimir o silenciamento local mas não o silenciamento a curta distância. As diferenças na atividade supressora local foram reveladas através da observação visual das folhas sob luz UV, da quantificação do mRNA da GFP por qRT-PCR e através da análise da acumulação de siRNAs por *Northern blot*. Na análise por qRT-PCR, embora não tenha sido possível demonstrar um nível de expressão da GFP significativamente distinto entre as plantas inoculadas com os supressores menos eficientes, nomeadamente dos Gps 2 e M e o controlo negativo (pK-GFP), a análise por *Northern blot* permitiu observar diferenças evidentes na acumulação quer de mRNA como de siRNAs específicos da GFP, revelando que são supressores capazes de suprimir o silenciamento local. Na presença da p23 dos Gps 1, 3a, 3b e 4 observou-se atividade supressora intermédia, revelando-se a p23 do Gp5 o supressor mais eficiente, prevenindo a degradação do mRNA da GFP por um período mais longo, bem como, foram detetadas apenas pequenas quantidades de siRNAs.

Ao nível do desenvolvimento do silenciamento sistémico foram também observadas diferenças induzidas pela p23 de cada um dos sete isolados testados. Ao 7º dpi a p23 dos Gps 1 e 2 parece ter facilitado o espalhamento do sinal de silenciamento, uma vez que, a percentagem de plantas silenciadas sistemicamente foi maior do que a observada para o controlo negativo (Tabela 3.1). No entanto, ao 10º dpi esta tendência desapareceu e verificou-se uma proporção mais elevada de silenciamento sistémico nas plantas inoculadas com o controlo negativo. Ainda assim, para a p23 dos Gps 1, 2 e 4 foi observando silenciamento sistémico das plantas semelhante ao controlo negativo. Por sua vez, a p23 dos Gps 3a, 3b e M induziu um silenciamento sistémico reduzido e, particularmente surpreendente, foi a constatação de que o Gp 5 inibiu completamente o silenciamento sistémico. O facto do Gp 5 ter uma capacidade supressora local significativamente superior, sugere a existência de uma relação entre a intensidade do silenciamento local e sistémico. De facto, fortes supressores locais como o Tav-2b têm também geralmente capacidade de suprimir ou atrasar o aparecimento do silenciamento sistémico. Esta relação quantitativa entre a intensidade do silenciamento local e sistémico foi também atribuída por outros autores para vírus não relacionados com o CTV (Lacombe *et al.*, 2010).

A atividade supressora de proteínas virais pode ser reduzida drasticamente devido a mutações pontuais (Chen *et al.*, 2008, Torres-Barcelo *et al.*, 2008). No caso da p23, Ruiz-Ruiz *et al.* (2013) descreveram uma série de mutações pontuais da p23 do isolado T36 (Gp 1), envolvendo resíduos básicos do sinal de localização nucleolar e do domínio *Zn-finger*, que quando substituídos por alanina reduziram fortemente a atividade supressora. Este conjunto dos resíduos substituídos o K77, o K80, o R83, o K84 e o K86, são resíduos conservados entre as sete sequências deduzidas de aminoácidos da p23 testadas, com a exceção do K80. É interessante notar que a posição 80 localiza-se no pequeno *loop* onde nos modelos 3D não há sobreposição. Este facto, sugere que esta pequena região possa ser responsável por diferenças menores encontradas na atividade supressora. Contudo, não explica a atividade supressora muito superior observada para o supressor do Gp 5, um vez que, este resíduo é partilhado com a sequência de aminoácidos do Gp 1, bem como dos Gps 2 e M.

Com a exceção do supressor da p23 do Gp 5, apenas pequenas diferenças foram encontradas na atividade supressora da p23 dos restantes grupos filogenéticos. Contrariamente ao que inicialmente era esperado, tendo em conta o envolvimento da p23 na patogenicidade do CTV (Albiach-Marti *et al.*, 2010) não foi possível detetar uma relação entre o tipo ou severidade dos sintomas e a atividade supressora desta proteína. Por outro lado, a análise detalhada de

Ruiz-Ruiz *et al.* (2013) mostrou que as regiões envolvidas na atividade supressora e na patogenicidade são as mesmas. Uma vez que, os resíduos essenciais que compõem a p23 são motivos conservados, é concebível que haja similaridade da atividade supressora da p23 entre os grupos filogenéticos, e que possa não conduzir a diferenças notórias nos sintomas. A razão pela qual a p23 do Gp5, apesar de ter atividade supressora forte, não originar sintomas particularmente intensos permanece obscura. Ensaios adicionais com variantes genômicas deste grupo seria importante serem realizados, de forma a saber se este é ou não um comportamento particular desta variante genômica ou uma característica atribuída a todo o grupo filogenético.

A existência de três genes supressores no CTV (p20, p23 e CP) (Lu *et al.*, 2004), sugere uma ação coordenada e complementar para suprimir diferentes passos da via de silenciamento de RNA. De facto, Soler *et al.* (2012) observaram que uma planta é resistente ao CTV apenas quando é transgênica para os três supressores virais, sugerindo a importância dos três genes supressores na infecção pelo CTV. Esta pode ser uma estratégia usada por diversos vírus de plantas, ainda que, o conhecimento sobre esta matéria seja limitado. Por exemplo, duas proteínas do *Potato virus M* (PVM) foram descritas como sendo inibidoras do silenciamento mediado por RNA em diferentes etapas, assegurando desta forma uma infecção bem sucedida do hospedeiro (Senshu *et al.*, 2011). Além disso, a patogenicidade viral pode também ser determinada pela influência do supressor viral na via miRNA (Kasschau *et al.*, 2003). Verificou-se para a proteína 2b de estirpes *mild* e severas do *Cucumber mosaic virus* (CMV) que a severidade do fenótipo relacionou-se com a severidade da variante genômica e com a sua capacidade de interferir com a via miRNA, mas não com a sua atividade supressora (Lewsey *et al.*, 2007). O mesmo poderá acontecer com as proteínas p23, isto é, podem interferir com a via miRNA resultando em diferentes síndromas nas plantas, apesar de serem observadas poucas diferenças ao nível da sua atividade supressora.

---

# Capítulo

## 4

---

### **AS PROTEÍNAS P20 E P23 DO CTV APRESENTARAM SINERGISMO NA SUPRESSÃO LOCAL DO SILENCIAMENTO**

Baseado no artigo em processo de publicação:

Costa A., Martins T.R., Marques N., Nolasco G. (2014). P20 and p23 proteins from *Citrus tristeza virus* show synergism on local silencing suppression. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.

## 4.1 Introdução

Quando dois ou mais vírus coinfetam uma planta pode ocorrer, de modo geral, as seguintes situações: podem produzir uma infecção na qual nenhum deles é afetado pelo outro ou podem interagir entre si levando ao aumento do título viral e a sintomas mais severos, sendo este fenómeno referido como sinergismo viral (Pruss *et al.*, 1997; Vance *et al.*, 1995). Esta interação sinérgica tem sido sugerida como resultado da supressão do mecanismo de defesa do hospedeiro pelos supressores do silenciamento de RNA (Pruss *et al.*, 1997; Vanitharani *et al.*, 2004). Uma forma de sinergia, isto é, uma ação coordenada e complementar para suprimir diferentes passos da via do silenciamento de RNA foi também sugerida por vários autores relacionando-a com um único vírus que codificasse mais do que um supressor do silenciamento (Canizares *et al.*, 2008; Ding 2010; Senshu *et al.*, 2011). Sendo o CTV um vírus com três supressores, neste trabalho pretendeu-se avaliar a atividade supressora conjunta das proteínas p20 e p23 do CTV de isolados *stem pitting* e *mild*, e elucidar o tipo de interação entre ambas, uma vez que têm como alvo a resposta de silenciamento local de RNA do hospedeiro (Lu *et al.*, 2004). Para tal, recorreu-se aos ensaios clássicos de transformação transiente que envolvem a coexpressão da GFP com a expressão de um supressor (Brigneti *et al.*, 1998). A atividade supressora foi avaliada através da expressão simples ou conjunta dos supressores de um mesmo isolado.

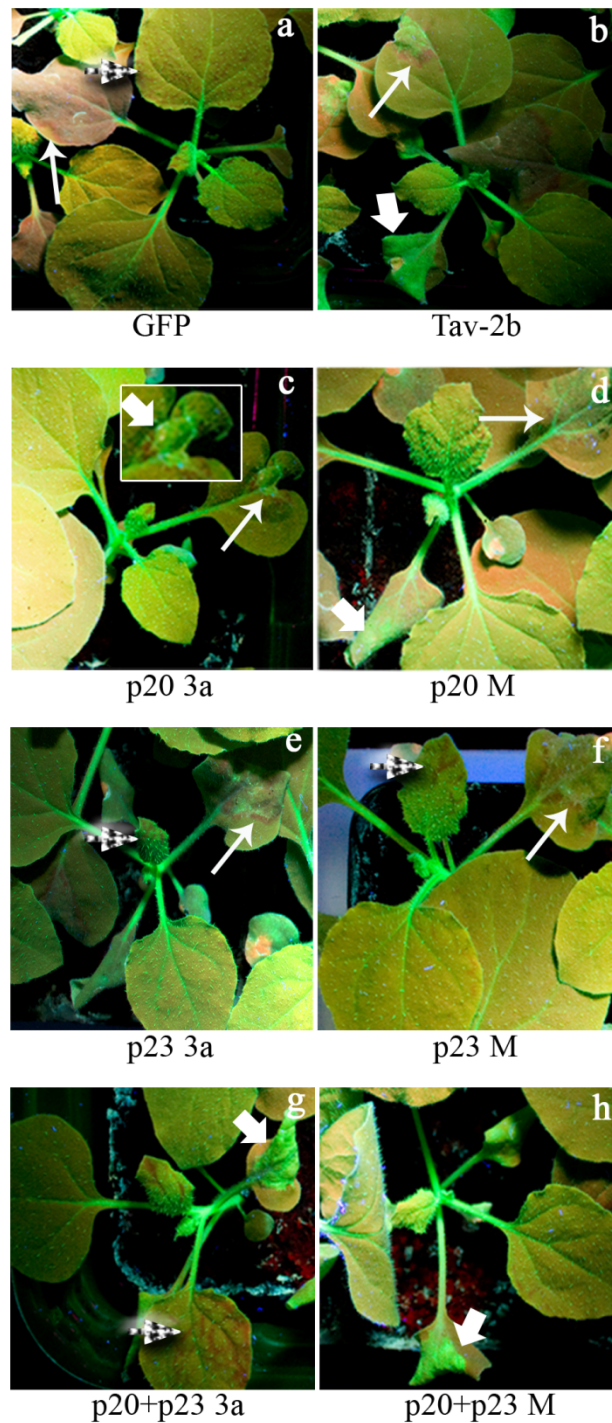
## 4.2 Resultados

### 4.2.1 Atividade supressora combinada das proteínas p20 e p23

A interação entre os supressores p20 e p23 do CTV de isolados dos grupos 3a e M (Tabela 2.1) foi levada a cabo em ensaios de expressão transiente desenvolvidos nas plantas *Nicotiana benthamiana* da linha 16C, através da coinfiltração conjunta dos supressores do CTV. O resultado foi comparado com as plantas infiltradas com cada um dos supressores individualmente e com o forte supressor Tav-2b, que foi usado como controlo positivo. Para induzir o silenciamento da GFP, as plantas foram infiltradas com a construção pK-GFP, que expressa o gene homólogo ao transgene das plantas 16C e as plantas inoculadas individualmente com pK-GFP serviram de controlo negativo. Os inóculos com as culturas de *Agrobacterium tumefaciens* à DO<sub>600</sub> de 0,5 foram preparados como o descrito em 2.4. As plantas inoculadas foram observadas e os resultados registados durante 9 dpi.

Nas folhas infiltradas apenas com o indutor de silenciamento pK-GFP, observou-se aos 3 dpi um aumento da fluorescência verde, resultado da expressão transiente da GFP, mas que ao 5º dia começou a diminuir e ao 6º dpi praticamente desapareceu (Figura 4.1a). Já na presença do controlo positivo Tav-2b, a mancha no local inoculado permaneceu com fluorescência verde intensa durante o tempo de observação do ensaio (Figura 4.1b, seta grossa). Tal como esperado, a coexpressão de pK-GFP com os supressores do CTV inoculados individualmente manteve a fluorescência verde das folhas por um período de tempo mais longo, pelo menos até ao 7º dpi, não tendo sido observadas diferenças significativas entre os supressores p20 e p23. A infiltração conjunta dos supressores p20 e p23 conduziu ao aumento notável da fluorescência verde para ambos os grupos do CTV testados e manteve-se por um período de tempo mais longo, pelo menos durante 9 dpi, ainda que, nalgumas folhas inoculadas com os supressores do Gp M se tenha observado uma menor intensidade da fluorescência quando comparado com os do Gp 3a (Figura 4.1g e 4.1h, setas grossas).

O silenciamento a curta distância, que é manifestado pela presença do anel vermelho que se forma à volta da mancha infiltrada, foi observado 5 dpi nas folhas infiltradas apenas com pK-GFP (Figura 4.1a, seta fina) e nas folhas coinfiltradas com o supressor p23 de ambos os grupos (Figura 4.1e e 4.1f, setas finas). Por outro lado, a expressão apenas do supressor p20 ou coinfiltrado com a p23 atrasou o espalhamento do sinal de silenciamento a curta distância, tendo este sido observado aos 8-9 dpi (Figura 4.1c, e 4.1d, setas estreitas). De notar que este anel vermelho não foi observado em todas as folhas infiltradas e a sua ausência coincidiu com a fluorescência verde intensa das coinfiltrações conjuntas da p20 e p23 que se observou na zona inoculada (Figura 4.1g e 4.1h, setas estreitas), um padrão semelhante ao observado no controlo positivo Tav-2b (Figura 4.1b, seta estreita). As folhas superiores não infiltradas foram monitorizadas para a deteção do silenciamento sistémico, tendo este sido observado em todas as modalidades testadas (Figura 4.1, setas brancas e pretas). Em geral, a progressão do silenciamento sistémico foi mais fortemente bloqueada pelo supressor p20 e pelos isolados do Gp M do que pelos do Gp 3a. Apesar dos supressores p20 e p23 do CTV terem suprimido localmente o PTGS, nenhum deles foi capaz de suprimir o silenciamento a curta distância nem o silenciamento sistémico, mesmo quando inoculados simultaneamente.

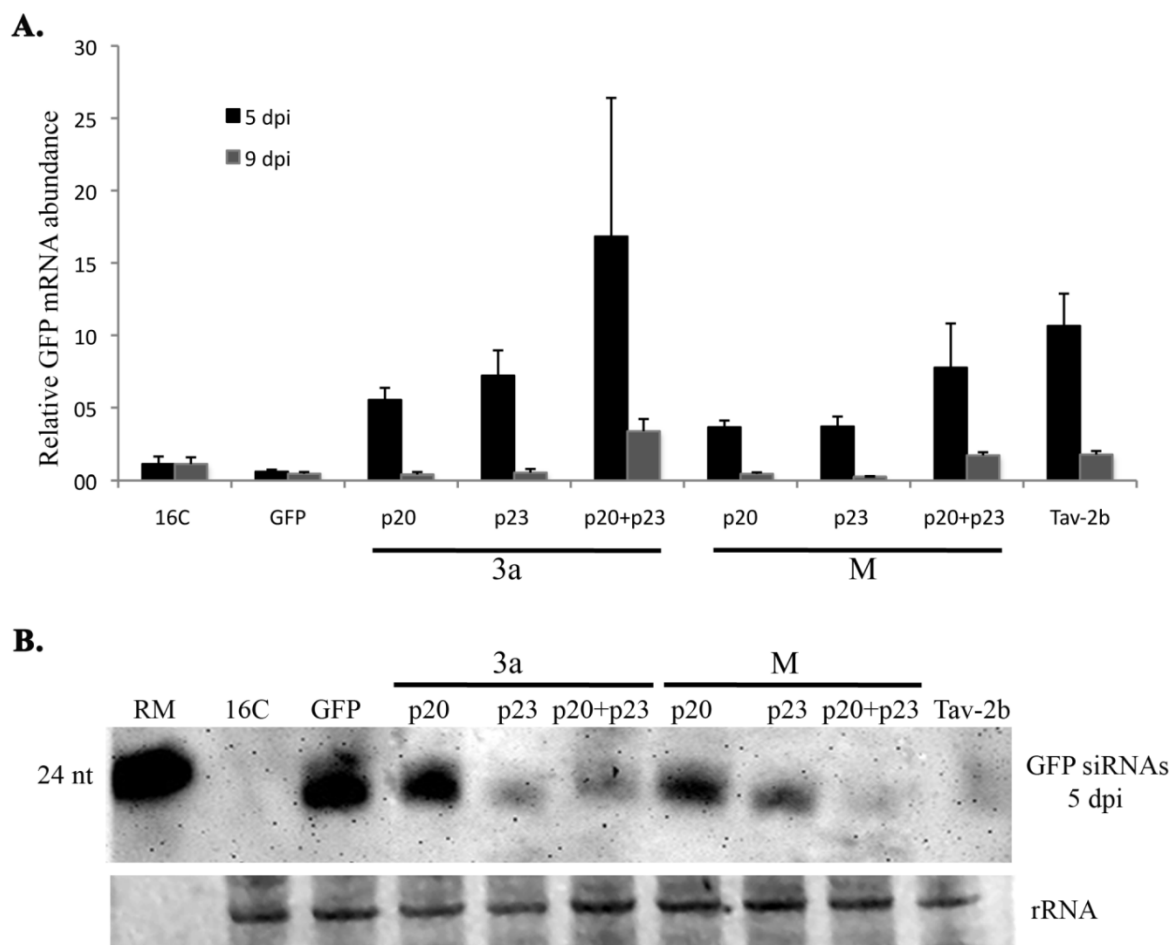


**Figura 4.1|** Observação das plantas *N. benthamiana* da linha 16C infiltradas sob luz UV ao 9º dpi. **a.** infiltração com o indutor de silenciamento pK-GFP; **b.** coinfiltração de pK-GFP com o controlo positivo Tav-2b; **c.** coinfiltração de pK-GFP com pK-p20 3a; **d.** coinfiltração de pK-GFP com pK-p20 M; **e.** coinfiltração de pK-GFP com pK-p23 3a; **f.** coinfiltração de pK-GFP com pK-p23 M; **g.** coinfiltração conjunta dos supressores do CTV do grupo 3a com pK-GFP; **h.** coinfiltração conjunta dos supressores do CTV do grupo M com pK-GFP. As setas brancas grossas apontam a fluorescência verde emitida no local inoculado; as setas brancas estreitas indicam o movimento do sinal de silenciamento a curta distância e as setas pretas e brancas apontam para o silenciamento sistêmico.

A atividade supressora foi comparada por qRT-PCR através da quantificação relativa de mRNA da GFP da região inoculada de folhas recolhidas ao 5° e 9° dpi. Os valores obtidos de mRNA da GFP foram normalizados com os níveis de mRNA da ubiquitina. Os níveis de mRNA da GFP da planta 16C não inoculadas foram usados como referência (expressão relativa igual a 1), tendo sido os restantes valores referidos a este. Os resultados obtidos revelaram-se consistentes com as observações visuais. Ao 5° dpi nas amostras inoculadas com o controlo negativo pK-GFP observou-se uma redução drástica dos níveis de mRNA da GFP (Figura 4.2A) e, tal como o esperado, na presença de um supressor ocorreu um aumento nos níveis do transcrito da GFP. A supressão simultânea exercida por dois supressores do CTV levou a uma acumulação superior de mRNA da GFP quando comparado com os supressores inoculados individualmente. Nesta condição, detetou-se uma expressão relativa 8 (Gp M) a 17 vezes superior (Gp 3a) comparativamente às folhas 16C não inoculadas. Aos 9 dpi, os níveis de transcrito da GFP decresceram para níveis quase indetetáveis nas coinfiltrações individuais (Figura 4.2A). Já para a coinfiltração dos dois supressores de um mesmo isolado ainda foi possível detetar níveis relativamente elevados de mRNA da GFP, cerca de 2 a 3,4 vezes superior comparativamente às folhas 16C não inoculadas. Os supressores p20 e p23 do Gp 3a revelaram uma atividade supressora superior comparada com a observada para as proteínas do Gp M, quer nas inoculações individuais dos supressores como nas inoculações mistas (Figura 4.2A). Os resultados de qRT-PCR foram analisados estatisticamente utilizando o método estatístico *T-test* de grupos (descrito em 2.6.3.3). Os níveis de expressão da GFP das modalidades testadas foram comparados com os do controlo negativo pK-GFP. Aos 5 dpi todas as condições testadas confirmaram serem estatisticamente diferentes, contudo, aos 9 dpi apenas as inoculações com o controlo positivo Tav-2b e as inoculações mistas com os supressores do CTV é que se revelaram significativamente diferentes.

A confirmação de que o sistema PTGS foi ativado foi realizada através da deteção de siRNAs específicos da GFP por análise *Northern blot* (descrita 2.6.2). Foram usadas amostras de RNA extraídas de folhas inoculadas aos 5 dpi. Como seria de esperar, não foram detetados siRNAs nas plantas 16C não inoculadas e a maior acumulação de siRNAs de todas as classes (21-22 e 24-nt) foi observada nas plantas inoculadas com o indutor de silenciamento pK-GFP (Figura 4.2B). Por sua vez, a expressão dos supressores na planta levou a uma redução na acumulação de todas as classes de siRNAs, sendo mais evidente na presença dos supressores p23 do que dos supressores p20. Esta observação sugere que a p23 exibe atividade supressora local

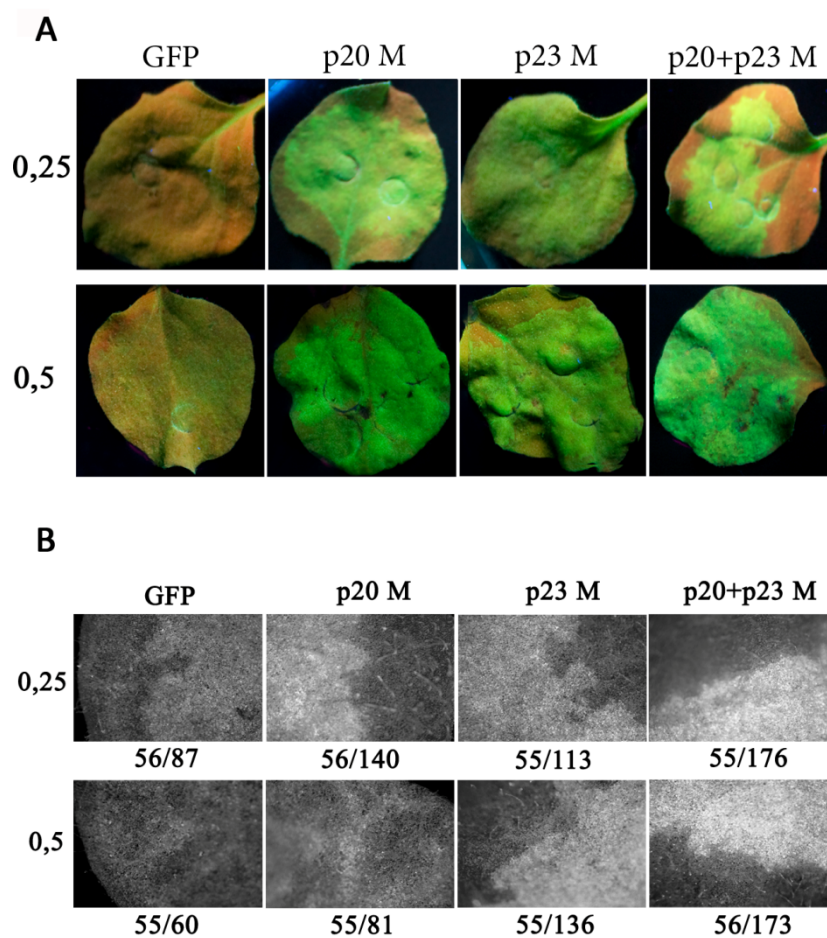
superior à p20. Na inoculação simultânea dos supressores do CTV do Gp M, a acumulação de siRNAs foi praticamente abolida.



**Figura 4.2** | **A.** Níveis relativos do mRNA da GFP nas folhas 16C de *N. benthamiana* agroinfiltradas aos 5 e 9 dpi, determinado por qRT-PCR. 16C: plantas 16C não inoculadas, sendo o nível de expressão da GFP usado como referência (expressão relativa igual a 1); GFP: infiltração com o controlo negativo pK-GFP; p20 3a, p23 3a, p20 M, p23 M: coinfiltração de pK-GFP com cada uma das construções p20 e p23 do isolado viral respetivo; p20+p23 3a: coinfiltração de pK-GFP com as construções p20 e p23 do isolado do Gp 3a; p20+p23 M: coinfiltração de pK-GFP com as construções p20 e p23 do isolado do Gp M; Tav-2b: coinfiltração de pK-GFP com o controlo positivo Tav-2b. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (SD) de três determinações independentes. **B.** Análise da acumulação de siRNAs específicos da GFP aos 5 dpi nas folhas 16C de *N. benthamiana* agroinfiltradas transportando os plasmídeos correspondentes indicados na imagem acima. RM: marcador de RNA sintético com 24-nt. O painel inferior mostra as bandas do 5S rRNA corado em brometo de etídio e que serviu de controlo da quantidade de RNA carregado.

#### **4.2.2 As proteínas supressoras p20 e p23 aparentam ter atividade sinérgica**

A atividade supressora observada aquando da inoculação simultânea dos supressores do CTV poderia ser resultado de um efeito aditivo da quantidade de supressor inoculado. Para melhor avaliar estes resultados, foi realizado um ensaio complementar, inoculando as plantas com uma cultura de *A. tumefaciens* com uma densidade ótica com metade da inicialmente testada de 0,5. O ensaio consistiu então na coinfiltração individual ou conjunta dos supressores p20 e p23 dos isolados do Gp M com as culturas de *Agrobacterium* à  $DO_{600}$  de 0,25 (descrito em 2.4.2). Apesar das folhas terem sido inoculadas com culturas contendo metade da densidade ótica inicial, ao 5º dpi as folhas inoculadas emitiam fluorescência verde semelhante ao observado para a  $DO_{600}$  de 0,5, quer nas inoculações individuais como nas mistas (Figura 4.3A). Para estimar a intensidade da fluorescência verde das folhas inoculadas com as duas densidades óticas testadas, recorreu-se ao estereomicroscópio para obter imagens mais detalhadas (descrito em 2.5). As imagens foram convertidas a tons de cinzento com recurso ao *software Adobe Photoshop CS3*. Este *software* usa um algoritmo que permite converter as cores vermelhas em áreas escuras, enquanto as cores verdes e amarelas são convertidas em áreas claras. O mesmo algoritmo foi aplicado a todas as imagens. As áreas escuras foram ajustadas para valores médios semelhantes, enquanto que o contraste geral da imagem foi mantido. Finalmente, os valores médios das áreas claras foram medidos e comparados (Figura 4.3B). Os dados revelaram que a supressão local do PTGS pelos supressores é independente da densidade ótica das culturas de *Agrobacterium* testadas, ou seja, a inoculação conjunta dos supressores do CTV induziu uma fluorescência verde semelhante quer para a  $DO_{600}$  de 0,25 como para a de 0,5. Estes resultados sugerem, por isso, a existência de um efeito sinérgico entre as proteínas p20 e p23, em vez de uma efeito cumulativo da atividade supressora.



**Figura 4.3** | **A.** Imagens das folhas inoculadas aos 5 dpi com culturas de *A. tumefaciens* à  $DO_{600}$  de 0,25 e 0,5, sob luz UV evidenciando a fluorescência da GFP. GFP: infiltração com o controlo negativo pK-GFP; p20 M, p23 M: coinfiltração de pK-GFP com a construção p20 ou p23 designada; p20+p23 M: coinfiltração simultânea dos supressores p20 e p23 do isolado *mild* com pK-GFP **B.** As mesmas imagens descritas em **A** obtidas no estereomicroscópio e convertidas a tons de cinzento no *software Adobe Photoshop CS3*. Os valores abaixo das imagens correspondem ao rácio entre os níveis de vermelho (zonas escuras) e verde (zonas claras).

### 4.3 Discussão

O CTV codifica três proteínas supressoras que exibem características distintas na supressão do silenciamento. A proteína CP tem como alvo o mecanismo de silenciamento intercelular, a proteína p23 interfere com o mecanismo de silenciamento intracelular e a proteína p20 com ambos os mecanismos (Lu *et al.*, 2004). Contudo, recentemente Costa *et al.* (2014) verificaram que o supressor p23 do Gp5 tem também capacidade de interferir com o silenciamento intercelular. Uma vez que, as proteínas p20 e p23 têm como alvo o mecanismo de silenciamento local de RNA, neste estudo pretendeu-se elucidar o tipo de interação entre estas proteínas. A supressão local dos supressores p20 e p23 do CTV de vários grupos filogenéticos distintos foi anteriormente caracterizada, tendo-se ambos revelado eficientes supressores locais (Costa *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2012). Neste estudo, estes resultados foram confirmados para os supressores p20 e p23 de isolados dos grupos *mild* (Gp M) e *stem pitting* (Gp 3a), sendo a sua atividade supressora semelhante. Ainda assim, na presença da proteína p23 foi observado uma acumulação inferior de siRNAs, bem como, uma acumulação ligeiramente superior de mRNA da GFP quando comparada com a proteína p20, sugerindo que a p23 é um supressor mais forte do que a p20 na supressão local do silenciamento. Do mesmo modo, a expressão da p23 a partir do isolado T36 (Gp 1) também gerou níveis de siRNAs ligeiramente inferiores comparados com a expressão da p20, ainda que, neste caso, tenham sido observadas diferenças notórias na fluorescência da GFP entre os dois supressores (Lu *et al.*, 2004). Nas infiltrações conjuntas dos supressores do CTV para ambos os isolados testados, quer a fluorescência da GFP como a acumulação de mRNA da GFP foram superiores e os níveis de siRNAs mais reduzidos quando comparados com os supressores inoculados individualmente. Para além disso, o registo da fluorescência da GFP nas folhas infiltradas com culturas de *A. tumefaciens* à DO<sub>600</sub> de 0,5 ou de 0,25 foi semelhante (Figura 4.3). Estas observações sugerem portanto, a existência de um efeito sinérgico entre as proteínas p20 e p23, uma vez que, a elevada intensidade da fluorescência verde detetada parece ser independente da densidade ótica do inóculo de *A. tumefaciens* infiltrado.

As interações sinérgicas foram já descritas aquando da coinfeção de plantas com dois vírus e associadas com a atividade dos supressores virais de ambos os vírus no PTGS. Este tipo de interação culmina com o aumento de sintomas sistémicos e um elevado título viral (Bag *et al.*, 2012; Vanitharani *et al.*, 2004). O facto de no genoma de CTV estarem presentes dois supressores locais do PTGS que atuam sinergicamente pode resultar numa maior capacidade

de supressão do silenciamento local, tal como foi observado aqui na planta modelo de *N. benthamiana*. O forte sistema de defesa antiviral detetado nas plantas de limeira mexicana e *Citrus sinensis* (L.) Osb. infetadas com CTV (Flores *et al.*, 2013a; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011) provavelmente só poderá ser ultrapassado com existência de mais do que um supressor do silenciamento. A reforçar esta ideia está a observação interessante da inoculação simples da p20 ou conjunta com a p23 ter levado ao atraso no espalhamento do sinal de silenciamento quer a curta distância como no sistêmico.

Anteriormente foram realizados ensaios para estudar a interação entre as proteínas p20 e p23 através do sistema *two-hybrid system*, contudo não foi detetada qualquer atividade (Gowda *et al.*, 2000). Ainda assim, estas proteínas são necessárias para o desenvolvimento da infecção sistêmica que em estudos com mutantes virais do CTV foi bloqueada através da deleção da p20 ou p23 (Dawson *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2013a; Tatineni *et al.*, 2008), sugerindo a existência de uma atividade coordenada e complementar a diversos níveis na infecção viral promovida por estas duas proteínas do CTV. Apesar dos vários papéis desempenhados por estas proteínas no mecanismo de silenciamento de RNA, os seus alvos moleculares permanecem desconhecidos. É por isso necessário aprofundar o conhecimento dos alvos dos supressores de CTV na via de silenciamento de RNA para revelar a estratégia deste vírus na infecção do hospedeiro.

---

# Capítulo

## 5

---

**PROPRIEDADES SUPRESSORAS DAS PROTEÍNAS P20 E P23 QUANDO  
EXPRESSAS SISTEMICAMENTE E POR UM PERÍODO ALARGADO**

## 5.1 INTRODUÇÃO

A atividade supressora intracelular das proteínas p20 (Marques *et al.*, 2012) e p23 (Costa *et al.*, 2014) de vários grupos filogenéticos do CTV foi anteriormente caracterizada e apesar de serem observadas diferentes capacidades supressoras, não foi possível traçar uma relação entre a sintomatologia atribuída aos grupos filogenéticos definidos por Nolasco *et al.* (2009) e a atividade supressora. Para as proteínas p20 e p23 testadas, as variantes do Gp 5 revelaram ser os supressores mais eficientes e as do Gp M as mais fracas na supressão local do silenciamento.

Devido ao rápido decaimento da expressão de p20 e p23 nos ensaios de coinfiltração envolvendo expressão transiente, a avaliação da atividade supressora por esse processo está longe da realidade de uma infecção viral em que a supressão do silenciamento atua sistemicamente durante um período alargado. Para esse estudo é necessária uma abordagem diferente. A transformação genética poderia ser empregue e, sendo um método frequentemente utilizado (Guo and Ding, 2002; Lu *et al.*, 2004; Mallory *et al.*, 2001), é contudo, um processo moroso. Uma alternativa mais rápida e simples é o uso de vírus de plantas como veículos para introduzir e expressar genes heterólogos em plantas (Chapman *et al.*, 1992). Quando o vírus se espalha na planta permite a expressão dos genes inseridos no seu genoma sem ser necessário transformar geneticamente as plantas (Liu *et al.*, 2002) e apesar de não serem incorporados permanentemente no genoma da planta, a multiplicação viral e expressão do gene de interesse pode continuar por longos períodos (MacFarlane and Popovich, 2000; Padmanabhan and Dinesh-Kumar, 2008). Diversos vírus de planta têm vindo a ser utilizados para desenvolver vetores virais (Padmanabhan and Dinesh-Kumar, 2008; Unver and Budak, 2009), sendo atualmente o *Tobacco rattle virus* (TRV, género *Tobravirus*, família *Virgaviridae*) um dos vetores mais utilizados. A infecção pelo TRV não origina sintomas ou se observados são suaves, o que facilita a identificação do fenótipo induzido pelo gene introduzido, para além de ter capacidade de infetar uma grande variedade de hospedeiros e invadir todos os tecidos inclusive os meristemas (Dinesh-Kumar *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002; Ratcliff *et al.*, 2001).

O TRV apresenta genoma de RNA de cadeia simples bipartido. O fragmento RNA1 codifica as proteínas virais que são responsáveis pela replicação e pelo movimento do vírus nas plantas. Duas destas proteínas, a 16-kDa e a 29-kDa foram descritas como sendo fracas supressores do silenciamento de RNA (Deng *et al.*, 2013; Martin-Hernandez and Baulcombe,

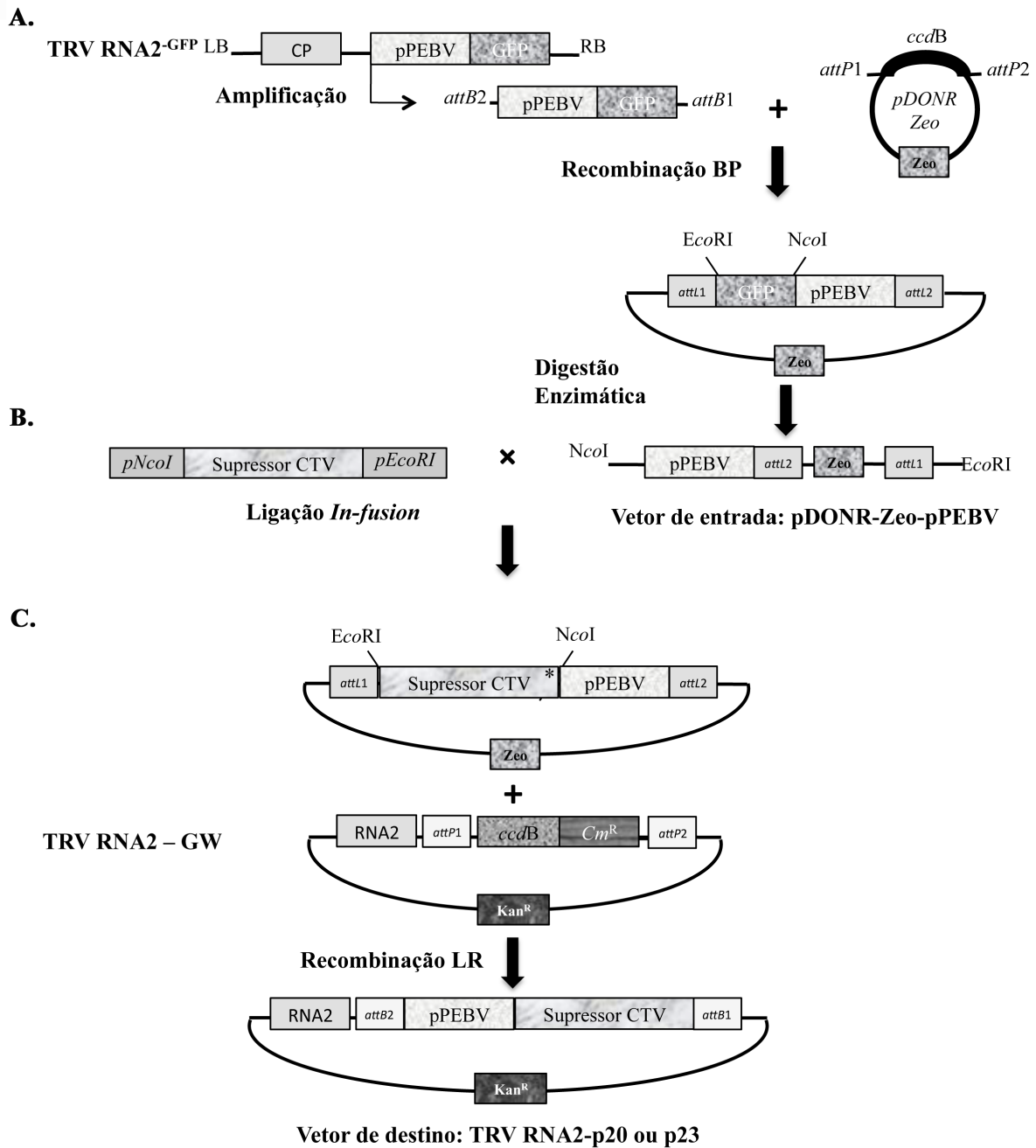
2008). A proteína 16-kDa não é necessária para a infecção sistêmica do TRV, mas é o fator que permite a invasão transiente dos meristemas (Martin-Hernandez and Baulcombe, 2008). A proteína 29-kDa é uma proteína do movimento e a supressão do silenciamento está associada com a replicação viral (Deng *et al.*, 2013). A ação coordenada de ambas proteínas é necessária para evitar o aparecimento de sintomas necróticos (Deng *et al.*, 2013). O fragmento RNA2 varia no tamanho dependendo do isolado do vírus, codifica a CP e, por vezes, uma ou mais proteínas não estruturais, que estão implicadas na transmissão mediada por nemátodes (Liu *et al.*, 2002; Unver and Budak, 2009). Uma vez que, estes genes não estruturais são dispensáveis para a replicação viral e propagação nas plantas, o RNA2 pôde ser modificado criando um sistema eficiente de clonagem e expressão para o uso em ensaios genómicos funcionais (Dinesh-Kumar *et al.*, 2003; MacFarlane and Popovich, 2000).

MacFarlane e Popovich (2000) modificaram clones de RNA2 do isolado TRV PpK20 (pTR9598) removendo os genes 2b e 2c não essenciais e inseriram no seu lugar o promotor da proteína da cápside de *Pea early-browning virus* (PEBV, género *Tobravirus*, família *Virgaviridae*) sob cujo controlo se insere o gene heterólogo (Figura 5.1). A necessidade de usar um promotor diferente do da CP do TRV tem por objetivo evitar instabilidade devido à homologia (MacFarlane and Popovich, 2000). Este vetor inserido num plasmídeo apropriado é expresso por transcrição pela T7 RNA polimerase e inoculado nas plantas na forma de RNA. Contudo, é um método caro e o facto dos vetores virais poderem ser introduzidos na planta por outros métodos (Padmanabhan and Dinesh-Kumar, 2008), leva a preferir a inoculação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Turpen *et al.*, 1993) por ser barato e fácil de aplicar (Lu *et al.*, 2003; Padmanabhan and Dinesh-Kumar, 2008). Neste capítulo, as proteínas p20 e p23 foram expressas em plantas *Nicotiana benthamiana* usando um vetor TRV modificado e adaptado para uma melhor facilidade de aplicação (Figura 5.1), usando a conceção descrita acima. Tendo em conta os resultados observados anteriormente na supressão transiente do silenciamento (Costa *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2012) foram selecionados os Gps filogenéticos 1, 3a, 5 e M. Os isolados do Gp 5 por se terem revelado os mais eficientes na supressão local (Costa *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2012); o Gp 1 por conter os isolados que têm servido de referência na maioria dos estudos com a proteína p23; os isolados do Gp 3a pois originam sintomas severos e os isolados do Gp M, por corresponderem a isolados *mild*. O vetor TRV ao espalhar-se pela planta assegura a expressão das proteínas supressoras do CTV sistemicamente, permitindo desta forma, avaliar as suas capacidades supressoras ao longo do tempo.

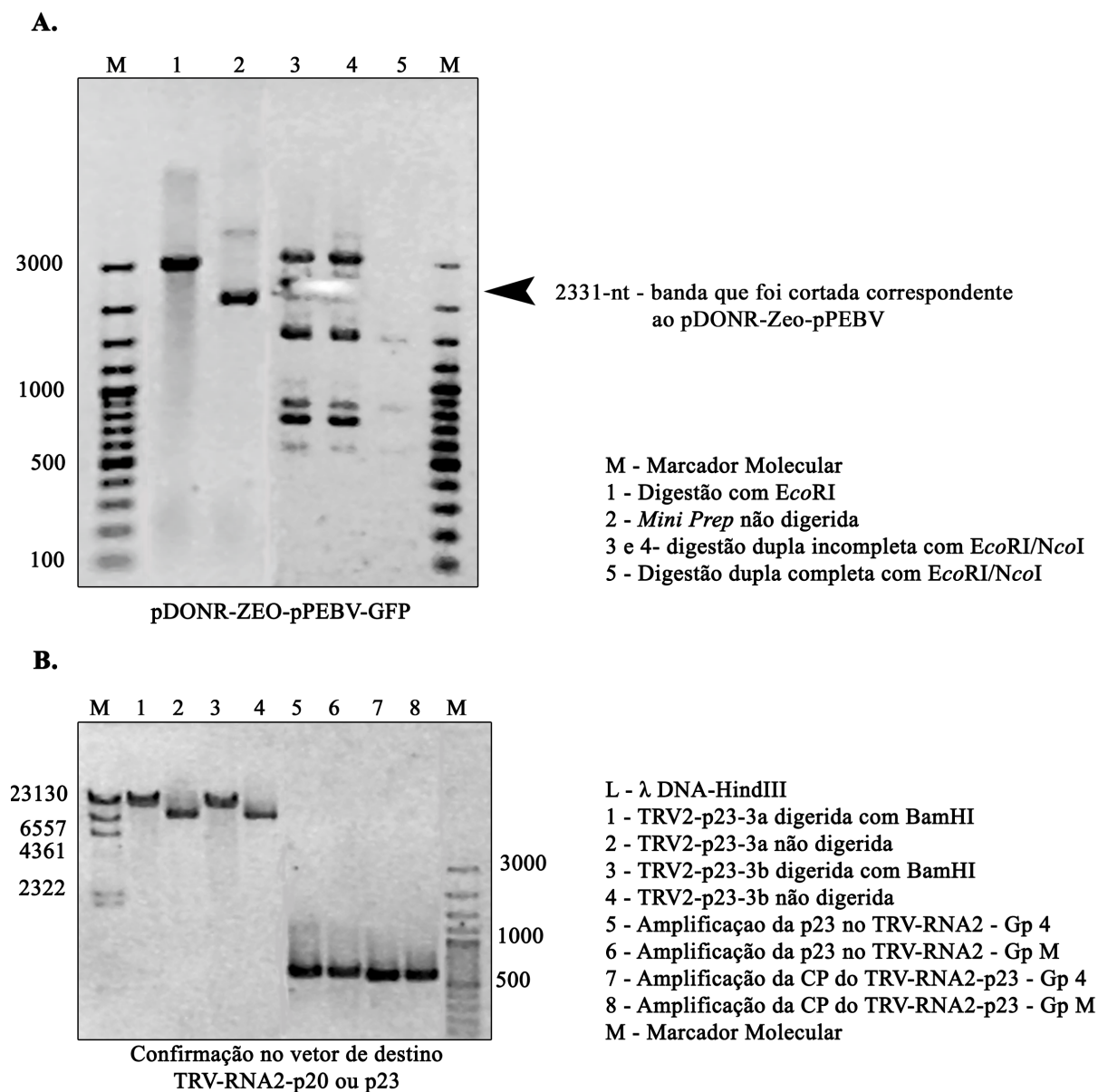
## 5.2 RESULTADOS

### 5.2.1 Modificações no vetor TRV RNA2 para gerar um vetor com elevada capacidade de expressão

Os vetores TRV RNA2 disponíveis no laboratório são ambos derivados do isolado K20 mas um é um vetor de expressão e o outro modificado para VIGS. O vetor TRV RNA2-GFP (MacFarlane and Popovich, 2000) que codifica o gene GFP deriva de um clone integral do RNA2 do TRV e de um fragmento de 978-pb que contem o gene GFP sob controlo do promotor da CP do PEBV. Contudo, a inoculação das plantas é feita através de RNA transcrito *in vitro*, o que traz diversos inconvenientes metodológicos em comparação com a agroinoculação. Por outro lado, o vetor T-DNA TRV RNA2-GW (Liu *et al.*, 2002), está inserido num vetor binário, podendo portanto ser agroinoculado, mas é um vetor preparado para VIGS em que o fragmento do gene a silenciar é inserido em antisense num local de recombinação *Gateway*. Dadas as vantagens metodológicas deste vetor, decidiu-se transformá-lo num vetor de expressão usando para tal o promotor de PEBV, obtido a partir de TRV RNA2-GFP. Para tal, o fragmento que contem o promotor PEBV-GFP do TRV2 foi amplificado por PCR inserindo-se os sinais de recombinação *attB* invertidos para poder mais tarde passar da orientação antisense para sense no vetor final (Figura 5.1A). Os supressores do CTV foram inseridos em lugar do gene GFP, que foi removido e a nova cassete de expressão inserida no vetor de destino (Figura 5.1C). Para confirmar a atividade biológica foi realizado um ensaio preliminar através da inoculação de plantas com culturas de *Agrobacterium* contendo uma mistura dos vetores RNA1 e RNA2-GFP. A confirmação foi obtida através da expressão da proteína GFP fora do local de inoculação como resultado do movimento do vírus TRV na planta, indicando que estes vetores podem ser usados com sucesso para expressar genes de interesse em *N. benthamiana* (Figura 5.3A).



**Figura 5.1** | Representação esquemática da clonagem dos produtos PCR dos supressores de CTV no vetor TRV RNA2. **A.** TRV RNA2-GFP – mapa do vetor TRV2 modificado, contendo um promotor subgenômico de RNA do vírus PEBV ligado ao gene GFP. Esta cassette foi amplificada com *primers* específicos contendo os locais de recombinação *attB* e o produto PCR clonado diretamente no vetor pDONR-ZEO por recombinação BP. Através de digestão enzimática a GFP foi removida originando-se o vetor de entrada usado para a clonagem dos supressores de CTV. **B.** Usando o método de clonagem da *In-fusion* os supressores de CTV foram inseridos no vetor de entrada pDONR-pPEBV. **C.** Os vetores de entrada foram recombinados com o vetor TRV RNA2-GW usando o sistema *Gateway*, resultando no clone recombinante contendo as regiões *attB1* e *attB2* a flanquearem o promotor PEBV e o supressor CTV.



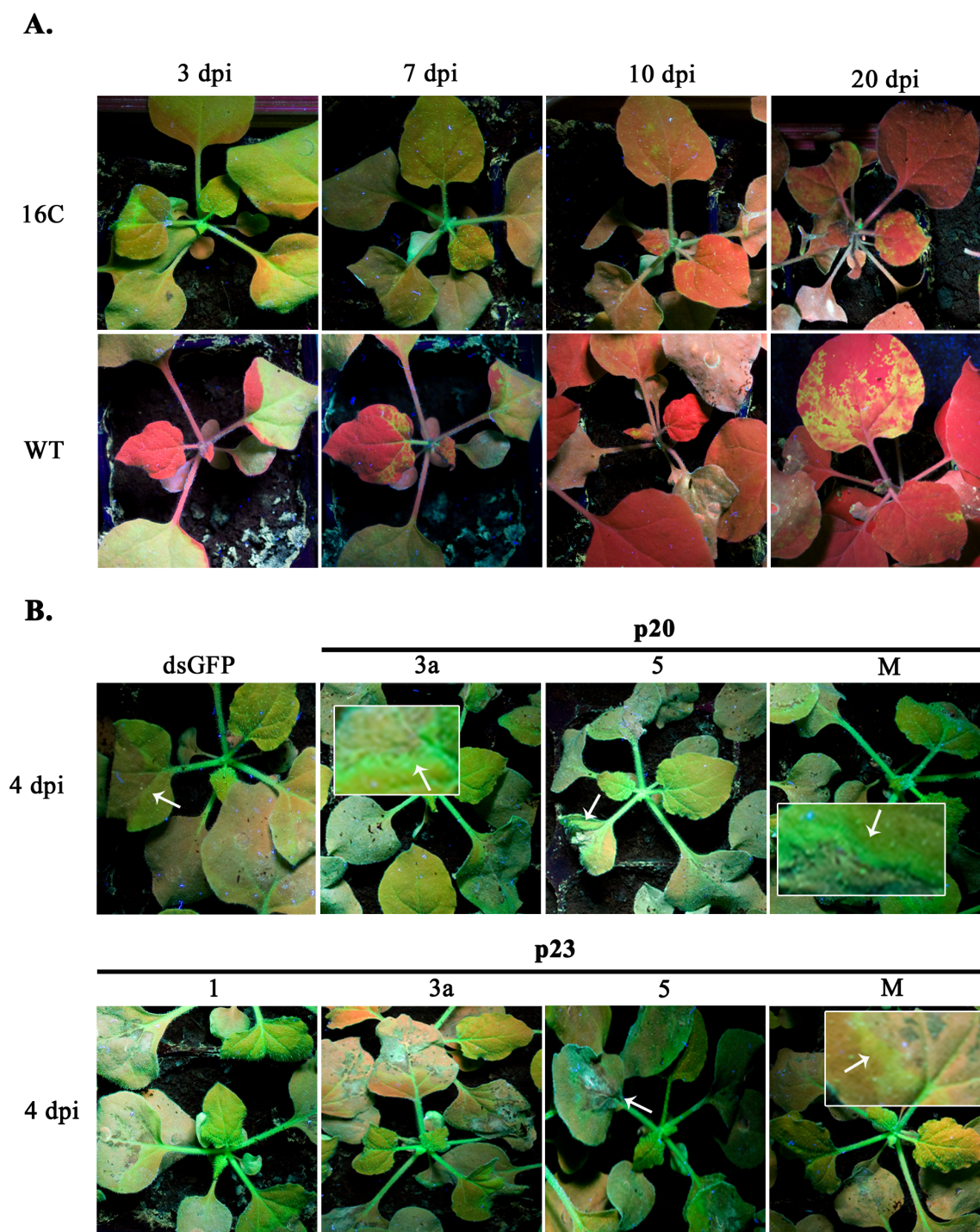
**Figura 5.2** | Resultados de confirmação das principais etapas de construção do vetor de expressão. **A.** Obtenção do vetor de entrada pDONR-Zeo-pPEBV através de digestão dupla incompleta com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NcoI* que libertam o fragmento da GFP. **B.** Confirmação dos vetores de destino por restrição enzimática com *BamHI* (que gera apenas 1 fragmento) ou através de eletroforese em gel de agarose da amplificação dos genes CP do TRV ou p23 inserido no TRV RNA2. Apenas se apresentam os resultados correspondentes a alguns grupos filogenéticos.

### 5.2.2 Observação do efeito da produção sistêmica de p20 e p23 no silenciamento

As construções TRV com as proteínas p20 e p23 do CTV foram inoculadas em plantas *N. benthamina* da linha 16C com o objetivo de estudar a atividade supressora quando produzida sistemicamente. As plantas foram observadas diretamente ou sob luz UV a partir do 2º dpi e durante aproximadamente 2 meses.

A construção TRV-GFP (descrita em 2.2.2) inoculada em plantas 16C foi usada como controlo da supressão pelo vetor TRV, nomeadamente, para avaliar o efeito dos seus próprios supressores (as proteínas 16 kDa e 29 kDa) na ausência dos supressores do CTV. Apesar de aos 3 dpi se ter observado elevada fluorescência da GFP em todas as folhas inoculadas, ao fim de 10 dias a planta encontrava-se quase totalmente vermelha sob luz UV (Figura 5.3A). Como esta construção transporta o gene GFP homólogo ao da planta 16C o silenciamento foi desencadeado, não sendo por isso, esta modalidade adequada para o controlo da disseminação do vírus na planta. Foram então inoculadas plantas WT de *N. benthamiana* com TRV-GFP. Passados 2 dias observou-se expressão de GFP nas folhas WT inoculadas e ao 4º dpi foi já possível observar manchas verdes nas folhas novas resultantes da expressão da GFP transportada pelo TRV. Esta expressão foi, contudo, transiente e ao fim de alguns dias as manchas verdes desapareceram, voltando a reaparecer nas folhas novas que iam crescendo, confirmando-se deste modo a disseminação do TRV (Figura 5.3A).

O silenciamento das plantas 16C foi induzido com um forte indutor, a construção pK-dsGFP (descrita em 2.2.1) que origina RNA de cadeia dupla (Fire *et al.*, 1998). Aos 3 dpi das plantas 16C com pK-dsGFP observou-se silenciamento local manifestado pela cor vermelha no local inoculado (Figura 5.3B – dsGFP) e ao 4º dpi o silenciamento sistémico era já perceptível nalgumas folhas. Nas plantas coinoculadas com o pK-dsGFP e as construções TRV que transportam os genes supressores p20 e p23, não se observou fluorescência verde resultante da expressão da GFP no local inoculado e apenas nalgumas folhas foi possível observar silenciamento local. Em vez disso, nas folhas inoculadas começaram a aparecer manchas cloróticas e necróticas que ao fim de poucos dias (entre 6-7 dpi) ficaram completamente necrosadas (Figura 5.3B; 5.5). Apenas algumas das folhas inoculadas com as proteínas p23 (variantes dos Gps 1, 3a e M) não necrosaram e nestas foi possível observar o rápido silenciamento do tecido inoculado. A circundar o local inoculado (silenciado ou necrosado) observou-se um anel verde intenso (Figura 5.3B).

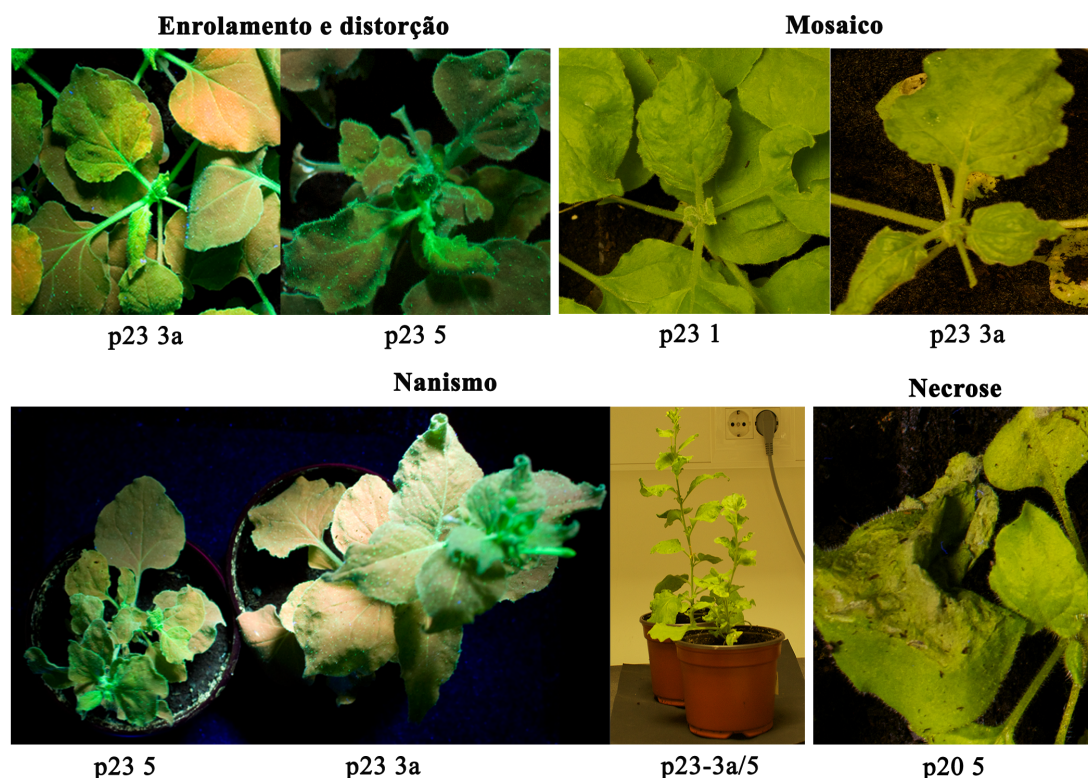


**Figura 5.3** | Observação sob luz UV do efeito das proteínas p20 e p23 expressas a partir do vetor viral TRV. **A.** Plantas WT e 16C inoculadas com a construção TRV-GFP, que foi usada como controle do TRV observadas ao 3°, 7°, 10° e 20° dpi. **B.** Plantas 16C coinfiltradas com pK-dsGFP e as construções TRV transportando os diferentes grupos filogenéticos 4 dpi. dsGFP: plantas inoculadas com o vetor indutor do silenciamento pK-dsGFP; p20 3a, 5 e M: plantas inoculadas com os isolados dos Gps 3a, 5 e M da proteína p20; p23 1, 3a, 5 e M: plantas inoculadas com os isolados dos Gps 1, 3a, 5 e M da proteína p23. As setas brancas apontam para anel verde que circunda o silenciamento local e/ou necrose foliar.



### 5.2.3 Os supressores do CTV expressos por TRV originam alterações no desenvolvimento da planta

Para além da necrose observada no local de inoculação com as construções p20 e p23, observou-se alterações no desenvolvimento das plantas semelhantes às originadas por vírus cerca de 14 dpi, nomeadamente, enrolamento, distorção e sintomas moderados de mosaico nas folhas novas que se foram acentuando com o tempo para todas as modalidades testadas (Figura 5.5). Aproximadamente um mês depois da inoculação foi também possível distinguir nanismo das plantas e menor expansão foliar comparativamente às plantas inoculadas apenas com pK-dsGFP ou com TRV-GFP (Figura 5.5) e 60 dpi os sintomas mantinham-se. Com exceção da variante do Gp 5 da proteína p23 onde foram observadas severas deformações, particularmente nanismo da planta, distorção e menor expansão foliar, os sintomas observados para todas as outras modalidades testadas foram muito semelhantes (Figura 5.5). Durante o tempo em que decorreram as experiências as plantas inoculadas com TRV-GFP que serviram de controlo do vetor TRV na presença dos supressores, não desenvolveram qualquer sintomatologia, confirmando que os sintomas observados se deveram à presença dos supressores do CTV (Figura 5.3).

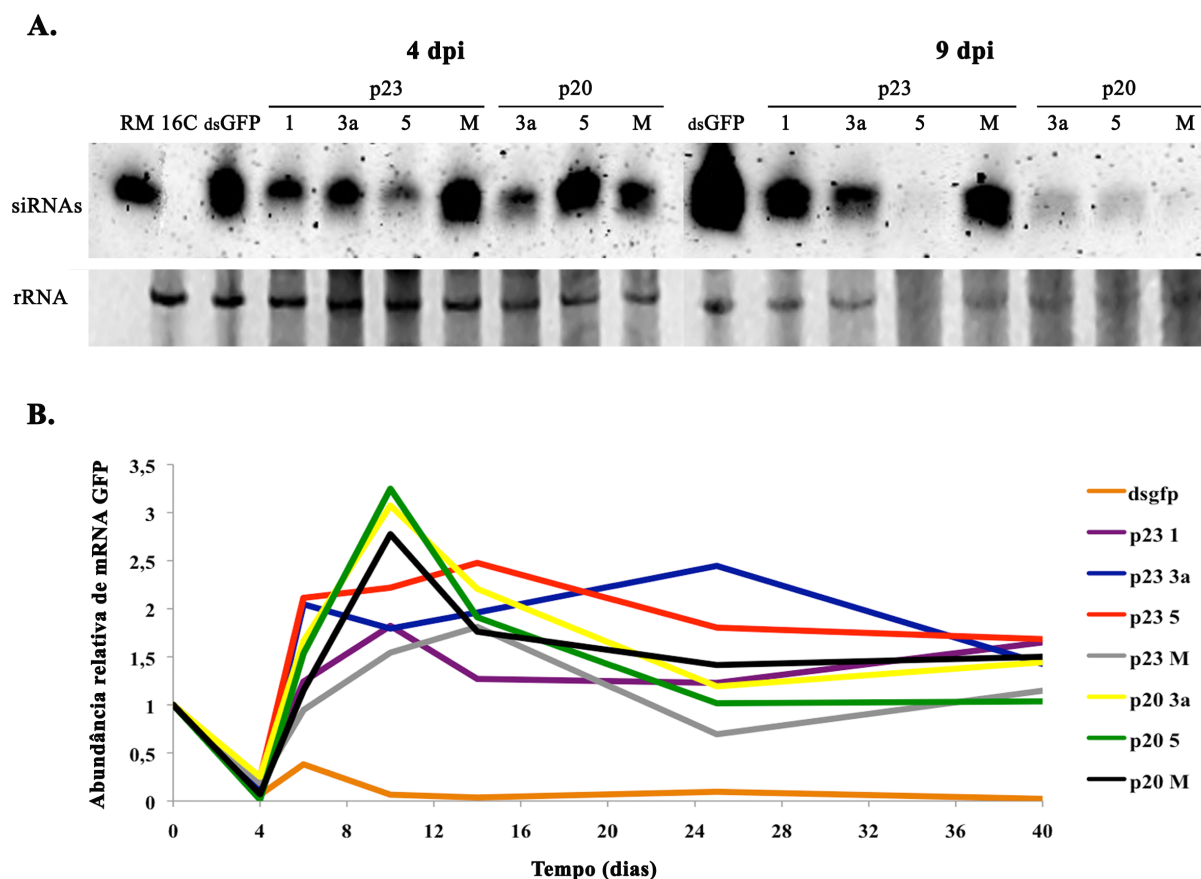


**Figura 5.5** | Efeitos fenotípicos observados nas plantas *N. benthamiana* 16C agroinoculadas com os vetores TRV transportando genes de diversas proteínas supressoras do CTV.

### 5.2.3 Efeito de p20 e p23 no silenciamento de GFP

Para verificar se o silenciamento de RNA foi ativado, foi realizado o *Northern blot* para detecção de siRNAs específicos da GFP, ao 4º e 9º dpi usando amostras de folhas inoculadas (Figura 5.6A). Como esperado, aos 4 dpi detetaram-se grandes quantidades de siRNAs nas plantas inoculadas apenas com o indutor de silenciamento pK-dsGFP. Na presença dos supressores, observou-se uma forte redução de siRNAs, em particular as classes com presumivelmente 21/22-nt, com exceção das plantas inoculadas com a proteína p23 do Gp M, onde foram detetadas todas as classes de siRNAs e em quantidades semelhantes às plantas inoculadas com pK-dsGFP. Ao 9º dia observou-se ainda uma maior acumulação de siRNAs para as plantas inoculadas com pK-dsGFP e para as plantas inoculadas com a proteína p23 do Gp 1, mas, no geral, a acumulação diminuiu (Figura 5.6A).

Para avaliar o efeito da supressão sistêmica na expressão de GFP, foram quantificados relativamente por qRT-PCR os níveis de mRNA da GFP ao longo do tempo (Figura 5.6B). Para tal, foram recolhidas amostras aos 4, 6, 10, 14, 25 e 40 dpi. As amostras de RNA do 4º dia foram obtidas a partir de folhas inoculadas, enquanto que, as amostras de RNA dos outros dias foram extraídas de folhas novas não inoculadas. As folhas de plantas 16C não inoculadas foram usadas como referência relativa. Como o esperado, nas plantas inoculadas apenas com o indutor do silenciamento pK-dsGFP os níveis do mRNA da GFP ao 4º dpi diminuíram para valores muito reduzidos. Um ligeiro aumento foi detetado ao 6º dia, mas a partir do 10º dia e até ao final do ensaio a acumulação do mRNA da GFP manteve-se muito baixa (Figura 5.6B). Na presença dos supressores do CTV e apesar de ao 4º dpi também se ter observado uma drástica redução na acumulação do mRNA da GFP, a partir do 6º dpi esta acumulação voltou a aumentar para a todas as modalidades e ao 25º dpi começou a observar-se um ligeiro decréscimo na acumulação do mRNA da GFP, aparentemente oscilando, como se pode observar aos 40 dpi para todas as modalidades testadas (Figura 5.6B). Estes resultados estão de acordo com a observação visual, uma vez que, as folhas da planta na presença do TRV com as proteínas supressoras apresentavam uma tonalidade mais esverdeada quando comparadas com as plantas 16C não inoculadas.



**Figura 5.6|** Efeito supressor das proteínas p20 e p23 expressas a partir do vetor viral TRV inoculadas em plantas *N. benthamiana* da linha 16C. **A.** Detecção de siRNAs específicos da GFP por *Northern blot* aos 4 e 9 dpi. RM: marcador de 24-nt; 16C: plantas *N. benthamiana* 16C não inoculadas; dsGFP: plantas inoculadas com pK-dsGFP; p23-1, 3a, 5 e M: plantas coinfiltradas com pK-dsGFP e as proteínas p23 de isolados dos Gps 1, 3a, 5 e M, respetivamente; p20-3a, 5 e M: plantas coinfiltradas com pK-dsGFP e as proteínas p20 de isolados dos Gps 3a, 5 e M, respetivamente. O painel inferior corresponde às bandas 5S rRNA do gel, usado como controlo da quantidade de RNA total aplicado. **B.** Análise quantitativa por qRT-PCR do mRNA da GFP no decurso do tempo nas condições descritas acima para a deteção de siRNAs. O RNA total foi extraído de folhas inoculadas aos 4 dpi e de folhas jovens superiores nos dias 6, 10, 14, 25 e 40 após a inoculação. O nível de expressão de GFP das plantas *N. benthamiana* 16C não inoculados foi utilizado como referência.

### 5.3 DISCUSSÃO

Neste trabalho pretendeu-se caracterizar a capacidade de supressão sistémica e, para tal, as proteínas p20 e p23 foram expressas usando o vetor TRV e a infeção sistémica monitorizada a partir do 2º até 60º dpi. Embora o TRV nem sempre produza sintomas, ligeiros sintomas podem, no entanto, verificar-se (Ratcliff *et al.*, 2001; Unver and Budak, 2009). Neste ensaio, para controlo do TRV utilizou-se a construção TRV-GFP e, no decorrer do ensaio não se desenvolveram quaisquer sintomas nas plantas devido à presença do TRV, nem o típico enrolamento das folhas. Sabendo que a expressão de supressores do silenciamento a partir de vírus heterólogos aumenta a severidade dos sintomas virais (Brigneti *et al.*, 1998; Canizares *et al.*, 2008; Amin, 2009), podemos concluir que os sintomas observados nas plantas se deveram à ação dos supressores do CTV que aumentaram a severidade dos sintomas de um vírus não relacionado. Todas as variantes das proteínas do CTV testadas provocaram lesões necróticas severas nas folhas inoculadas, nanismo da planta, sintomas moderados de mosaico, distorção e enrolamento das folhas novas que emergiam (Figura 5.5) e, passados 60 dpi a planta continuou a manifestar sintomas da presença da infeção viral. Os sintomas virais mais severos foram observados na modalidade p23 do Gp 5. Este grupo foi também anteriormente descrito (Costa *et al.*, 2014) como sendo o grupo com maior eficiência na supressão local e o único capaz de suprimir quer o silenciamento local como sistémico em ensaios transientes. Os isolados do grupo 5 estão associados a sintomas severos, contudo, já foram identificados isolados suaves (Hančević *et al.*, 2013; Nolasco *et al.*, 2009) e comportamentos diferentes entre isolados do Gp 5 na acumulação de aglomerados de células infetadas por CTV na zona do floema (Silva, 2011). Isto pode indicar que a estirpe utilizada poderá ser uma variante severa e que estes resultados podem não ser comuns a todo o grupo. O facto de ter sido o supressor mais severo, quer a nível local como sistémico, não significa contudo, que nas plantas hospedeiras tenha o mesmo comportamento, uma vez que, estes ensaios não refletem a expressão natural durante a infeção viral. Por exemplo, a presença de RNAs defeituosos leva ao aumento de siRNAs virais que vão saturar os supressores, permitindo que seja induzido o silenciamento antiviral levando à atenuação dos sintomas virais (Wang *et al.*, 2012).

A observação dos sintomas necróticos no local da inoculação e dos sintomas moderados de mosaico nas plantas deve estar relacionados com o aumento da acumulação do título viral (Wang *et al.*, 2012) ou com a desregulação dos supressores virais 16-kDa e 29-kDa do TRV (Deng *et al.*, 2013), promovida pelos supressores do CTV. Por exemplo Deleris *et al.* (2006)

observaram que a infecção com TRV de plantas com as DCL2-DCL4 inativadas levaram ao aumento dos níveis de RNA viral e isto conduziu ao aumento dos sintomas da doença. Neste caso, não mutamos ou removemos as DCLs, mas provavelmente a sua inativação foi promovida pelos supressores do CTV. Além disso, o facto da proteína 16-kDa permitir a invasão dos meristemas pelo TRV (Martin-Hernandez and Baulcombe, 2008), a presença de supressores virais pode levar à sua desregulação permitindo a acumulação de níveis mais elevados do vírus nestas células levando ao aumento da severidade dos sintomas nas plantas, tal como foi demonstrado anteriormente para o supressor TGBp1 do *Potexvirus* (Foster *et al.*, 2002). Por sua vez, as restantes alterações fenotípicas observadas que afetaram o desenvolvimento normal da planta devem estar associados com os diferentes níveis de expressão e acumulação dos supressores do CTV (Siddiqui *et al.*, 2008a; Wang *et al.*, 2012). Em concordância, Fagoaga *et al.* (2005) observaram que o principal fator que determinou o aparecimento de sintomas virais em citrinos relacionou-se com acumulação da proteína p23, independentemente da origem da estirpe. Contudo, em *N. benthamiana* transgénica (p23) não detetaram sintomas e concluíram que a p23 só interfere com o desenvolvimento da planta apenas em citrinos. Este ensaio, todavia, foi de expressão transiente, ou seja, não reflete a capacidade dos supressores quando expressos por vetores heterólogos em *N. benthamiana* (Brigneti *et al.*, 1998; Hamilton *et al.*, 2002; Siddiqui *et al.*, 2008a; Siddiqui *et al.*, 2008b). Usando o vetor viral *Potato virus X* (PVX) para expressar a proteína p23, foram obtidos resultados semelhantes aos deste trabalho por outros investigadores. Nesses ensaios o aumento da patogenicidade do vírus levou inclusivamente à morte das plantas de *N. benthamiana* ao fim de alguns dias após a inoculação (Amin, 2009; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Pelo facto de serem partilhados muitos passos comuns entre as vias siRNA e miRNA, vários supressores do silenciamento perturbam o desenvolvimento normal da planta ao interferirem com regulação de mRNAs específicos do hospedeiro que são dependentes da via miRNA (Chapman *et al.*, 1992; Kasschau *et al.*, 2003; Ratcliff *et al.*, 2001). Uma série de modificações na regulação normal da expressão génica foi observada na presença de supressores virais do silenciamento em plantas transgénicas (Chapman *et al.*, 2004; Lewsey *et al.*, 2007; Siddiqui *et al.*, 2008a), como é o caso do supressor HcPro codificado pelo *Potato virus Y* (PVY) que levou à severa distorção das folhas e moderado nanismo das plantas (Siddiqui *et al.*, 2008a). Por exemplo, a desregulação do miRNA 168 observado para o supressor p19 do tombusvirus resultou num distúrbio da expressão génica que levou ao desenvolvimento de sintomas (Burgyan and Havelda, 2011). Do mesmo modo, um ou ambos

supressores do CTV aqui testados também poderão desregular este miRNA, pois está descrito que o CTV influencia a sua acumulação (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011).

Neste ensaio o silenciamento foi induzido por um forte indutor do silenciamento (pK-dsGFP) o que seria de prever uma resposta rápida da planta na ativação do PTGS que, foi confirmada pela elevada acumulação de todas as classes de siRNAs nas plantas inoculadas com a pK-dsGFP. Na presença das proteínas p20 e p23 ensaiadas, com a exceção da p23 do Gp M a acumulação de siRNAs de 21/22-nt foi afetada, mas não a de 24-nt. Uma acumulação semelhante de siRNAs foi observada anteriormente com o supressor p38 do *Turnip crinkle virus* (TCV) em plantas com ambas as DCL2 e DCL4 mutadas (Deleris *et al.*, 2006). Do mesmo modo, as proteínas p20 e p23 podem também estar a interferir com a atividade das DCL2 e DCL4 bloqueando a sua atividade e levando à supressão da acumulação de siRNAs com 21/22 nt. A presença de siRNAs com 24-nt, por sua vez, poderá resultar da ativação da DCL3 citoplasmática (Xie *et al.*, 2004) e, tal como foi observado anteriormente, esta acumulação não limitou a infeção viral (Aliyari and Ding, 2009; Deleris *et al.*, 2006). A presença destes siRNAs, podem também ser resultado do TGS que ocorre no núcleo (Daxinger *et al.*, 2009; Hamilton *et al.*, 2002). O facto da proteína p23 acumular-se nos corpúsculos de Cajal (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013), bem como nestes também se localizarem os efetores do TGS a RDR2, a AGO4 e DCL3 (Hohn and Vazquez, 2011; Pontes and Pikaard, 2008), pode justificar a presença de siRNAs de 24-nt para o isolado do Gp M da p23, uma vez que, não se observou supressão das classes de siRNAs com 21/22-nt, e desta forma, não seria ativada a DCL3 citoplasmática. Ainda que os supressores não tenham conseguido impedir o silenciamento local conseguiram, no entanto, conter o silenciamento célula a célula, revelado pela presença de um anel verde com maior fluorescência do que os tecidos circundantes. Há assim um aumento da expressão de GFP relativamente ao nível basal das plantas 16C. Isto deve-se provavelmente ao facto do vírus se mover mais rapidamente do que o sinal de silenciamento (Baulcombe, 1999), que poderá também estar relacionado com a capacidade do TRV em invadir as células meristemáticas (Martin-Hernandez and Baulcombe, 2008).

Comparando este ensaio com ensaios anteriores de expressão transiente (Costa *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2012), observam-se algumas diferenças não só visualmente, como a nível molecular. Contudo, para ambas as metodologias observou-se a supressão do silenciamento local através da diminuição da acumulação de siRNAs da GFP e aumento da acumulação de mRNA da GFP. O facto de para ambas as metodologias haver supressão da acumulação de siRNAs com 21-22-nt, fortalece o envolvimento dos supressores do CTV na

possível inibição do PTGS ao nível da DCL2 e DCL4. As diferenças observadas nos ensaios poderão estar relacionadas com a maior capacidade de expressão do vetor viral, produzindo quantidades suficientes de supressor capazes de inativar todas as DCL2 e DCL4 e, desta forma, ativar a DCL3 citoplasmática. Nos ensaios de expressão transiente, as DCL2 e DCL4 não são completamente bloqueadas, o que é revelado pela presença de siRNAs com 21/22-nt e ausência de siRNAs com 24-nt. A sua presença ao fim de 6 dpi, sugere que os siRNAs com 24-nt sejam resultado da ativação do TGS ao nível do núcleo.

Tal como o descrito para outros supressores (Jiang *et al.*, 2012), também os supressores do CTV utilizarão possivelmente múltiplos mecanismos para suprimir o silenciamento, o que permite explicar, que o isolado do Gp M da proteína p23 apesar de não ser capaz bloquear o silenciamento local da planta (revelado pela acumulação de siRNAs semelhante ao indutor de silenciamento) conseguiu, no entanto, suprimir o silenciamento quando expresso sistemicamente. Esta capacidade supressora inferior revelada pelo Gp M poderá estar relacionada com o facto de ser um isolado suave e corrobora os resultados obtidos anteriormente na supressão local do silenciamento (Costa *et al.*, 2014).

A observação das plantas (Figura 5.3), bem como, a quantificação de mRNA da GFP (Figura 5.6) revelam que as proteínas p20 e p23 têm capacidades semelhantes para suprimir o silenciamento sistémico quando expressas no vetor TRV. A diminuição acentuada de mRNA da GFP aos 4 dpi para todas as modalidades testadas resultou provavelmente do silenciamento de RNA iniciado pela planta, mas também da necrose foliar observada no local de inoculação. Já o aumento da acumulação de mRNA da GFP verificado nos dias seguintes foi possivelmente resultado da supressão do silenciamento pelos supressores do CTV que já estariam a ser expressos. Foram notadas diferenças na expressão da GFP mas ao fim de algum tempo todas as modalidades testadas tenderam para valores semelhantes. Estes resultados diferem dos anteriormente obtidos na supressão local do silenciamento, uma vez que, localmente foi possível observar diferentes capacidades supressoras (Costa *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2012).

---

# Capítulo

# 6

---

**AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE SILENCIAMENTO POR PLANTAS E  
ENXERTOS TRANSGÊNICOS (RESULTADOS PRELIMINARES)**

## 6.1 INTRODUÇÃO

Várias metodologias têm vindo a ser desenvolvidas para o controlo de vírus de plantas. É aceite na generalidade que o silenciamento de RNA está associado com a resistência ou suscetibilidade dos hospedeiros à infeção viral e os avanços no conhecimento dos passos desta via (Alvarado and Scholthof, 2009; Burgyan and Havelda, 2011; Li and Ding, 2006; Voinnet, 2001; Wang *et al.*, 2012), permitiram avaliar novas possibilidades no controlo viral. Recentemente tem-se avaliado a possibilidade da aplicação exógena de dsRNA via pulverização ou bombardeamento no controlo de vírus mecanicamente transmissíveis a plantas herbáceas (por exemplo: Ação FA0806 do Programa COST). Esta estratégia teria, contudo, várias limitações e seria de difícil aplicabilidade a um pomar já instalado devido quer ao custo elevado da produção de uma quantidade suficiente de dsRNA necessário para cobrir a copa de árvores adultas, como a necessidade de repetir o tratamento várias vezes durante a vida do pomar e, também, devido aos riscos ambientais desconhecidos da libertação na atmosfera de elevadas quantidades de dsRNA, ou ainda, a eventual ineficácia contra vírus restritos ao floema. Outra alternativa seria o fornecimento do sinal de silenciamento através de porta-enxertos transgênicos virais (Gal-On *et al.*, 2008), ou de outras partes enxertadas (projeto financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, PTDC/AGR-GPL/099512/2008). Este método seria interessante pelo facto do produto agrícola consumido ser produzido numa parte da planta que não é geneticamente modificada e, no caso de plantas lenhosas, poder ser aplicado a pomares já existentes pelos próprios agricultores. É também flexível, isto é, poderia ser aplicado apenas quando o risco se apresenta e poderia ser removido ou substituído por outro tecido protetor se as condições mudassem, para além de que, o tecido protetor poderia ser desenvolvido para toda uma cultura, ou seja, não seria necessário transformar várias variedades, bastaria que existisse compatibilidade de enxertia.

No caso do CTV têm sido desenvolvidas diversas aproximações baseadas em PTGS (Asins *et al.*, 2004; Fagoaga *et al.*, 2006; Febres *et al.*, 2003; Lee and Keremane, 2013; Lopez *et al.*, 2010; Albiach-Marti, 2012; Roy *et al.*, 2006), nomeadamente, estratégias envolvendo o uso de plantas transgênicas de citrinos que expressam diferentes segmentos de genes (Febres *et al.*, 2008), ou que levam à formação de dsRNA (Batuman *et al.*, 2006), contudo, falharam em providenciar resistência duradoura ao CTV. Por outro lado o uso de plantas transgênicas não é desejado em muitos países. Roy *et al.* (2006) avaliaram a resistência de plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana* contendo sequências quiméricas dos supressores CTV, quando

infetadas com o vetor PVX que transportava as mesmas sequências ou sequências heterólogas, contudo, e apesar de se ter observado resistência, esta também não foi completa. Uma vez que, a resistência/suscetibilidade celular é determinada no início da infecção, o alvo a tentar silenciar deverá, portanto, ser uma das proteínas que atua no início da infecção. Um alvo possível seria a proteína p23. Esta proteína é expressa em abundância, correspondendo ao segundo RNA subgenômico mais abundante nas plantas de citrinos infetadas (Hilf *et al.*, 1995). Em *N. benthamiana* e protoplastos de laranja de umbigo acumula-se primeiro que os demais RNAs subgenômicos, sendo a proteína mais abundante no início da infecção e a segunda mais abundante nos estádios mais tardios em (Navas-Castillo *et al.*, 1997). Esta proteína é no entanto, também um supressor de silenciamento (Lu *et al.*, 2004), por isso, é colocada a questão, será possível silenciar o supressor?

Neste trabalho foram utilizadas duas estratégias para estudar esta possibilidade. Na primeira empregaram-se plantas *N. benthamiana* transgênicas da linha p23 que expressam constitutivamente o gene da p23. Na segunda explorou-se a enxertia, como referido atrás, para fornecimento de sinal de silenciamento; para tal, foram enxertadas plantas WT *N. benthamiana* em plantas transgênicas *N. benthamiana* que formam dsRNA da p23, a linha dsp23. Em ambas as estratégias, para garantir o silenciamento de toda a planta, o sinal de silenciamento sistêmico foi gerado através da infiltração de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor binário que expressa um forte indutor do silenciamento, uma construção que forma dsRNA com a sequência homóloga ao transgene p23 presente nas plantas transgênicas (pK-dsp23). Até à bem pouco tempo a gama de hospedeiros do CTV estava descrita como maioritariamente restrita às plantas *Rutaceous* (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Recentemente foi desenvolvido um sistema que permite a infecção de CTV nas plantas de *N. benthamiana* observando-se não só infecção sistêmica como acumulação de viriões de CTV, ainda que, para que a infecção tenha sucesso seja necessário a coinoculação com supressores do silenciamento (Ambros *et al.*, 2011; Ambros *et al.*, 2013). O uso de *N. benthamiana* oferece vários benefícios, é mais fácil de manipular e de analisar a descendência transgênica, bem como, pode ser dissecada mais rapidamente as interações entre o CTV e o hospedeiro. Contudo, esta aproximação necessitaria de um clone infeccioso de CTV, indisponível. Assim, para testar aquelas estratégias utilizou-se o vetor viral TRV com uma construção que expressa a sequência p23 homóloga ao transgene p23 presente nas plantas transgênicas. Diversos problemas ocorridos durante o desenrolar dos ensaios levaram a que os resultados obtidos devam ser encarados como preliminares.

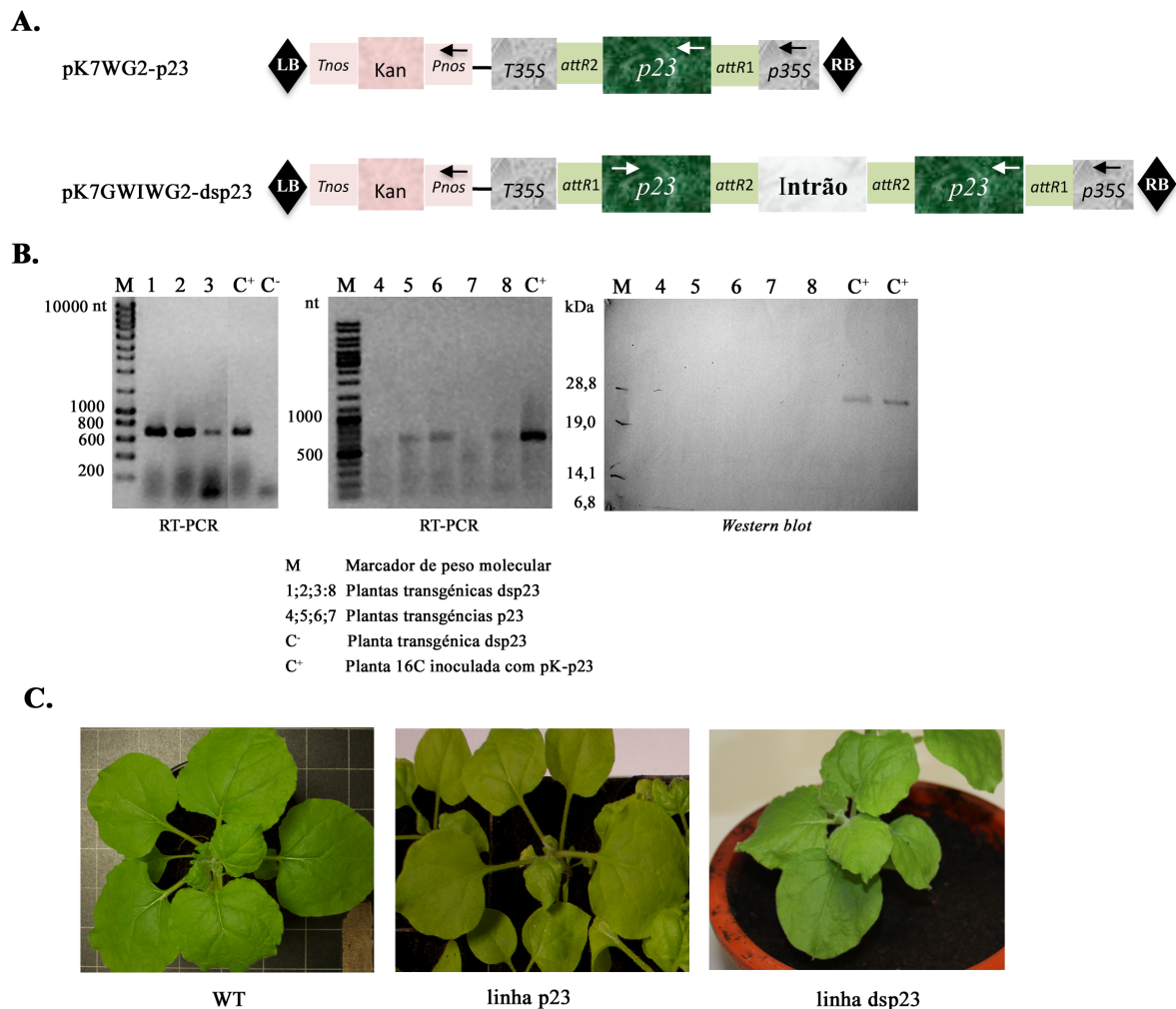
## 6.2 RESULTADOS

### 6.2.1 Geração de plantas *N. benthamiana* transgênicas

A avaliação da capacidade para silenciar a proteína p23 em *N. benthamiana* foi feita com recurso a duas linhas de plantas transgênicas: a linha p23 e a linha dsp23 criadas em laboratório (Figura 6.1). A transformação genética estável das plantas *N. benthamiana* descrita no subcapítulo 2.3.2 foi levada a cabo utilizando *A. tumefaciens* contendo vetores binários que expressam um fragmento de 630-nt que codifica a p23 do grupo 3a, nomeadamente, o isolado 11.5 (Figura 2.4). O vetor pK7WG2-p23 codifica a p23 no sentido sense e deu origem à linha transgênica p23. O vetor pK7GWIWG2-dsp23 vai originar uma molécula de dsRNA da p23, sendo esta linha designada de dsp23 (Figura 6.1A). A confirmação da expressão da p23 foi feita por RT-PCR para ambas as linhas transgênicas (Figura 6.1B), tendo sido as amostras de RNA das plantas transgênicas p23 previamente tratadas com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA. Para além da confirmação por RT-PCR, as plantas transgênicas da linha p23 que foram confirmadas por RT-PCR (plantas 4, 5, 6 e 7) foram também confirmadas por *Western blot*. Apenas foram observadas bandas muito ténues para as plantas 5 e 6 por ambas as metodologias. Contudo, na imagem capturada da membrana obtida na deteção da proteína (Figura 6.1B) não se conseguem observar as bandas pelo facto do sinal ter sido muito fraco e a foto não ter sido tirada imediatamente após a deteção. As bandas que se observam correspondem aos controlos positivos utilizados, amostras de proteínas extraídas de folhas de plantas *N. benthamiana* 16C inoculadas com a construção pK7WG2-p23 do Gp 3a. As bandas parecem ficar ligeiramente acima do esperado, isto é, dos 23 kDa. Provavelmente, esta discrepância deve-se à incorreta marcação inicial (a lápis) das bandas correspondentes ao marcador após a transferência para a membrana. Os registos efetuados são favoráveis à confirmação positiva das plantas transgênicas, contudo, devido a estas dificuldades encontradas estes resultados devem ser considerados preliminares e carecem confirmação.

Em nenhuma das duas linhas transgênicas de *N. benthamiana* obtidas se observou alteração do fenótipo quando comparado com as plantas WT (Figura 6.1C). No caso da linha p23 foi utilizada a geração F1 para efetuar os ensaios. Para as enxertias utilizaram-se as plantas da geração mãe da linha dsp23 que por análise por RT-PCR apresentavam bandas intensas.

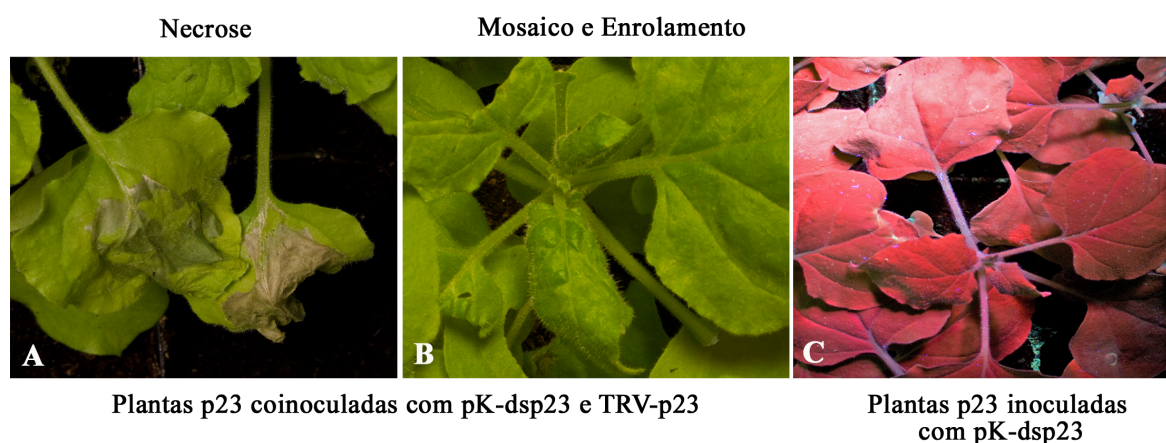
Foram feitas 16 enxertias, contudo, após 6 semanas, apenas em duas delas o enxerto se desenvolveu de forma a poder executar-se as experiências.



**Figura 6.1** | Obtenção das plantas transgênicas de *N. benthamiana*. **A.** Diagrama parcial dos vetores binários pK7WG2-p23 e pK7GWIWG2-dsp23 usados para expressar a proteína p23 e o dsRNA da p23, respectivamente. **B.** Confirmação das plantas transgênicas *N. benthamiana* por eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de cDNAs para o gene p23 (630-nt) e análise por *Western blot* das plantas transgênicas da linha p23. **C.** Imagens das plantas *N. benthamiana*. WT: planta WT; linha p23: linha transgênica que expressa constitutivamente proteína p23; linha dsp23: linha transgênica que expressa o dsRNA da p23.

### 6.2.2 Avaliação da possibilidade de silenciamento do supressor p23 em plantas *N. benthamiana* transgênicas p23

Nesta estratégia usou-se o vetor viral TRV para expressar sistemicamente a p23 em plantas *N. benthamiana* transgênicas da linha p23. O silenciamento da p23 foi induzido através da inoculação das plantas com a construção pK7GWIWG2-dsp23 (pK-dsp23) representada esquematicamente na Figura 6.1A e as plantas p23 que foram inoculadas apenas com esta construção foram usadas como controlo negativo. Para avaliar a possibilidade de silenciamento da p23 expressa a partir do vetor viral, fez-se a coinoculação em simultâneo do indutor de silenciamento pK-dsp23 com o vetor viral TRV-p23 (o isolado do Gp 3a) descrito anteriormente no Capítulo 5. Nos primeiros dpi não foram observadas diferenças morfológicas em comparação com as plantas controlo inoculadas apenas com o indutor de silenciamento pK-dsp23. Contudo, 4-5 dpi nas plantas inoculadas com TRV2-p23 observaram-se lesões necróticas no local da inoculação e aos 15 dpi começaram a ser perceptíveis sintomas de mosaico e enrolamento nas folhas novas semelhantes aos descritos anteriormente no Capítulo 5 (Figura 6.2).

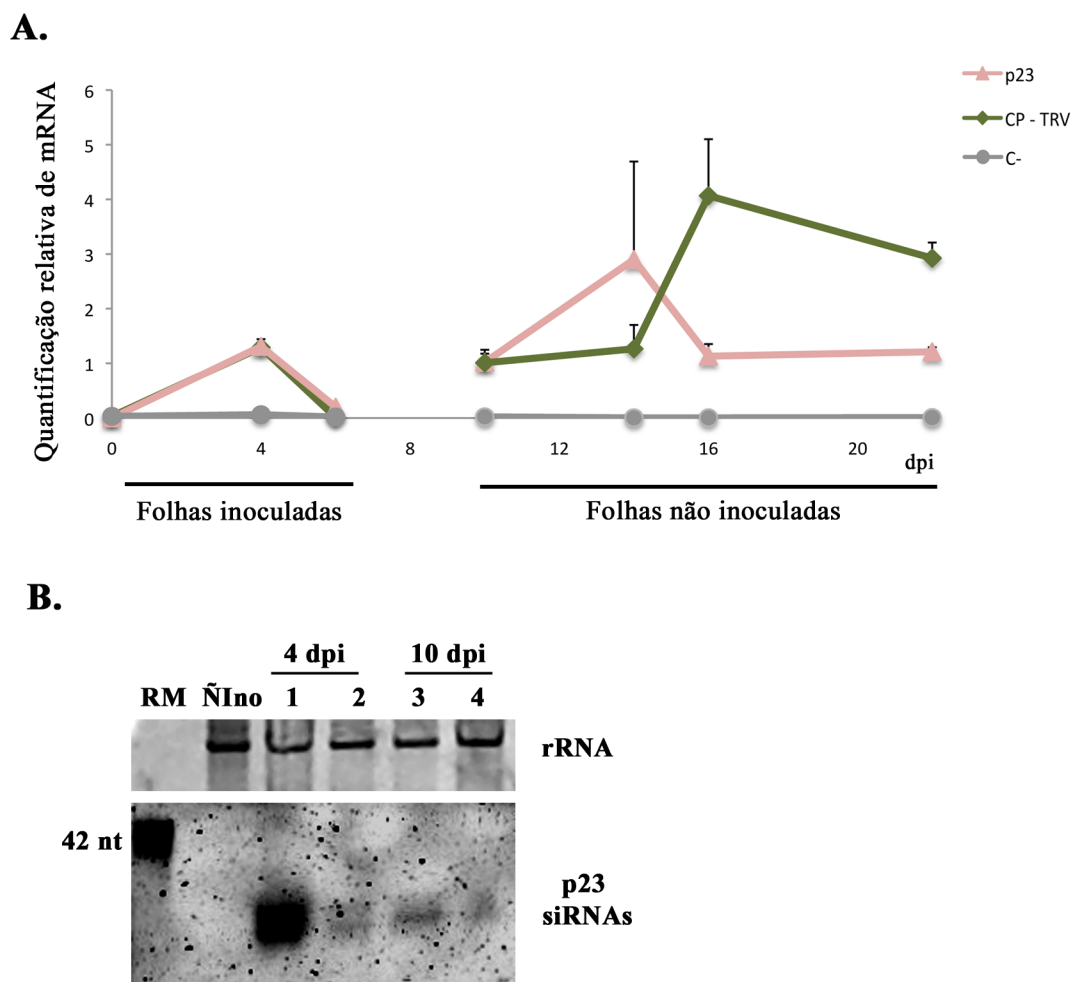


**Figura 6.2** | Sintomas da doença viral nas plantas *N. benthamiana* transgênicas da linha p23 coinoculadas com o indutor de silenciamento pK-dsp23 e o vetor viral TRV-p23 observadas à luz visível. **A.** Observação de lesões necróticas no local de inoculação aos 6 dpi. **B.** sintomas moderados de mosaico e enrolamento nas folhas novas aos 20 dpi. **C.** Plantas transgênicas p23 usadas como controlo inoculadas apenas com o indutor de silenciamento pK-dsp23, observadas aos 8 dpi sob luz UV (por lapso estas plantas não foram fotografadas à luz visível).

Para analisar a suscetibilidade ou resistência das plantas à infecção com o vetor viral TRV-p23 fez-se a quantificação relativa dos níveis do mRNA da p23 e dos níveis de mRNA da CP do TRV por qRT-PCR. As amostras foram obtidas aos 4, 6, 10, 14, 16 e 22 dpi. Exceto para amostras dos dias 4 e 6 que tiveram origem em tecidos inoculados, as amostras correspondentes aos outros dias foram obtidas a partir de folhas novas. Para controlo do vetor TRV, foram inoculadas plantas WT apenas com o vetor viral TRV-p23, contudo, as plantas morreram no decurso do ensaio por motivos alheios a este. Desta forma, para ambos os genes da p23 e da CP, foi utilizado como nível de referência (expressão relativa igual a 1) o respetivo nível de expressão obtido ao 10º dia nas folhas das plantas coinoculadas com pK-dsp23 e o vetor TRV-p23. As plantas inoculadas com o indutor de silenciamento pK-dsp23 foram usadas como controlo negativo, sendo a p23 praticamente indetetável. Os níveis basais da p23 nas plantas transgênicas não inoculadas revelaram um valor de expressão muito baixo de 0,03 e refletem os resultados anteriores obtidos na confirmação das plantas por *Western blot* e RT-PCR (Figura 6.1B). Por sua vez, nas plantas coinoculadas com os vetores pK-dsp23 e o TRV2-p23 observou-se que quer o vírus quer a proteína p23 acumularam-se a níveis elevados (Figura 6.3A). Os sintomas observados nas plantas inoculadas com TRV-p23 (Figura 6.2) mostram uma boa relação com os resultados qRT-PCR (Figura 6.3A). Aos 4 dpi observa-se uma elevada acumulação quer do vírus quer da p23, contudo, ao 6º dpi deixaram praticamente de ser detetados o que se poderá relacionar com a necrose foliar observada no local da inoculação (local de onde foi extraída a amostra analisada) (Figura 6.2). Contudo, nas folhas novas, a partir do 10º dpi, voltou a detetar-se elevadas quantidades de mRNA da CP do TRV e da p23, confirmando que o vírus se espalhou pela planta, atingindo um pico máximo de acumulação ao 16º dpi para a CP do TRV e ao 14º dpi para a p23; nesta altura sintomas da presença do vírus também já eram visíveis nas folhas novas (Figura 6.2).

Para verificar se o silenciamento de RNA foi ativado, foi realizado o *Northern blot* para deteção de siRNAs específicos da p23 a partir de RNA total extraído ao 4º dpi de folhas inoculadas e ao 10º dpi de folhas não inoculadas (Figura 6.3B). Não foram detetados siRNAs nas plantas transgênicas p23 não inoculadas. Nas plantas inoculadas com o indutor de silenciamento pK-dsp23 observou-se uma elevada acumulação de siRNAs aos 4 dpi, tendo contudo, esta acumulação diminuído drasticamente ao 10º dpi (Figura 6.3B – linha 1 e 3). Esta fraca acumulação observada deve-se possivelmente, ao facto do RNA ter sido extraído de folhas não inoculadas, onde o silenciamento sistémico ainda não estava completamente estabelecido. Por sua vez, a coinfiltração de pK-dsp23 com TRV-p23 resultou numa forte

supressão da acumulação de siRNAs (Figura 6.3B – linha 2 e 4), o que poderá estar relacionado com a capacidade supressora da p23 quando transportada pelo TRV, mas também pode estar relacionado com o facto das plantas transgênicas p23 estarem a expressar o mRNA e/ou a proteína p23 em muito baixa quantidade.

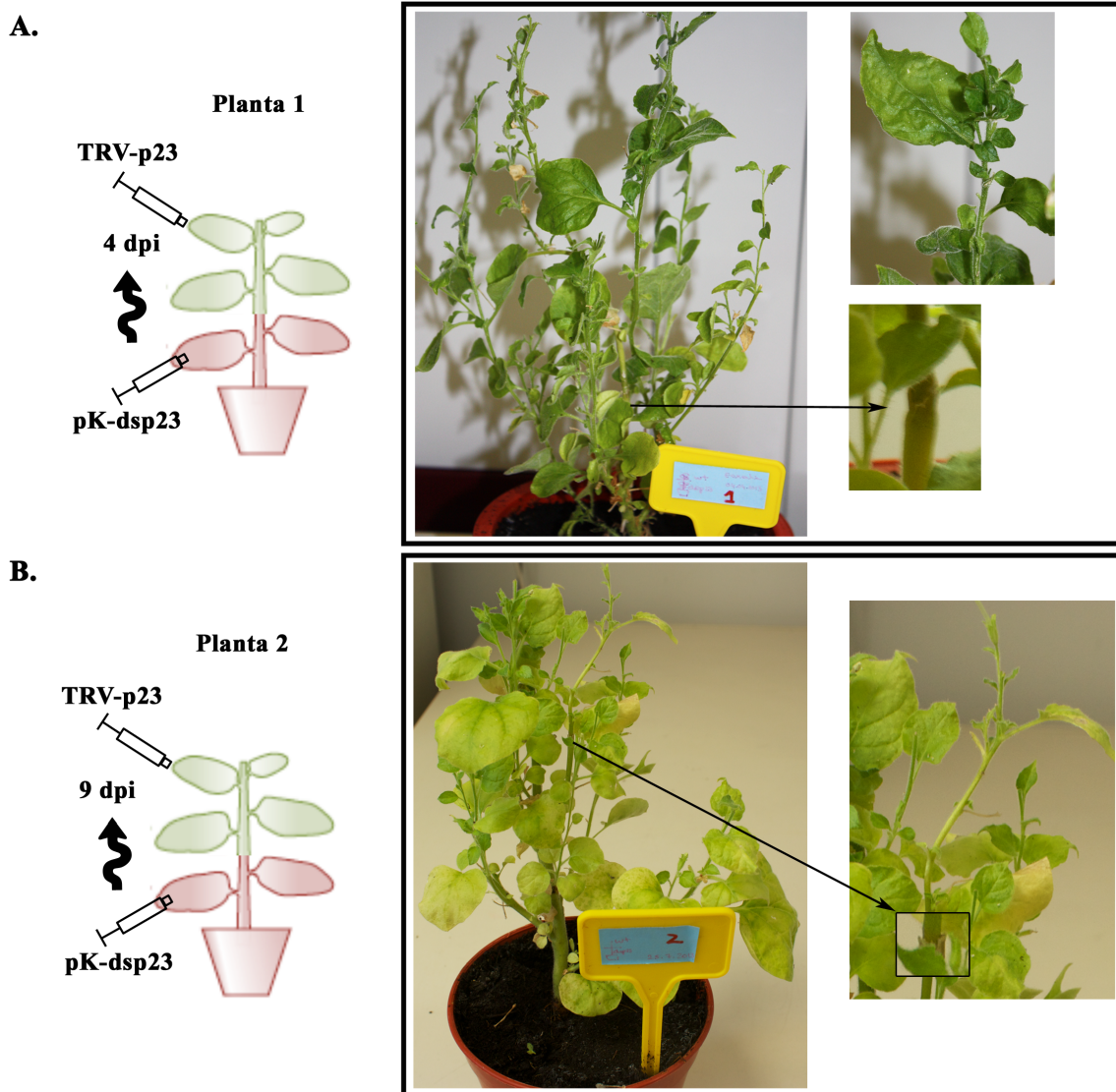


**Figura 6.3|** Supressão do silenciamento nas plantas *N. benthamiana* transgênicas da linha p23 coinfiltradas com pK-dsp23 e o vetor viral TRV-p23. **A.** Quantificação relativa de mRNA por qRT-PCR de amostras obtidas nos dias 0, 4, 6, 10, 14, 16 e 22 após a inoculação. As amostras dos dias 4 e 6 tiveram origem em tecidos inoculados e as restantes foram obtidas a partir de folhas novas. Os níveis de expressão da p23 e CP obtidos ao 10º dpi das plantas coinfiltradas com pK-dsp23 e TRV-p23 foram utilizados como referência. p23: níveis do mRNA da p23; CP-TRV: níveis do mRNA da CP do vetor TRV; C-: níveis do mRNA da p23 nas plantas inoculadas apenas com o indutor de silenciamento pK-dsp23. **B.** Detecção por *Northern blot* de siRNAs específicos da p23 ao 4º e 10º dpi. RM: Marcador molecular específico da p23. Ñ Ino: plantas p23 não inoculadas. 1 e 3: plantas inoculadas com o indutor de silenciamento pK-dsp23. 2 e 4: plantas coinoculadas com pK-dsp23 e TRV-p23. rRNA: bandas 5S rRNA usadas como controlo da quantidade de RNA total aplicado.

### **6.2.3 Avaliação da possibilidade de silenciamento do supressor p23 por um enxerto transgênico**

Foram geradas duas plantas enxertadas denominadas de Planta 1 e a Planta 2, em que a linha transgênica dsp23 foi usada como porta-enxerto e a planta WT *N. benthamiana* como enxerto (Figura 6.4). Pretendia-se que o sinal de silenciamento da p23 gerado no porta-enxertos passasse para a porção enxertada e imunizasse essa zona da planta contra a p23. Para assegurar que o silenciamento de RNA estivesse ativo promoveu-se o silenciamento através da inoculação no porta-enxerto com indutor de silenciamento pK-dsp23 (Figura 6.4). Passados 4 dias inoculou-se a Planta 1 com o vetor viral TRV-p23 (isolado 11.5 homólogo ao transgene inserido na planta transgênica) na parte superior enxertada. A Planta 2 foi inoculada do mesmo modo, mas ao 9º dpi do porta-enxerto com pK-dsp23. O curso da infecção e as análises efetuadas foram seguidas durante aproximadamente 3 meses. As folhas de *N. benthamiana* foram examinadas antes da inoculação, após a inoculação com o indutor de silenciamento pK-dsp23 e após a inoculação com o vetor TRV-p23.

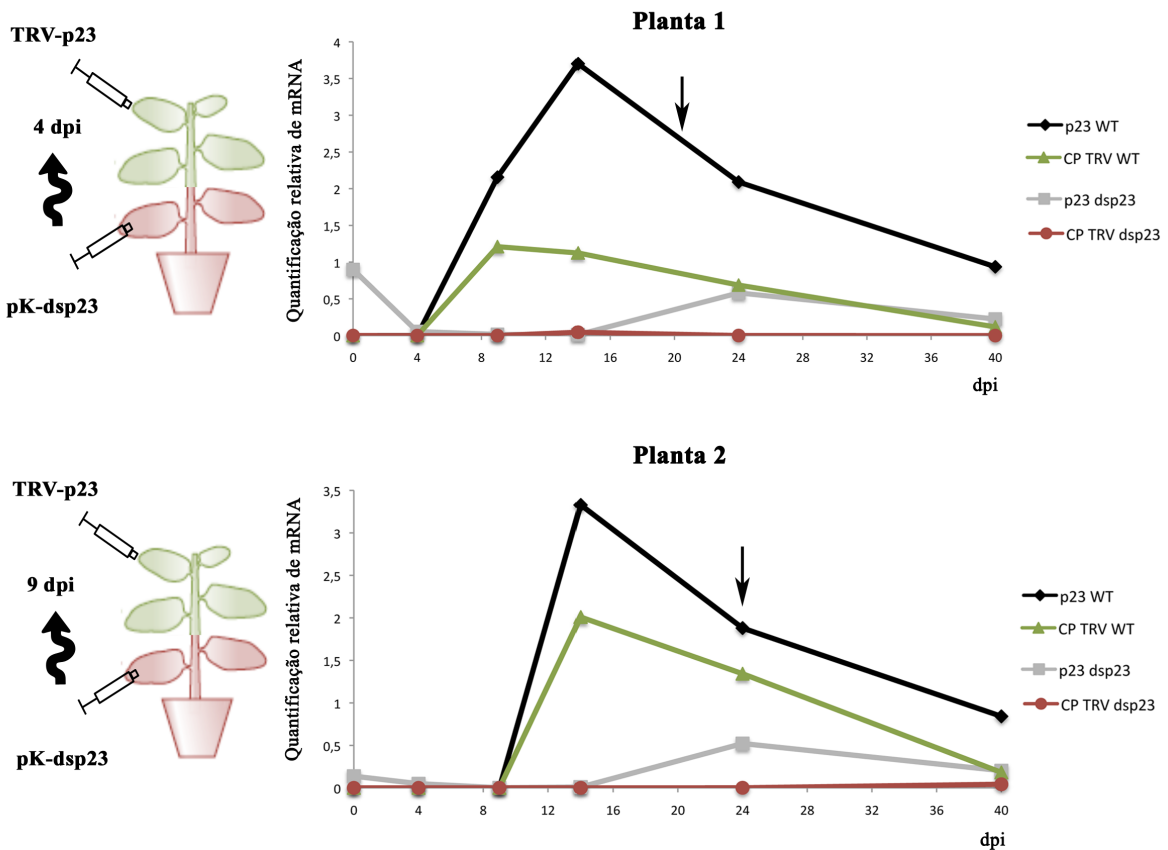
Tal como o observado anteriormente, após a inoculação do vetor TRV-p23, observaram-se lesões necróticas no local da inoculação e aos 6 dpi (em relação à inoculação com o vírus) o tecido ficou necrosado, bem como, aos 15 dpi (em relação à inoculação com o vírus) os sintomas observados nas folhas novas da zona da planta enxertada foram semelhantes aos descritos anteriormente. Aproximadamente 1 mês depois da inoculação os sintomas virais começaram a aparecer nalgumas folhas novas do porta-enxerto (folhas estreitas, afuniladas, sintomas ligeiros de mosaico), especialmente visíveis na Planta 1 (Figura 6.4A). Na Planta 2, os sintomas revelaram-se mais discretos, apenas em algumas áreas de crescimento do porta-enxerto foi visível este fenótipo. Cerca de 2 meses depois das inoculações a Planta 2 parece ter entrado no processo natural de senescência, revelado pelo aparecimento da cor amarelada das folhas (Figura 6.4B).



**Figura 6.4** | Observação das plantas transgênicas *dsp23* enxertadas com WT e infetadas com o vetor viral TRV-p23 aproximadamente 60 dpi. A seta aponta a zona onde foi feita a enxertia. Os porta-enxertos (plantas *dsp23*) foram inoculados com o indutor de silenciamento pK-*dsp23*. **A.** Planta 1: inoculada aos 4 dpi com o vetor TRV-p23. **B.** Planta 2: inoculada aos 9 dpi com o vetor TRV-p23.

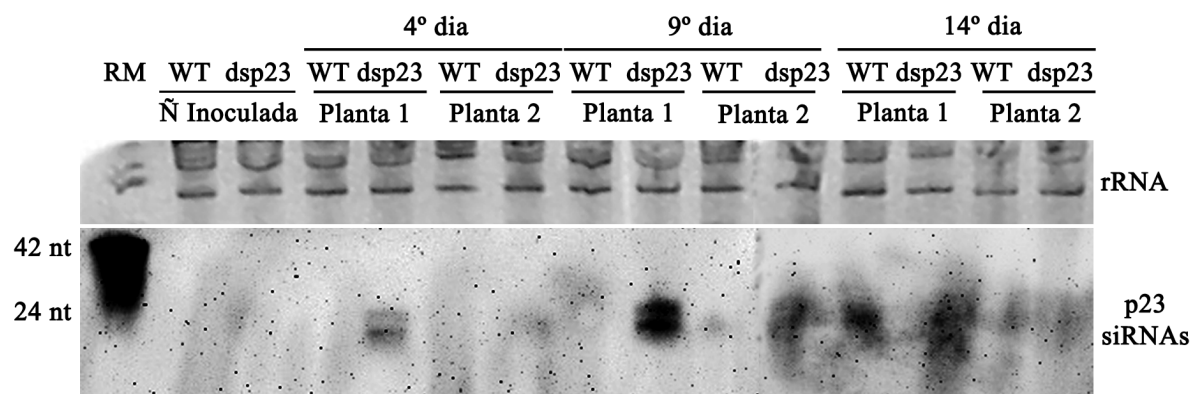
Para avaliar se o vírus e o supressor p23 foram respectivamente eliminados e silenciados, procedeu-se à quantificação por qRT-PCR da presença do TRV, nomeadamente a quantificação do mRNA da CP e dos níveis do mRNA da p23 presentes quer no enxerto como no porta enxerto das plantas. Os níveis de expressão da p23 e da CP em plantas *N. benthamiana* WT inoculadas com TRV-p23 (que apresentavam sintomas), foram usados como referência respetivamente de p23 e CP (expressão relativa igual a 1). Após a inoculação com o indutor de silenciamento pK-*dsp23* desencadeou-se rapidamente o silenciamento da p23, verificado pela diminuição para valores muito baixos da acumulação do mRNA da p23.

Após a inoculação com o vetor TRV-p23 observou-se elevada acumulação quer do mRNA p23 como do vírus na parte superior da planta onde foi inoculado (Figura 6.5 – p23 WT e CP TRV WT) e aos 24 dpi o silenciamento da p23 no porta-enxerto das plantas foi revertido, revelado pela acumulação de mRNA da p23 (Figura 6.5 – p23 dsp23), o que significa que o vírus se propagou para a parte inferior da planta, ainda que, os títulos virais do TRV estejam no limiar da detecção (Figura 6.5 – CP TRV dsp23). Estes resultados estão de acordo com os reduzidos sintomas virais observados na parte inferior da planta, o que significa que o vírus dissemina-se muito mal no porta-enxertos. Os níveis elevados da expressão da p23 e também do vírus foram diminuindo com o tempo quer no enxerto como porta-enxertos, ainda que, os sintomas da presença do vírus tenham permanecido e continuado a surgir nas folhas novas que se foram desenvolvendo.



**Figura 6.5** | Quantificação de mRNA da CP do TRV e do mRNA da p23 por qRT-PCR ao longo do tempo na parte superior WT *N. benthamiana* enxertada e no porta-enxertos de *N. benthamiana* dsp23. Os níveis de expressão da p23 e da CP de plantas WT inoculadas com TRV-p23 foram usados como referência. A seta no gráfico aponta para o dia em que foram observados sintomas nas plantas.

A confirmação de que o silenciamento de RNA foi ativado foi feita a partir da detecção de siRNAs específicos para a p23 ao 4º, 9º e 14º dpi. Ao 4º e 9º dpi apenas foram detetados siRNAs nos porta-enxertos das plantas dsp23 inoculadas com pK-dsp23. Ao 14º dpi foi, no entanto, possível detetar siRNAs na parte superior de ambas as plantas (Planta 1 e 2), o que parece indicar que o sinal de silenciamento se propagou pela planta (Figura 6.6).



**Figura 6.6|** Detecção por *Northern blot* de siRNAs específicos da p23 ao 4º, 9º e 14º dpi. RM: Marcador molecular específico da p23. WT: plantas enxertadas WT não inoculadas ou inoculadas com TRV-p23; dsp23: porta-enxerto dsp23 não inoculadas ou inoculadas com pK-dsp23. rRNA: bandas do gel correspondentes ao 5S rRNA/tRNA que servem de controlo da quantidade de RNA total aplicado por amostra.

### 6.3 DISCUSSÃO

A resistência derivada de um agente patogénico (PDR) induzida em plantas transgénicas que expressam genes virais é usada comumente para prevenir infeções virais. Foram já efetuados vários trabalhos no controlo de CTV em citrinos usando esta estratégia (Dominguez *et al.*, 2002; Fagoaga *et al.*, 2006; Febres *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2010), no entanto, os resultados obtidos têm sido inconsistentes. Os vírus de plantas como veículos para introduzirem e expressarem transgenes em plantas têm sido bastante utilizados (Chapman *et al.*, 1992; Ratcliff *et al.*, 2001) e dependendo do vírus que é usado, a multiplicação viral e a expressão génica pode continuar por longos períodos (MacFarlane and Popovich, 2000). Usando estratégias similares, neste estudo pretendeu-se avaliar a capacidade para silenciar a proteína supressora p23 do CTV numa infeção viral ativa usando o vetor viral TRV contendo a sequência correspondente homóloga.

Ambas as linhas transgénicas das plantas *N. benthamiana* geradas apresentaram crescimentos e desenvolvimentos semelhantes às plantas *N. benthamiana* WT (Figura 6.1C) confirmando resultados obtidos anteriormente quer para plantas transgénicas que expressam dsRNA da p23 (Batuman *et al.*, 2006), como no caso de plantas transgénicas que expressam a p23 (Fagoaga *et al.*, 2005). Nas plantas transgénicas p23 obtiveram-se baixos níveis de expressão da p23, contudo, este nível de expressão não se deve ao auto-silenciamento do transgene. Os resultados sugerem que as plantas estão transformadas pois cresceram em seleção com canamicina e, pelo facto de nas plantas controlo inoculadas apenas com o indutor de silenciamento, terem sido detetados siRNAs específicos da p23 ao 10º dpi em zonas da planta que não foram inoculadas, o que significa que o silenciamento se propagou e desencadeou o silenciamento sistémico de toda a planta (Figura 6.3B). O facto das plantas p23 expressarem um nível demasiado baixo de p23 comparado com os resultados obtidos por Fagoaga *et al.* (2005), em que a p23 se acumulou eficientemente nas plantas transgénicas de *N. benthamiana*, sugere que os resultados aqui obtidos poderão não corresponder a um comportamento típico de plantas transgénicas para p23.

Numa primeira estratégia para silenciar o supressor p23 utilizou-se as plantas *N. benthamiana* da linha transgénica p23. As plantas inoculadas revelaram-se suscetíveis ao supressor p23 quando inserido neste genoma viral. Observou-se uma associação clara entre a suscetibilidade das plantas à infeção e a supressão da acumulação de siRNAs (Figura 6.3B), bem como, a acumulação de mRNA p23, ou seja, a via de silenciamento de RNA não foi tão rapidamente

induzida como a replicação e disseminação viral pela planta. Estes resultados diferem, contudo, dos obtidos anteriormente por Roy *et al.* (2006) onde obtiveram uma boa resistência das plantas usando uma estratégia semelhante, ainda que, não tenha sido completa. Nomeadamente, inocularam plantas *N. benthamiana* transgênicas que expressavam sequências específicas de CTV com sequências homólogas transportadas pelo vetor viral PVX. Estas diferenças observadas poderão estar relacionadas com o vetor viral utilizado pois este vetor não tem capacidade de invadir os meristemas como o TRV (Martin-Hernandez and Baulcombe, 2008), o que pode ser suficiente para ultrapassar o silenciamento de RNA (Liu *et al.*, 2002). Roy *et al.* (2006), também referiram que parece haver uma relação entre a quantidade de supressor expresso e a resistência ou suscetibilidade, por isso, os elevados níveis de mRNA p23 detetados podem estar relacionados com a suscetibilidade observada nas plantas transgênicas. A segunda estratégia deste trabalho foi desenvolvida usando plantas WT *N. benthamiana* enxertadas na linha transgênica dsp23. Neste caso, parece ter sido gerado um sinal de silenciamento contra a p23 revelado ao 14º dia na acumulação de siRNAs do supressor p23 na parte enxertada da planta (Figura 6.6), bem como, a diminuição da acumulação de mRNA quer da p23 como do vírus ao longo do tempo (Figura 6.5). Ou seja, estes resultados parecem indicar que esta pode ser uma estratégia utilizada para conduzir ao silenciamento do supressor p23. A ausência de controlo negativo do TRV, da confirmação correta das plantas transgênicas geradas, da existência de um maior número de plantas enxertadas e também o facto de não ter sido repetido nenhum destes ensaios dificulta a análise dos resultados, devendo ser por isso, estes resultados considerados preliminares.

As diferentes abordagens realizadas confirmam as dificuldades observadas anteriormente na tentativa de promover resistência durável ao CTV (Batuman *et al.*, 2006; Dominguez *et al.*, 2002; Fagoaga *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2006; Soler *et al.*, 2012). A questão permanece, porque é que nalguns casos as plantas *N. benthamiana* transgênicas contendo sequências dos supressores conferem resistência e noutros casos não? As justificações devem estar relacionadas com o vetor viral, com o promotor ou ainda com a construção utilizada para ativar o silenciamento da planta. Além do mais, uma vez que, o CTV para contra defesa antiviral codifica três supressores, talvez a estratégia passe por silenciar simultaneamente os três supressores como foi observado por Soler *et al.* (2012), que conseguiram até hoje os melhores resultados de resistência contra o CTV. O facto de atualmente ser possível infectar as plantas *N. benthamiana* com CTV (Ambros *et al.*, 2013; Ambros *et al.*, 2011), irá permitir dissecar mais rapidamente e as interações entre o CTV e o hospedeiro.

---

# Capítulo

# 7

---

**CONCLUSÕES GERAIS**

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo das capacidades supressoras locais e sistêmicas das proteínas p20 e p23 de diferentes grupos filogenéticos do CTV. O CTV é o agente patogénico viral mais destrutivo dos citrinos na maioria das regiões produtivas, causando sérios prejuízos económicos. Com base no gene da CP, o CTV foi agrupado em sete grupos filogenéticos, que de um modo geral, se relacionam fenotipicamente com os sintomas induzidos pelo vírus nas espécies indicadoras de citrinos (Nolasco *et al.*, 2009). Com a replicação do vírus na célula e a formação de RNA de cadeia dupla, a planta ativa o seu sistema de defesa iniciando o silenciamento mediado por RNA. Os vírus adotaram estratégias que permitem superar os efeitos antivirais do silenciamento do hospedeiro através da expressão de proteínas supressoras (Hohn and Vazquez 2011, Li and Ding 2006, Burgyan and Havelda 2011). O CTV codifica pelo menos três genes supressores, nomeadamente os genes p20, p23 e p25 (Lu *et al.*, 2004), que atuam em diferentes passos da via de silenciamento, sugerindo uma interação complexa entre o vírus e o hospedeiro no curso da infeção. A realização deste trabalho permitiu contribuir para um melhor conhecimento das propriedades dos supressores p20 e p23 do CTV, salientando o papel dos supressores e a sua variabilidade em relação à produção de sintomas na planta modelo *Nicotiana benthamiana*.

Através de ensaios de coinfiltração envolvendo a expressão transiente, verificou-se que a proteína p23 de cada um dos grupos filogenéticos conhecidos para o CTV, foi capaz de suprimir o silenciamento local, mas não foi capaz de suprimir o silenciamento a curta distância. A p23 do Gp 5 foi o supressor local mais eficiente, seguido da dos Gps 1, 3a, 3b e 4, tendo sido a p23 dos Gps 2 e M os supressores menos eficientes. Ao nível do silenciamento sistémico foram também observadas diferenças induzidas pela p23 de cada um dos sete isolados testados. Observou-se silenciamento sistémico completamente disseminado na presença da p23 dos Gps 1, 2 e 4, semelhante ao observado com o controlo negativo. Já a p23 de isolados dos Gps 3a, 3b e M induziu silenciamento sistémico bastante reduzido e, surpreendentemente, a p23 do Gp 5 conseguiu abolir completamente o silenciamento sistémico, sugerindo que existe uma relação entre a intensidade do silenciamento local e do sistémico. Apesar dos grupos *mild* revelarem menor capacidade supressora, estes resultados não permitiram traçar uma relação entre o tipo ou severidade dos sintomas observado nas plantas cítricas (Nolasco *et al.*, 2009) e a atividade supressora das proteínas. A atividade supressora intracelular das proteínas p20 de vários grupos filogenéticos do CTV foi também anteriormente caracterizada (Marques *et al.*, 2012), revelando-se igualmente a p20 de isolados do Gp 5 e do Gp M, os supressores mais eficiente e o mais fraco, respetivamente, na

supressão local do silenciamento. A avaliação da atividade supressora por este processo está, contudo, longe da realidade de uma infecção viral devido ao rápido decaimento da expressão das proteínas supressoras.

A capacidade supressora das proteínas p20 e p23 em que a supressão do silenciamento atua sistemicamente durante um período mais alargado, foi analisada usando o vetor viral TRV, que permitiu a introdução e expressão dos genes supressores nas plantas *N. benthamiana*. A infecção pelo TRV para além de ter capacidade de invadir todos os tecidos, inclusive os meristemas, não origina sintomas ou se observados são suaves, o que facilita a identificação do fenótipo induzido pelo gene introduzido (Dinesh-Kumar *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002; Ratcliff *et al.*, 2001). A infiltração das plantas com os supressores p20 e p23 expressos pelo TRV não revelou, contudo, diferenças significativas na capacidade supressora entre os vários isolados de p20 e p23 testados ao longo do tempo. Por sua vez, nas plantas *N. benthamiana* foram observados sintomas com todas as proteínas supressoras testadas, nomeadamente, nanismo das plantas, lesões necróticas severas nas folhas inoculadas e nas folhas novas ligeiros sintomas de mosaico e enrolamento. A intensidade dos sintomas observada foi diferente entre alguns isolados dos grupos testados: a p23 do Gp M foi a modalidade mais fraca a causar a lesão foliar necrótica, a proteína p23 do Gp 5 originou os sintomas mais severos especialmente notório o nanismo da planta e as outras modalidades testadas originaram sintomas moderados a severos. Apesar da p23 do Gp 5 estar associada a sintomas severos, foram também anteriormente reportados isolados deste grupo associados a sintomas suaves (Cerni *et al.*, 2008; Hančević *et al.*, 2013). A razão pela qual a p23 do Gp 5 apresenta atividade supressora forte, mas nem sempre nas plantas hospedeiras se observam sintomas particularmente intensos permanece obscura. O ideal seria futuramente testar outros isolados do mesmo grupo filogenético para observar se este é um comportamento típico deste grupo, bem como, testar este isolado nas plantas hospedeiras de citrinos para observar se há relação entre os resultados.

O facto de existirem três genes supressores no CTV que eventualmente atuam em diferentes passos da via de silenciamento parece ser essencial para o sucesso da infecção. Foi sugerido por vários autores (Canizares *et al.*, 2008; Ding 2010; Senshu *et al.*, 2011), a existência de uma forma de sinergia, isto é, uma ação coordenada e complementar para suprimir diferentes passos da via do silenciamento de RNA, relacionada com um único vírus que codificasse mais do que um supressor do silenciamento. Uma vez que, as proteínas p20 e p23 têm como alvo o mecanismo de silenciamento local de RNA, avaliou-se o efeito destas duas proteínas

supressoras quando isoladas e em conjunto. A atividade supressora destas duas proteínas foi semelhante. A expressão conjunta das proteínas quer de isolados *mild* ou *stem pitting* mostrou uma atividade supressora local mais forte comparada com a capacidade supressora individual de cada proteína mesmo quando inoculadas com culturas de *Agrobacterium tumefaciens* com metade da densidade ótica. Estes resultados sugerem a existência de um efeito sinérgico entre as proteínas p20 e p23 na supressão local do silenciamento. Os diferentes alvos dos supressores de CTV na via de silenciamento de RNA ainda permanecem desconhecidos, por isso, para revelar a estratégia deste vírus na infecção do hospedeiro é necessário aprofundar este conhecimento.

Por último, foram também realizados ensaios no sentido de se tentar encontrar uma estratégia de defesa, uma vez que, até à data ainda não foi encontrada uma solução perfeita. Para tal, avaliou-se a possibilidade de silenciar sistemicamente o supressor p23 do CTV quando incluído num genoma viral, baseado na dependência do PTGS na homologia com a sequência através do uso de plantas e enxertos transgênicos para a p23. Com este objetivo em mente, foram utilizadas duas estratégias: na primeira usou-se plantas *N. benthamiana* transgênicas da linha p23 que expressam constitutivamente o gene da p23 e na segunda usou-se a enxertia para fornecimento do sinal de silenciamento, através da enxertia de plantas WT *N. benthamiana* em plantas transgênicas *N. benthamiana* que formam dsRNA da p23. Diversos problemas ocorridos durante o desenrolar dos ensaios, nomeadamente, a ausência de controlo negativo do TRV, da confirmação adequada da transformação genética das plantas geradas, da existência de um maior número de plantas enxertadas e também o facto de não ter sido repetido nenhum destes ensaios, dificultou a correta análise dos resultados, o que levou a que os resultados obtidos devam ser encarados como preliminares. As diferentes abordagens realizadas confirmam as dificuldades observadas anteriormente na tentativa de promover resistência durável ao CTV (Batuman *et al.*, 2006; Dominguez *et al.*, 2002; Fagoaga *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2006; Soler *et al.*, 2012). Ainda assim, os resultados preliminares obtidos com a estratégia que envolve o uso de enxertos transgênicos parece indicar resultados promissores que conduzem ao silenciamento do supressor p23.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbergenov R., Si-Ammour A., Blevins T., Amin I., Kutter C., Vanderschuren H., Zhang P., Gruissem W., Meins F., Jr. Hohn T., Pooggin M.M. (2006). Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Res* 34: 462-71.
- Albiach-Marti M.R., Mawassi M., Gowda S., Satyanarayana T., Hilf M.E., Shanker S., Almira E.C., Vives M.C., Lopez C., Guerri J., Flores R., Moreno P., Garnsey S.M., Dawson W.O. (2000). Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *J Virol* 74: 6856-65.
- Albiach-Marti M.R., Robertson C., Gowda S., Tatineni S., Belliure B., Garnsey S.M., Folimonova S.Y., Moreno P., Dawson W.O. (2010). The pathogenicity determinant of *Citrus tristeza virus* causing the seedling yellows syndrome maps at the 3'-terminal region of the viral genome. *Mol Plant Pathol* 11: 55-67.
- Albiach-Marti M.R. (2012a). Molecular Virology and Pathogenicity of *Citrus tristeza virus*. In: Garcia M.L., Romanowski V. (ed.). *Viral Genomes – Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions*. *InTech* 14: 276-302.
- Albiach-Marti M.R. (2012b). Molecular Virology and Pathogenicity of *Citrus tristeza virus*, Viral Genomes. In: Garcia P.M. (ed.). *Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions*. *InTech* pp. 302.
- Aliyari R., Ding S.W. (2009). RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunol Rev* 227: 176-88.
- Alvarado V., Scholthof H. B. (2009). Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens. *Semin Cell Dev Biol* 20: 1032-40.
- Ambros S., El-Mohtar C., Ruiz-Ruiz S., Pena L., Guerri J., Dawson W.O., Moreno P. (2011). Agroinoculation of *Citrus tristeza virus* causes systemic infection and symptoms in the presumed nonhost *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 1119-31.
- Ambros S., Ruiz-Ruiz S., Pena L., Moreno P. (2013). A genetic system for *Citrus tristeza virus* using the non-natural host *Nicotiana benthamiana*: an update. *Front Microbiol* 4:165.
- Amin H.A. and Falk B.W. (2009) *Citrus tristeza virus*-p23 Gene Correlated with the Pathogenicity in Non Citrus Hosts. *Egypt J Phytopathology* 37: 83-98.
- Anandalakshmi R., Pruss G.J., Ge X., Marathe R., Mallory A.C., Smith T.H., Vance V.B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13079-84.
- Asins M.J., Bernet G.P., Ruiz C., Cambra M., Guerri J., Carbonell E.A. (2004). QTL analysis of *Citrus tristeza virus-citradia* interaction. *Theor Appl Genet* 108: 603-11.
- Ayllon M.A., Lopez C., Navas-Castillo J., Garnsey S.M., Guerri J., Flores R., Moreno P. (2001). Polymorphism of the 5' terminal region of *Citrus tristeza virus* (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Arch Virol* 146: 27-40.
- Bag S., Mitter N., Eid S., Pappu H.R. (2012). Complementation between two tospoviruses facilitates the systemic movement of a plant virus silencing suppressor in an otherwise restrictive host. *PLoS One* 7:e44803.
- Bar-Joseph M., Marcus R. & Lee. R. F. (1989). The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annu Rev Phytopathol* 27: 291-316.

- Bar-Joseph M. and Dawson W.O. (2008). *Citrus tristeza virus*. In: Mahy B.W.J., Van Regenmortel M.H.V. (ed.). Desk encyclopedia of plant and fungal virology. Elsevier 160-165.
- Bar-Joseph M., Mawassi M. (2013). The defective RNAs of *Closteroviridae*. *Front Microbiol* 4:132.
- Batuman O., Mawassi M., Bar-Joseph M. (2006). Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to *Citrus tristeza virus* sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus. *Virus Genes* 33: 319-27.
- Baulcombe D.C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* 2: 109-13.
- Baulcombe D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-63.
- Bhattacharjee S., Zamora A., Azhar M.T., Sacco M.A., Lambert L.H., Moffett P. (2009). Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves Argonaute4-dependent translational control. *Plant J* 58: 940-51.
- Bradford M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254.
- Brigneti G., Voinnet O., Li W.X., Ji L.H., Ding S.W., Baulcombe D.C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Embo J* 17: 6739-46.
- Brodersen P., Voinnet O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 22: 268-80.
- Burgyan J. (2008). Role of silencing suppressor proteins. In: Foster G.D., Johansen I.E., Hong Y., Nagy P.D. (ed.). Plant Virology Protocols, from viral sequence to protein function. *Humana Press*. pp. 69-79.
- Burgyan J., Havelda Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* 16: 265-72.
- Cambra M., Gorris M.T., Marroquin C., Roman M.P., Olmos A., Martinez M.C., de Mendoza A.H., Lopez A., Navarro L. (2000). Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian community of Spain. *Virus Res* 71: 85-95.
- Canizares M.C., Navas-Castillo J., Moriones E. (2008). Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, *Tomato chlorosis virus*. *Virology* 379: 168-74.
- Carrington J.C., Kasschau K.D., Johansen L.K. (2001). Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology* 281: 1-5.
- Carrington J.C., Ambros V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301: 336-8.
- Cerni S., Ruscic J., Nolasco G., Gatin Z., Krajacic M., Skoric D. (2008). Stem pitting and seedling yellows symptoms of *Citrus tristeza virus* infection may be determined by minor sequence variants. *Virus Genes* 36: 241-9.
- Chapman S., Kavanagh T., Baulcomb D. (1992). *Potato virus X* as a vector for gene expression in plants. *Plant Journal* 2: 549-557.
- Chapman E.J., Prokhnovsky A.I., Gopinath K., Dolja V.V., Carrington J.C. (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18: 1179-86.
- Chapman E.J., Carrington J.C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet* 8: 884-96.

- Chen H.Y., Yang J., Lin C., Yuan Y.A. (2008). Structural basis for RNA-silencing suppression by *Tomato aspermy virus* protein 2b. *EMBO Rep* 9: 754-60.
- COST FA0806 (2008-2013). Plant virus control employing RNA-based vaccines: A novel non-transgenic strategy. European Cooperation in Science and Technology.
- Costa Â., Marques N., Nolasco G. (2014). *Citrus tristeza virus* p23 may suppress systemic silencing but is not related to the kind of viral syndrome. *Physiol Mol Plant Pathol* 87: 69-75.
- Costa A.S., Müller G.W. (1980). Tristeza Control by Cross Protection. *Plant Dis. American Phytopathological Society*. Instituto Agronômico, Campinas, Brazil. pp. 538-541.
- Dawson W.O., Garnsey S.M., Tatineni S., Folimonova S.Y., Harper S.J., Gowda S. (2013). *Citrus tristeza virus*-host interactions. *Front Microbiol* 4:88.
- Daxinger L., Kanno T., Bucher E., van der Winden J., Naumann U., Matzke A.J., Matzke M. (2009). A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *EMBO J* 28: 48-57.
- Deleris A., Gallego-Bartolome J., Bao J., Kasschau K.D., Carrington J.C., Voinnet O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313: 68-71.
- Deng X., Kelloniemi J., Haikonen T., Vuorinen A.L., Elomaa P., Teeri T.H., Valkonen J.P. (2013). Modification of *Tobacco rattle virus* RNA1 to serve as a VIGS vector reveals that the 29K movement protein is an RNA silencing suppressor of the virus. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 503-14.
- Diaz-Pendon J.A., Ding S.W. (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 46: 303-26.
- Dinesh-Kumar S.P., Anandalakshmi R., Marathe R., Schiff M., Liu Y. (2003). Virus-induced gene silencing. *Methods Mol Biol* 236: 287-94.
- Ding S.W., Voinnet O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130: 413-26.
- Ding S.W. (2010). RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 10: 632-644.
- Dolja V.V., Kreuze J.F., Valkonen J.P. (2006). Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res* 117: 38-51.
- D'Onghia A.M. (2009). Natural tolerance/resistance of citrus plants to *Citrus tristeza* disease. In: D'Onghia A.M., Djelouah K., Roistacher C.N. (ed.). *Citrus tristeza virus and Toxoptera citricidus: a serious threat to the Mediterranean citrus industry. CIHEAM Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches*, Bari. pp. 181-184.
- Dominguez A., Fagoaga C., Navarro L., Moreno P., Pena L. (2002). Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Mol Genet Genomics* 267: 544-56.
- Fagoaga C., Lopez C., Moreno P., Navarro L., Flores R., Pena L. (2005). Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of *Citrus tristeza virus* are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 435-45.
- Fagoaga C., Lopez C., de Mendoza A.H., Moreno P., Navarro L., Flores R., Pena L. (2006). Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Mol Biol* 60: 153-65.
- FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (2012). Disponível na www: <URL: <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus-fruit/en/>>.

- Febres V.J., Ashoulin L., Mawassi M., Frank A., Bar-Joseph M., Manjunath K.L., Lee R.F., Niblett C.L. (1996). The p27 Protein is present at one end of *Citrus tristeza virus* Particles. *Mol Plant Pathol* 86:1331-35.
- Febres V.J., Niblett C.L., Lee R.F., Moore G.A. (2003). Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cell Rep* 21: 421-8.
- Febres V.J., Lee R.F., Moore G.A. (2008). Transgenic resistance to *Citrus tristeza virus* in grapefruit. *Plant Cell Rep* 27: 93-104.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-11.
- Flores R., Ruiz-Ruiz S., Soler N., Sanchez-Navarro J., Fagoaga C., Lopez C., Navarro L., Moreno P., Pena L. (2013a). *Citrus tristeza virus* p23: a unique protein mediating key virus-host interactions. *Front Microbiol* 4:98.
- Flores R., Moreno P., Falk B., Martelli G.P., Dawson W.O. (2013b). e-Book on *Closteroviridae*. *Front Microbiol* 4:411.
- Folimonova S.Y., Robertson C.J., Shilts T., Folimonov A.S., Hilf M.E., Garnsey S.M., Dawson W.O. (2010). Infection with strains of *Citrus tristeza virus* does not exclude superinfection by other strains of the virus. *J Virol* 84: 1314-25.
- Folimonova S.Y. (2013). Developing an understanding of cross-protection by *Citrus tristeza virus*. *Front Microbiol* 4:76.
- Foster T.M., Lough T.J., Emerson S.J., Lee R.H., Bowman J.L., Forster R.L., Lucas W.J. (2002). A surveillance system regulates selective entry of RNA into the shoot apex. *Plant Cell* 14: 1497-508.
- Fukudome A., Kanaya A., Egami M., Nakazawa Y., Hiraguri A., Moriyama H., Fukuhara T. (2011). Specific requirement of DRB4, a dsRNA-binding protein, for the in vitro dsRNA-cleaving activity of *Arabidopsis* Dicer-like 4. *RNA* 17: 750-60.
- Gal-On A., Zelcer A., Wolf D., Gaba P.V., Antignus Y. (2008). Engrafted plants resistant to viral diseases and methods of producing same, Google Patents, State Of Israel.
- Garnsey S.M., Gonsalves D., Purcifull D.E. (1979). Rapid diagnosis of *Citrus tristeza virus* by SDS-immunodiffusion procedures. *Phytopathology* 69: 88-95.
- Garnsey S.M., Gumpf D.J., Roistacher C.N., Civerolo E.L., Lee R.F., Yokomi R.K., Bar-Joseph M. (1987). Towards a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica* 19: 151-157.
- Goodin M.M., Zaitlin D., Naidu R.A., Lommel S.A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1015-26.
- Gowda S., Satyanarayana T., Davis C.L., Navas-Castillo J., Albiach-Marti M.R., Mawassi M., Valkov N., Bar-Joseph M., Moreno P., Dawson W.O. (2000). The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274: 246-54.
- Gowda S., Satyanarayana T., Ayllon M.A., Albiach-Marti M.R., Mawassi M., Rabindran S., Garnsey S.M., Dawson W.O. (2001). Characterization of the cis-acting elements controlling subgenomic mRNAs of *Citrus tristeza virus*: production of positive- and negative-stranded 3'-terminal and positive-stranded 5'-terminal RNAs. *Virology* 286: 134-51.

- Gowda S., Satyanarayana T., Ayllon M.A., Moreno P., Flores R., Dawson W.O. (2003). The conserved structures of the 5' nontranslated region of *Citrus tristeza virus* are involved in replication and virion assembly. *Virology* 317: 50-64.
- Guo H.S., Ding S.W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J* 21: 398-407.
- Hamilton A. J., Baulcombe D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 21: 4671-9.
- Hančević K., Černib S., Nolasco G., Radić T., Djelouah K., Škorić D. (2013). Biological characterization of *Citrus tristeza virus* monophyletic isolates with respect to p25 gene. *Physiol Mol Plant Pathol* 81: 45-53.
- Harper S.J., Dawson T.E., Pearson M.N. (2010). Isolates of *Citrus tristeza virus* that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Arch Virol* 155: 471-80.
- Harper S.J. (2013). *Citrus tristeza virus*: Evolution of Complex and Varied Genotypic Groups. *Front Microbiol* 4:93.
- Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C., Hodge S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2122-7.
- Henderson I.R., Zhang X., Lu C., Johnson L., Meyers B.C., Green P.J., Jacobsen S.E. (2006). Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat Genet* 38: 721-5.
- Herr A.J., Baulcombe D.C. (2004). RNA silencing pathways in plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69: 363-70.
- Hilf M.E., Karasev A.V., Pappu H.R., Gumpf D.J., Niblett C.L., Garnsey S.M. (1995) Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208: 576-82.
- Hilf M.E., Mavrodieva V.A., Garnsey S.M. (2005). Genetic Marker Analysis of a Global Collection of Isolates of *Citrus tristeza virus*: Characterization and Distribution of CTV Genotypes and Association with Symptoms. *Phytopathology* 95: 909-17.
- Himber C., Dunoyer P., Moissiard G., Ritzenthaler C., Voinnet O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo J* 22: 4523-33.
- Hofgen R., Willmitzer L. (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation *Nucleic Acids Res* 16 (20): 9877.
- Horsh R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. (1985). A simple and general method of transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Hohn T., Vazquez F. (2011). RNA silencing pathways of plants: Silencing and its suppression by plant DNA viruses. *Biochim Biophys Acta* pp. 588 – 600.
- Horvath P., Barrangou R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327: 167-70.
- Jiang L., Wei C., Li Y. (2012). Viral suppression of RNA silencing. *Sci China Life Sci* 55: 109-18.
- Karasev A.V., Boyko V.P., Gowda S., Nikolaeva O.V., Hilf M.E., Koonin E.V., Niblett C.L., Cline K., Gumpf D.J., Lee R.F., et al. (1995). Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology* 208: 511-20.

- Karimi M., Inze D., Depicker A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193-5.
- Kasschau K.D., Xie Z., Allen E., Llave C., Chapman E.J., Krizan K.A., Carrington J.C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA uncton. *Dev Cell* 4: 205-17.
- Lacirignola C., D'Onghia A.M. (2009). The Mediterranean citriculture: productions and perspectives. In: Djelouah K., D'Onghia A.M., Roistacher C.N. (ed.). *Citrus tristeza virus and Toxoptera citricidus: a serious threat to the Mediterranean citrus industry. CIHEAM Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches*, Bari. 65: 13-17.
- Lacombe S., Bangratz M., Vignols F., Brugidou C. (2010). The rice yellow mottle virus P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing. *Plant J* 61: 371-82.
- Lee R.F., Keremane M.L. (2013). Mild strain cross protection of tristeza: a review of research to protect against decline on sour orange in Florida. *Front Microbiol* 4:259.
- Lewsey M., Robertson F.C., Canto T., Palukaitis P., Carr J.P. (2007). Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant J* 50: 240-52.
- Li F., Ding S.W. (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* 60: 503-31.
- Li H.W., Lucy A.P., Guo H.S., Li W.X., Ji L.H., Wong S.M., Ding S.W. (1999). Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO J* 18: 2683-91.
- Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S.P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* 31: 777-86.
- Lopez C., Ayllon M.A., Navas-Castillo J., Guerri J., Moreno P., Flores R. (1998). Molecular variability of the 5'- and 3'-terminal regions of *Citrus tristeza virus* RNA. *Phytopathology* 88: 685-91.
- Lopez C., Navas-Castillo J., Gowda S., Moreno P., Flores R. (2000). The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of *Citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology* 269: 462-70.
- Lopez C., Cervera M., Fagoaga C., Moreno P., Navarro L., Flores R., Pena L. (2010). Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against *Citrus tristeza virus* in transgenic Mexican lime. *Mol Plant Pathol* 11: 33-41.
- Lu R., Martin-Hernandez A.M., Peart J.R., Malcuit I., Baulcombe D.C. (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30: 296-303.
- Lu R., Folimonov A., Shintaku M., Li W.X., Falk B.W., Dawson W.O., Ding S.W. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15742-7.
- MacDiarmid R. (2005). RNA silencing in productive virus infections. *Annu Rev Phytopathol* 43: 523-44.
- MacFarlane S.A., Popovich A.H. (2000). Efficient expression of foreign proteins in roots from tobnavirus vectors. *Virology* 267: 29-35.
- Mallory A.C., Ely L., Smith T.H., Marathe R., Anandalakshmi R., Fagard M., Vaucheret H., Pruss G., Bowman L., Vance V.B. (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13: 571-83.

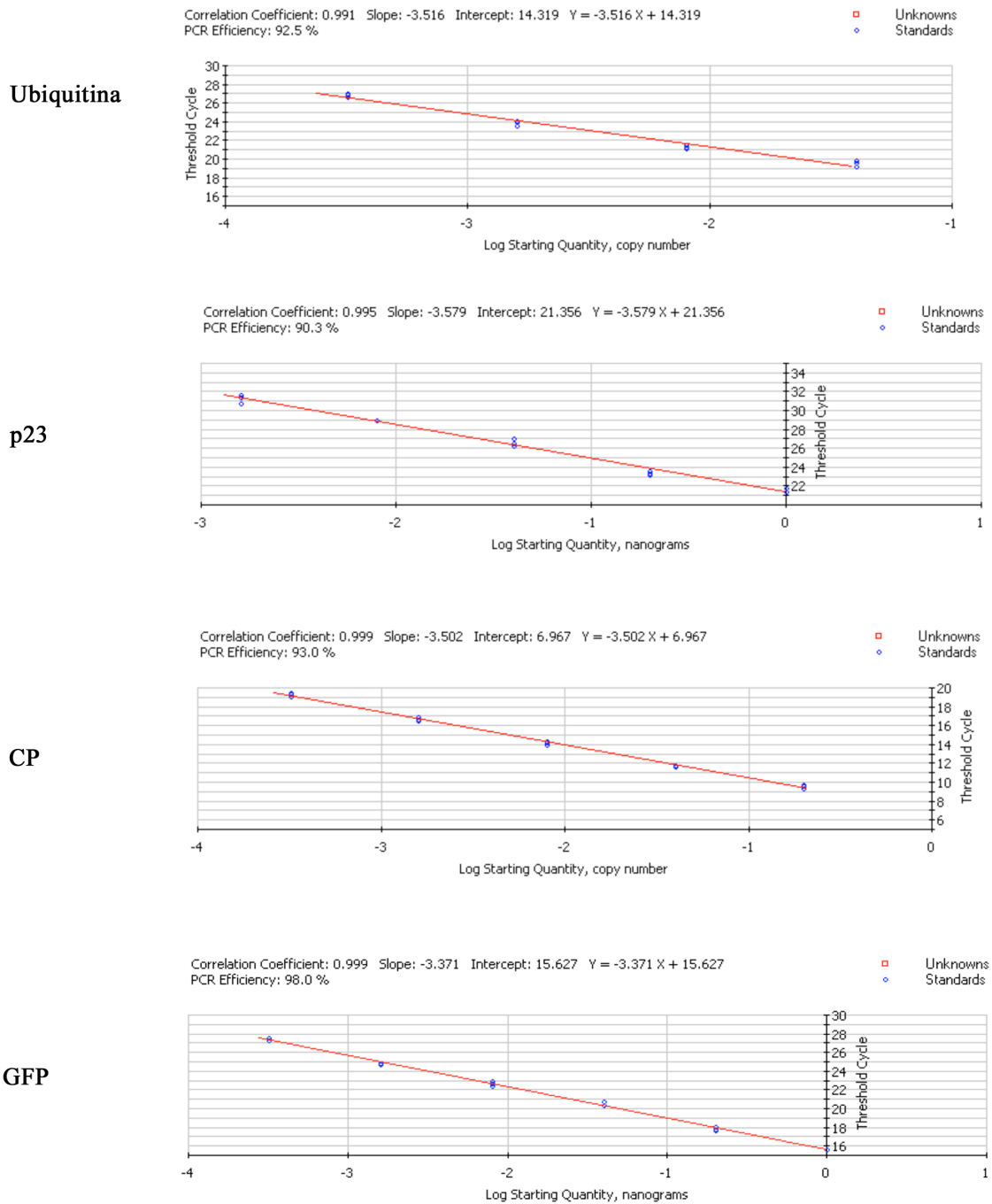
- Mallory A., Vaucheret H. (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22: 3879-89.
- Marques N.T., Costa A.A., Lopes D., Silva G., Nolasco G. (2012). Comparing p20's RNA silencing suppressing activity among five phylogenetic groups of *Citrus tristeza virus*. *Eur J Plant Pathol* 133: 229-235.
- Marraffini L.A., Sontheimer E.J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet* 11: 181-90.
- Martelli G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse T., Coutts R.H., Dolja V.V., Falk B.W., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A.V., Minafra A., Namba S., Vetten H.J., Wisler G.C., Yoshikawa N. (2002). The family *Closteroviridae* revised. *Arch Virol* 147:2039-44.
- Martin-Hernandez A.M., Baulcombe D.C. (2008). *Tobacco rattle virus* 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. *J Virol* 82: 4064-71.
- Matzke M., Kanno T., Daxinger L., Huettel B., Matzke A.J. (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* 21: 367-76.
- Ministério da Agricultura, do desenvolvimento Rural e das Pescas (2007). Citrinos. Gabinete de Planeamento e Políticas. Portugal.
- Moreno P., Ambros S., Albiach-Marti M.R., Guerri J., Pena L. (2008). *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol Plant Pathol* 9: 251-68.
- Moreno P. and Garnsey S.M. (2010). *Citrus tristeza virus* – A worldwide perspective. In: Karasev A.V. and Hilf M.E. (ed.). *Citrus tristeza virus* complex and tristeza diseases. APS Press, St Paul, MN. 27-49.
- Müller G.W., Costa A.S. (1968). Further evidence on protective interference in citrus tristeza. *4th Conference of the International Organization of Citrus Virology*, Gainesville: University of Florida.
- Müller G.W. (1976). A Tristeza dos Citros. *Summa Phytopathologica* 2: 245-63.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Nagano H., Fukudome A., Hiraguri A., Moriyama H., Fukuhara T. (2014). Distinct substrate specificities of *Arabidopsis* DCL3 and DCL4. *Nucleic Acids Res* 42: 1845-56.
- Navas-Castillo J., Albiach-Marti M.R., Gowda S., Hilf M.E., Garnsey S.M., Dawson W.O. (1997). Kinetics of accumulation of *Citrus tristeza virus* RNAs. *Virology* 228: 92-7.
- Niblett C.L., Genc H., Cevik B., Halbert S., Brown L., Nolasco G., Bonacalza B., Manjunath K.L., Febres V.J., Pappu H.R., Lee R.F. (2000). Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Res* 71: 97-106.
- Nolasco G. (2009). Historical review of *Citrus tristeza virus* in Portugal. In: Djelouah K., D'Onghia A.M., Roistacher C.N. (ed.). *Citrus tristeza virus* and *Toxoptera citricidus*: a serious threat to the Mediterranean citrus industry. *CIHEAM Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches*, Bari. 65: 49-52.
- Nolasco G., Santos C., Silva G., Fonseca F. (2009). Development of an asymmetric PCR-ELISA typing method for *Citrus tristeza virus* based on the coat protein gene. *J Virol Methods* 155: 97-108.
- Padmanabhan M.S. and Dinesh-Kumar S.P. (2008). Virus-Induced Gene Silencing (VIGS), In: Mahy B.W.J., Van Regenmortel M.H.V. (ed.). *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*: Elsevier. pp. 38-43.

- Pall G.S., Codony-Servat C., Byrne J., Ritchie L., Hamilton A. (2007). Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res* 35:e60.
- Pfaffl M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605-12.
- Pontes O., Pikaard C.S. (2008). siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. *Curr Opin Genet Dev* 18: 197-203.
- Pruss G., Ge X., Shi X.M., Carrington J.C., Bowman Vance V. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9: 859-68.
- Qu F., Morris T.J. (2005). Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Lett* 579: 5958-64.
- Ratcliff F., Martin-Hernandez A.M., Baulcombe D. (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* 25: 237-245.
- Roistacher C.N. Tristeza 3 – Epidemiology. *Citrus Resources in Ecoport*. Disponível na página da internet <URL: <http://ecoport.org/perl/ecoport15.pl?SearchType=slideshowView&slideshowId=102>>
- Roistacher C.N., Graça J.V., Müller G.W. (2010). Cross Protection Against *Citrus tristeza virus* - a Review. In: Hilf M.E, Timmer L.W., Milne R.G. and da Graça J.V. (ed.), *Proceedings of the Seventeenth Conference International Organization of Citrus Virologists*, Riverside, CA: IOCV. pp. 3–27.
- Roth B.M., Pruss G.J., Vance V.B. (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res* 102: 97-108.
- Roy G., Sudarshana M.R., Ullman D.E., Ding S.W., Dandekar A.M., Falk B.W. (2006). Chimeric cDNA Sequences from *Citrus tristeza virus* Confer RNA Silencing-Mediated Resistance in Transgenic *Nicotiana benthamiana* Plants. *Phytopathology* 96: 819-27.
- Rubio L., Ayllon M.A., Kong P., Fernandez A., Polek M., Guerri J., Moreno P., Falk B.W. (2001). Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *J Virol* 75: 8054-62.
- Rubio L., Guerri J., Moreno P. (2013). Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*. *Front Microbiol* 4:151.
- Ruiz M.T., Voinnet O., Baulcombe D.C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10: 937-46.
- Ruiz-Ruiz S., Navarro B., Gisel A., Penã L., Navarro L., Moreno P., Di Serio F.A., Flores R. (2011). *Citrus tristeza virus* infection induces the accumulation of viral small RNAs (21–24-nt) mapping preferentially at the 30-terminal region of the genomic RNA and affects the host small RNA profile. *Plant Mol Biol* 75: 607–619.
- Ruiz-Ruiz S., Soler N., Sanchez-Navarro J., Fagoaga C., Lopez C., Navarro L., Moreno P., Pena L., Flores R. (2013). *Citrus tristeza virus* p23: determinants for nucleolar localization and their influence on suppression of RNA silencing and pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 306-18.

- Sambade A., Lopez C., Rubio L., Flores R., Guerri J., Moreno P. (2003). Polymorphism of a specific region in gene p23 of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Arch Virol* 148: 2325-40.
- Satyanarayana T., Gowda S., Mawassi M., Albiach-Marti M.R., Ayllon M.A., Robertson C., Garnsey S.M., Dawson W.O. (2000). Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* 278: 253-65.
- Satyanarayana T., Gowda S., Ayllon M.A., Albiach-Marti M.R., Rabindran S., Dawson W.O. (2002). The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *J Virol* 76: 473-83.
- Seidman C. E., Struhl K., Sheen J., Jessen T. (1997). Introduction of plasmid DNA into cells. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel M. (ed). John Wiley & Sons, Inc, New York 1.8.1-1.8.10.
- Senshu H., Yamaji Y., Minato N., Shiraishi T., Maejima K., Hashimoto M., Miura C., Neriya Y., Namba S. (2011). A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by *Potato virus M*. *J Virol* 85: 10269-78.
- Siddiqui S.A., Sarmiento C., Truve E., Lehto H., Lehto K. (2008a). Phenotypes and functional effects caused by various viral RNA silencing suppressors in transgenic *Nicotiana benthamiana* and *N. tabacum*. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 178-87.
- Siddiqui S.A., Sarmiento C., Kiisma M., Koivumaki S., Lemmetty A., Truve E., Lehto K. (2008b). Effects of viral silencing suppressors on *tobacco ringspot virus* infection in two *Nicotiana* species. *J Gen Virol* 89: 1502-8.
- Silva G. (2011). Filodinâmica do vírus da tristeza dos citrinos: epidemiologia molecular e biologia evolutiva. Tese de Doutorado em Virologia – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Faro, Portugal.
- Siomi H., Siomi M.C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457: 396-404.
- Soler N., Plomer M., Fagoaga C., Moreno P., Navarro L., Flores R., Pena L. (2012). Transformation of Mexican lime with an intron-hairpin construct expressing untranslatable versions of the genes coding for the three silencing suppressors of *Citrus tristeza virus* confers complete resistance to the virus. *Plant Biotechnol J* 10: 597-608.
- Szittyá G, Dalmay T, Burgyan J. (2008). Plant Antiviral Defense: Gene Silencing Pathway. In: Mahy B.W.J., Van Regenmortel M.H.V. (ed.). Desk encyclopedia of plant and fungal virology: Elsevier. pp. 30-38.
- Takeda A., Iwasaki S., Watanabe T., Utsumi M., Watanabe Y. (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol* 49: 493-500.
- Tatineni S., Robertson C.J., Garnsey S.M., Bar-Joseph M., Gowda S., Dawson W.O. (2008). Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology* 376: 297-307.
- Tatineni S., Robertson C.J., Garnsey S.M., Dawson W.O. (2011). A plant virus evolved by acquiring multiple nonconserved genes to extend its host range. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 17366-71.
- Tatineni S., Dawson W.O. (2012). Enhancement or attenuation of disease by deletion of genes from *Citrus tristeza virus*. *J Virol* 86: 7850-7.

- Torres-Barcelo C., Martin S., Daros J.A., Elena S.F. (2008). From hypo- to hypersuppression: effect of amino acid substitutions on the RNA-silencing suppressor activity of the *Tobacco etch potyvirus* HC-Pro. *Genetics* 180: 1039-49.
- Turpen T.H., Turpen A.M., Weinzettl N., Kumagai M.H., Dawson W.O. (1993). Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of *tobacco mosaic virus*. *J Virol Methods* 42: 227-39.
- Unver T., Budak H. (2009). Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. *Int J Plant Genomics* 2009:198680.
- Vance V.B., Berger P.H., Carrington J.C., Hunt A.G., Shi X.M. (1995). 5' proximal potyviral sequences mediate *potato virus X*/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206: 583-90.
- Vanitharani R., Chellappan P., Pita J.S., Fauquet C.M. (2004). Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 78: 9487-98.
- Voinnet O., Pinto Y.M., Baulcombe D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14147-52.
- Voinnet O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 17: 449-59.
- Voinnet O. (2008). Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci* 13: 317-28.
- Wang M.B., Masuta C., Smith N.A., Shimura H. (2012). RNA silencing and plant viral diseases. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 1275-85.
- Webber H.J. (1943). The tristeza disease of sour-orange rootstock. *Proc Amer Soc Hort Sci* 43:160-167.
- Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A., Wang M.B., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., Robinson S.P., Gleave A.P., Green A.G., Waterhouse P.M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27: 581-90.
- Xie Z., Johansen L.K., Gustafson A.M., Kasschau K.D., Lellis A.D., Zilberman D., Jacobsen S.E., Carrington J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2: E104.
- Yokomi R.K., Lastra R., Stoetzel M.B., Damsteegt V.C., Lee R.F., Garnsey S.M., Gottwald T.R., Rocha P.M.A., Niblett C.L. (1994). Establishment of the *brown citrus aphid* (Homoptera: *Aphididae*) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of *Citrus tristeza virus*. *J Economic Entomol* 87:1078-1085.
- Yokomi R.K. (2009). *Citrus tristeza virus*. In: D'Onghia A.M., Djelouah K., Roistacher C.N. (ed.). *Citrus tristeza virus and Toxoptera citricidus: a serious threat to the Mediterranean citrus industry. CIHEAM Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches*, Bari. 65: 19-32.
- Yokomi R.K. (2011). Etiology, background, worldwide situation and control of *Citrus tristeza virus* and its vectors. In: USA (ed.). *2nd International workshop on Citrus Quarantine Pest, Symposium Proceedings*, Mexico.
- Zamore P.D. (2002). Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 296: 1265-9.
- Zhang Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9:40.

# Anexo I



**Figura 1** | Curvas de calibração obtidas para quantificação dos níveis de expressão dos genes ubiquitina, p23, CP do TRV e GFP.