

,

## **APLICACÕES BIOTECNOLÓGICAS DO SUPRESSOR DE SILENCIAMENTO DO CMV**

### **DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO**

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

---

Copyright © Susana Anahi Dandlen

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 outro 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

São muitas as pessoas que têm contribuído de maneira direta ou indireta com o meu trabalho.

Quero agradecer especialmente ao Professor Doutor Gustavo Nolasco pelo seu apoio e amizade ao longo de todo este tempo. O meu reconhecimento vai dirigido ao rigor académico, sentido de responsabilidade e gosto pela ciência que ele partilha com os seus orientandos.

Devo também muito do meu percurso à Doutora Maria da Graça Miguel com quem me une uma amizade de longa data, e a quem agradeço todo o seu apoio sempre que preciso.

Gostaria também de mencionar em geral a todos os técnicos e funcionários da FCT com os quais, de uma ou outra forma, convivi durante a minha passagem pela Ualg. Quero agradecer também aos colegas de bancada: Paulo, Gonçalo, Florinda e Ângela pela sua ajuda e camaradagem.

Um agradecimento especial aos amigos que sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons e dos outros: um muito especial a Laurita, Denise Martins, Cláudia, Maribela Pestana e Pedro Correia e Ana Cavaco.

Quero deixar também um reconhecimento à Fundação para a Ciência e Tecnologia por ter-me concedido uma bolsa de doutoramento, sem a qual não me houvesse sido possível chegar até aqui.

Por último, mas não por isso menos importante, quero agradecer a minha família por estar sempre presente e pelo seu amor e apoio incondicional.

## RESUMO

Sabe-se que os vírus de plantas alteram o metabolismo secundário. Quando a infecção viral ocorre, a planta desencadeia uma resposta de resistência ativa que envolve o reconhecimento de elicitores codificadas pelo vírus através da interação direta ou indireta com produtos de genes de resistência. Esta por sua vez ativa a sinalização a jusante, o que leva a prevenção da propagação viral, confere resistência aos agentes patogênicos, e muitas vezes desencadeia respostas defensivas tais como a acumulação de ácido salicílico (AS) e resposta de hipersensibilidade (Singh et al., 2004).

A descoberta de uma polimerase RNA dependente (RdRp) em Tabaco e *Arabidopsis* (Yu et al., 2003) envolvida na resistência viral induzida por ácido salicílico (AS), sugere que os RNAs de interferência (iRNAs) poderiam ter um rol mecânico na resistência sistêmica adquirida (SAR). Existem também referências que indicam uma sobreposição das vias de sinalização que controlam a resistência ao AS e a indução do silenciamento. Brignetti et al., 1998 demonstrou que a proteína 2B era capaz de inibir a indução de iRNA dirigida contra RNA viral, e também inibia a resistência adquirida por AS à replicação viral e dispersão em tecidos diretamente inoculados (Ji e Ding, 2001).

Neste trabalho foi-se avaliar a possibilidade de usar o *Cucumber Mosaic vírus* ou o seu gene supressor para melhorar as características de produção de metabolitos secundários e outros produtos de elevado valor em plantas. Muitos produtos de transformação de plantas utilizados como matéria-prima da indústria cosmética e farmacêutica, são apreciados pela sua composição e elevado teor em princípios ativos.

Para evitar a utilização do CMV que é um vírus agressivo e possui um elevado número de hospedeiros, foi-se construir um vector para expressão transiente local do gene supressor e também recorrendo a um vírus atenuado, para expressão sistêmica.

A avaliação decorreu em plantas do género *Thymus*, nalguns casos também em *Nicotiana benthamiana* e *Coriandrum sativum*.

Foram encontradas alterações nos alcaloides, terpenoides e flavonoides.

O aumento nestes metabolitos, muitos deles responsáveis pelo poder redutor dos extratos vegetais, ofereceu a alternativa de estudar a sua aplicação na produção de nanopartículas metálicas, a partir dos respectivos íons metálicos.

**Palavras-chave:**

Transformação transiente, aromáticas, vectores virais, nanopartículas, metabolismo secundário.

## ABSTRACT

It is known that plant viruses change secondary metabolism. When viral infection happens, the plant triggers an active resistance response that involves the recognition of elicitors encoded by the virus through direct or indirect interaction with products of resistance genes. This in turn activates the downstream signaling, which leads to prevention of viral spread, confers resistance to pathogens, and often triggers defensive responses such as salicylic acid accumulation and hypersensitive response (Singh et al, 2004).

The discovery of an RNA dependent polymerase (RdRp) in Tobacco and Arabidopsis (Yu et al, 2003) involved in viral resistance induced by salicylic acid (SA), suggests that the interfering RNAs (iRNAs) could be a mechanistic role in systemic acquired resistance (SAR). There are also references that suggest an overlapping of signaling pathways that control resistance to SA and induction of silencing. Brignetti et al., 1998 2b demonstrated that the protein was able to inhibit the induction of iRNA directed against viral RNA, as well as resistance acquired by inhibiting viral replication and SA dispersion directly inoculated tissues (Ji & Ding, 2001)

In this work was to evaluate the possibility of using *Cucumber mosaic virus* or the CMV gene suppressor, to improve the characteristics of production of secondary metabolites and other high-value products in plants. Many plant transformation products used as raw material for cosmetics and pharmaceutical industry, are appreciated for their composition and high content of active ingredients.

To avoid the use of the CMV virus, because of its aggressivity and the large number of hosts, a vector for local transient expression of the suppressor gene was constructed, based on attenuated virus for systemic expression.

The evaluation was conducted in *Thymus* genus and, in some cases, in *Nicotiana benthamiana* and *Coriandrum sativum*.

Changes were found in alkaloids, terpenoids and flavonoids.

The increase in these metabolites, many of them responsible for the reducing power of plant extracts, led to the study of their use in the production of metal nanoparticles, from the corresponding metal ions.

### **Keywords:**

Transformation, transient , aromatic, viral vectors, nanoparticles, secondary metabolism

## ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

AGO proteína Argonauta

AJ ácido jasmónico

AS ácido salicílico

amiRNA artificial miRNA

Avr Factor de avirulência

BCIP 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

CMV *Cucumber mosaic virus*

CaMV *Cauliflower mosaic virus*

cDNA DNA complementar

dpi dias após inoculação

DRX Difração de RX

CMV *Cucumber mosaic virus*

CP Proteína da cápside

DNA Ácido desoxirribonucleico

dsRNA RNA sob a forma de cadeia dupla

DCL Dicer

DNase Desoxirribonuclease

CG-EM Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

GFP Proteína green fluorescente

HPLC High performance liquid chromatography

iRNA RNA de interferência

lhRNA long hairpin RNA

RNA Ácido ribonucleico

mRNA RNA mensageiro

miRNA micro RNA

MES Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidratado

NPs nanopartículas

OD densidade óptica

ORF Open Reading Frame

pb par de bases

PCR Polymerase chain reaction  
PTGS Silenciamento génico pós-transcricional  
RdR1 RNA polimerase 1 endógena  
RISC Complexo de silenciamento induzido por RNA  
RNA ácido Ribonucleico  
RNase Ribonuclease  
ROS espécies reativas de oxigénio  
RT-PCR Reação da Transcriptase Reversa seguida de reação em cadeia da polimerase  
SSCP Polimorfismo conformacional de cadeia simple  
SA ácido salicílico  
siRNA pequeno RNA de interferência  
ssRNA RNA de cadeia simples  
TEM Microscopia de Transmissão Eletrónica  
TRV Tobacco rattle virus  
UV ultravioleta  
VIGs Silenciamento génico induzido por vírus  
VSRs supressores virias de silenciamento por RNA  
WT tipo selvagem

## Índice

	Declaração da Autoria do trabalho	I
	Agradecimentos	II
	Resumo	III
	<i>Abstract</i>	V
	Abreviaturas	VI
	Índice	VIII
<b>Capítulo 1</b>	<b>Introdução Geral</b>	
1.1	<i>Cucumber mosaic virus</i>	1
1.2	Os Vírus como agentes Patogénicos nas Plantas	3
1.3	Sistema de defesa nas plantas hospedeiras	7
1.4	A proteína supressora 2B	10
1.5	As aplicações dos vírus na Biotecnologia	11
1.6	Os metabolitos secundários	13
1.7	O género <i>Thymus L</i> , <i>Thymus vulgaris L</i> e <i>Thymus Citrodonus L</i>	15
1.8	<i>Coriandrum sativum L</i>	17
1.9	Alterações do metabolismo secundário por vírus	17
1.10	A aplicação de vetores virais na formação de nanopartículas	18
1.11	Objetivos	23
<b>Capítulo 2</b>	<b>O <i>Cucumber mosaic virus</i>, a sua capacidade de infetar plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>, <i>Thymus vulgaris</i> e <i>Coriandrum sativum</i> e os seus efeitos nos metabolitos</b>	
2.1	Introdução	24
2.2	Materiais e Métodos	26
2.2.1.	Material biológico	26
2.2.2	Crescimento das plantas em condições controladas	26
2.2.3	Preparação dos transcritos	26
2.24	Inoculação de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> com os transcritos	27

2.25	Extração de RNA	27
2.26	Imunocaptura (IC/RT-PCR)	28
2.2.7	Clonagem e Análise por SSCP	29
2.28	Infeção por transmissão mecânica de plantas de <i>Thymus vulgaris</i> e <i>Coriandrum sativum</i>	29
2.2.9	Avaliação do conteúdo de nicotina em plantas de <i>Nicotiana</i> infetadas com CMV	29
2.2.9.1	Reagentes	29
2.2.9.2	Preparação do extrato bruto	30
2.2.9.3	Cromatografia em fase líquida	30
2.2.10	Extração e análise do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> e <i>Coriandrum sativum</i> em plantas inoculadas com CMV - Fny	30
2.2.10.1	Obtenção dos óleos essenciais	30
2.2.10.2	Análises da composição dos óleos essenciais por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa (CG-EM)	31
2.3	Resultados	31
2.3.1	Infeção das plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> com os transcritos CMV-Fny	31
2.3.2	Inoculação de Plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Thymus vulgaris</i> e <i>Coriandrum sativum</i> por transmissão mecânica	32
2.3.3	Avaliação da variabilidade genotípica do CMV em <i>Nicotiana</i>	34
2.3.4	Comparação dos valores de nicotina entre plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> infetadas com CMV e plantas saudáveis	36
2.3.5	Resultados obtidos na análise CG-EM entre os óleos essenciais de plantas saudáveis e de plantas infetadas de <i>T. vulgaris</i> com CMV	35
2.3.6	Resultados obtidos na análise GC-MS dos óleos essenciais de <i>Coriandrum sativum</i> infetados com CMV e em plantas saudáveis	37

2.4	Discussão	39
<b>Capítulo 3</b>	<b>A proteína supressora CMV – Fny 2B e seus efeitos na supressão transiente</b>	
3.1	Introdução	44
3.2	Materiais e Métodos	45
3.2.1	Clonagem da proteína supressora 2B do CMV Fny	45
3.2.1.1	Transformação genética de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C1C58	4/
3.2.1.2	Outros plasmídeos utilizados pK7-ERGFP; lhGFP; amiRNA-GFP	47
3.2.1.3	Transformação em <i>A. tumefaciens</i>	48
3.2.2	Ensaio de coinoculação de <i>N. benthamiana</i>	48
3.2.3	Inoculação de plantas de <i>Thymus citriodorus</i>	49
3.2.4	RT-PCR para confirmar a expressão da proteína 2B em plantas de nicotina e tomilho	49
3.2.5	Western Blot	49
3.2.6	Microextração em Fase sólida (MEFs) para avaliação de voláteis	50
3.2.6.1	Preparação da amostra	50
3.2.6.2	Análise das amostras obtidas	50
3.3	Resultados	51
3.3.1	A Proteína supressora 2B do CMV suprime o silenciamento dos indutores lh-GFP e ami-GFP	51
3.3.2	Expressão de GFP monitorizada por western blot no ensaio de supressão	53
3.3.3	Confirmação da acumulação de mRNA 2B em plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> e de <i>Thymus citriodorus</i>	53
3.3.4	Efeito da expressão transiente do supressor 2B no perfil dos voláteis em <i>Thymus citriodorus</i>	54
3.3.5	Aumento na concentração de Citral e Linalol nos perfis de voláteis em tomilhos expressando a proteína	58
3.4	Discussão	62
<b>Capítulo 4</b>	<b>Construção do Vector TRV para expressão do</b>	

	<b>supressor viral 2B do CMV, em <i>Nicotiana benthamiana</i> e <i>Thymus</i></b>	
4.1	Introdução	64
4.2	Materiais e Métodos	64
4.2.1	Construção do PDONR-ZEO-PEBV-2B	66
4.2.2	Transformação genética de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1 com os vetores pTRV1 e pTRV2-2B	66
4.2.3	Inoculação das plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Thymus vulgaris</i> e <i>Thymus citriodorus</i> com o vetor pTRV2-2B	67
4.2.4	Confirmação da presença de RNA com a sequência da proteína supressora 2B por Real time RT-PCR	67
4.2.5	Confirmação da atividade supressora do vetor pTRV-2B	68
4.2.6	Preparação dos extratos de <i>Nicotiana benthamiana</i> para HPLC	68
4.2.7	HPLC dos extratos de <i>Nicotiana benthamiana</i>	68
4.3	Resultados	68
4.3.1	Avaliação da supressão em <i>N. benthamiana</i>	68
4.3.2	Avaliação dos resultados obtidos no Real time RT-PCR em plantas de <i>Nicotiana</i> e tomilhos	69
4.3.3	Concentração em nicotina, ácido clorogénico e rutina nos extratos de nicotiana, obtidos a partir de plantas infetadas com o vetor pTRV2-2B	70
4.4	Discussão	71
	<b>Capítulo 5 A utilização do CMV e do vector viral pTRV2-2B na preparação de nanopartículas de Prata</b>	
5.1	Introdução	74
5.2	Materiais e Métodos	77
5.2.1	Preparação do material vegetal para obtenção de extratos	77
5.2.2	Obtenção dos diferentes extratos de <i>N. benthamiana</i>	78
5.2.3	Síntese de nanopartículas de prata	78
5.2.4	Análise da prata em solução por Espectroscopia de Absorção atômica	78

5.2.5	Monitorização da formação de NPs de prata por UV-Vis	78
5.2.6	Caracterização das nanopartículas obtidas por Difração de RX (DRX) e Microscopia de Transmissão Eletrónica (TEM)	79
5.2.7	Determinação do tamanho médio das NPs a partir das imagens TEM	79
5.2.8	Determinação de cloretos	79
5.3	Resultados	79
5.3.1	Caracterização por Microscopio electrónico de transmissão (TEM)	79
5.3.1.1	Imagens com escala 1µm e 500 nm Resultado da Quantificação dos iões de prata em solução após a formação de nanopartículas, nos extratos de <i>Nicotiana benthamiana</i>	79
5.3.1.2	Imagens com Escala 100-200 nm	88
5.3.2	A dimensão das Nps	91
5.3.3	Resultado da Quantificação dos iões de prata em solução após a formação de nanopartículas, nos extratos de <i>Nicotiana benthamiana</i>	93
5.3.4	Monitorização da síntese por UV-Vis	95
5.3.5	Caracterização das diferentes nanopartículas por DRX	96
5.3.5.1	Difratograma de DRX	96
5.3.5.1.a	Amostra de NPs provenientes de <i>N. benthamiana</i> sem inoculação	96
5.3.5.1.b	Amostra de NPs provenientes de <i>N. benthamiana</i> inoculadas com pTRV-2B	97
5.3.5.1.c	Amostra de NPs provenientes de <i>N. benthamiana</i> infetadas com CMV	98
5.3.5.1.d	Amostra de NPs provenientes de <i>N. benthamiana</i> infetadas com CMV	99
5.4	Discussão	100
<b>Capítulo 6</b>	<b>Conclusões</b>	105
<b>Capítulo 7</b>	<b>Referencias Bibliográficas</b>	109

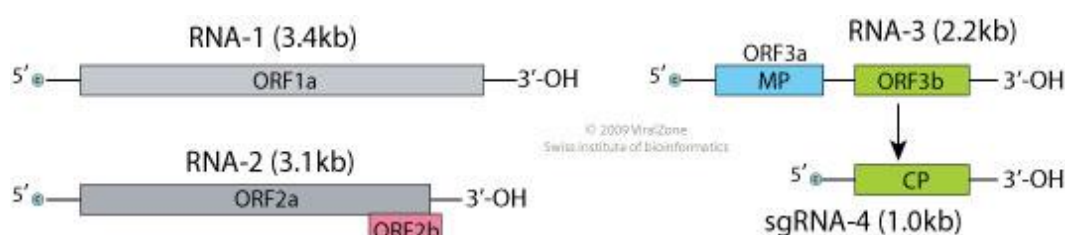


## Capítulo 1- Introdução

### 1.1. Cucumber mosaic virus (CMV)

O CMV é um vírus pertencente à família *Bromoviridae*. Possui um amplo espectro de hospedeiros, infectando cerca de 800 espécies em mais de 70 famílias de plantas Monocotiledóneas e Dicotiledóneas, e é transmitido por mais de 60 espécies de afídios (Garcia Arenal et al., 2000). CMV é um vírus generalizado e economicamente importante que pertence a classe de patógenos transmitidos de modo não persistente. É difícil de controlar porque passa rapidamente de plantas infectadas a plantas saudáveis tendo como vector afídios.

O genoma do CMV está constituído por três segmentos RNA positivos que codificam 5 proteínas: as proteínas replicases 1a e 2a, a proteína do movimento 3a, e a partir do RNA subgenómico a proteína da cápside e a proteína multifuncional 2B (Boccard e Baulcombe, 1993). Para que as plantas sejam infectadas é precisa a inoculação dos três tipos de partículas.



**Fig. 1.1.1** Genoma do CMV

Extraído de [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/135.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/135.html)

O RNA1 codifica uma única proteína 1a que é necessária para a replicação do genoma viral. O domínio N terminal possui atividade metiltransferase e o C terminal é uma alegada helicase que descarrega o RNA de cadeia dupla durante a replicação viral.

O RNA3 codifica a proteína 3 a ou proteína do movimento, envolvida na circulação célula a célula e a longa distancia, e a proteína da cápside (Schwinghamer e Symons, 1977 citado em Rizzo e Palukaitis, 1989). A proteína da cápside é expressa a partir de RNA subgenómico e é determinante para a transmissão por afídeos.

O RNA2 codifica as proteínas 2 a e 2 b. A proteína 2a está envolvida na replicação do genoma viral e tem características de RNA polimerase RNA dependente (Ding et al.,

1994). A proteína 2 b é traduzida a partir de uma cadeia de RNA separada, subgenómica, chamada RNA 4 A (Ding et al., 1994).

Para além desta estrutura básica de três segmentos RNA positivos, existem algumas estirpes de CMV que possuem um quinto tipo de RNA, designado por RNA5, e outras que encapsulam um RNA satélite (Palukaitis e Garcia-Arenal, 2003). O RNA5 é constituído por uma população variada de moléculas com 300 nucleótidos derivados da região terminal 3', imperfeitamente conservada, dos RNAs genómicos, RNA2 e RNA3, e poderá desempenhar um papel importante ao nível da replicação viral (Blanchard et al., 1996). O RNA satélite existente em algumas estirpes de CMV, é uma molécula pequena completamente dependente do genoma viral para sua replicação e propagação, que não auxilia ao vírus em nenhuma função essencial. Os RNA satélites variam de 335 a 405 nucleótidos e ocorrem na natureza com algumas variantes que podem atenuar ou agravar os sintomas induzidos pelo vírus auxiliar (Garcia Arenal e Palukaitis, 1999).

O CMV é um vírus com genoma multipartido. Este tipo de vírus encapsida separadamente os segmentos do seu genoma dividido e, para que a infeção aconteça, todas as partículas virais têm que infestar a célula hospedeira. Fraile et al., (1997) fazem uma análise das hipóteses que tentam explicar a evolução nestes vírus. Nessa análise encontram alguns autores que afirmam que a evolução dos vírus multipartidos acontece no sentido de favorecer o intercâmbio genético. Sustentam a sua hipótese no facto de que o intercâmbio genético contribuiria para contrariar a perda de aptidão, relacionada com a acumulação de mutações, dada a elevada taxa de erros existente na replicação dos vírus RNA. Uma outra hipótese defende que a taxa de replicação de pequenos RNAs é mais rápida que a de um genoma indiviso, favorecendo a seleção intracelular dos mesmos. No mesmo trabalho e contrariando estas hipóteses, descreve-se uma análise de 217 isolados de CMV provenientes de Espanha, onde foram encontrados 4% de isolados rearranjados e 7% de isolados recombinantes, mas os mesmos não se estabeleciam na população. As múltiplas limitações à evolução das proteínas virais podem ser um fator importante na determinação da estabilidade das populações de vírus em plantas, podendo ser estas explicadas, pela multifuncionalidade das proteínas virais e a necessidade de estabelecer interações funcionais com fatores codificados pelos hospedeiros e vectores (Garcia Arenal e MacDonald., 2003).

A transmissão é também um mecanismo importante em termos evolutivos, a estratégia de vírus que se transmitem de modo persistente difere do tipo não persistente. Os vírus influenciam a transmissão alterando traços nos hospedeiros que determinam a sua

qualidade para os vectores. Os vírus não persistentes são transportados no aparelho bucal do afídio, têm uma vida muito curta fora da planta e o tempo de aquisição é de poucos segundos. Deve ser inoculado rapidamente para se propagar.

## **1.2. Os Vírus como Agentes patogénicos nas Plantas**

Os agentes patogénicos intervêm na natureza de maneira ambígua. Se por um lado afetam o desenvolvimento e composição das populações, por outro são propulsores da variabilidade e dinâmica das populações naturais. Os agentes patogénicos diferem nos seus modos de ação e nos hospedeiros que afetam. O modo de atuação de alguns patógenos envolve a morte do hospedeiro enquanto que outros necessitam do hospedeiro vivo para poder completar o seu ciclo de vida. Os vírus pertencem a este último tipo embora a infeção possa conduzir eventualmente à morte das células de acolhimento. Os vírus são importantes patógenos na medida que causam inúmeros danos nas culturas, mas é a sua simplicidade genómica aliada a uma grande complexidade de ação, que desperta a curiosidade sobre eles.

Pela sua dimensão os vírus atuam principalmente no meio celular da planta. Assim os hospedeiros estabelecem interações com o vírus que envolvem mecanismos de elevada sofisticação e complexidade. Estes mecanismos compreendem fenómenos como a competição pelos recursos, a degradação do RNA viral, o estabelecimento de respostas metabólicas que desligam ou ativam genes etc.

A estratégia de sobrevivência dos vírus baseia-se não só na sua adaptabilidade a estes entornos complexos, mas também no desenvolvimento de estratégias que lhes permitam tirar partido dos mesmos. O entorno do hospedeiro é assim responsável pela evolução viral.

Uma das respostas por parte das plantas à infeção viral é o *Post-transcriptional gene silencing* (PTSG). Trata-se de um mecanismo de regulação génica que existe também em outros eucariotas, conhecido com o nome de repressão em fungos e interferência por RNA (RNAi) em animais inferiores e superiores (Yu e Kumar, 2003).

Neste mecanismo o silenciamento de RNA ocorre pela degradação de RNA codificante na fase de pós-transcrição, a partir de regiões de RNA com estrutura secundária que se encontram no citoplasma celular. O mecanismo aparece muito conservado nos diversos taxa observados (Susi et al., 2004). Na atualidade aceita-se que, entre outras funções, o silenciamento génico nas plantas é um mecanismo de defesa contra a infeção viral.

Segundo Vance e Vaucheret, (2001) a visão emergente é que o silenciamento por RNA é parte de uma sofisticada rede de vias interligadas para a defesa celular, vigilância do RNA e desenvolvimento e que pode tornar-se uma ferramenta poderosa para manipular a expressão de genes experimentalmente.

O silenciamento envolve um conjunto de fenômenos comuns aos eucariotas para o qual se tem desenvolvido um modelo do mecanismo geral. O fenômeno de silenciamento de RNA em plantas partilha 4 passos bioquímicos consensuais: a) indução por regiões de RNA de dupla cadeia (dsRNA); b) processamento do dsRNA em pequenos siRNAs de 18-25 nucleótidos; c) metilação de RNAs; d) incorporação de uma das cadeias de RNA num complexo chamado RISC (complexo que induz o silenciamento de RNA) que o associa parcial ou completamente com um RNA alvo Ruiz Ferrer e Voinnet, 1998. O RNA de dupla cadeia pode ter origem na replicação viral, em repetições invertidas, em transcrição convergente de transgenes ou transposones, e pode ser sintetizado por polimerases RNA dependentes que utilizam RNA de cadeia simples como molde ou a sua formação pode ser programada geneticamente (Ruiz Ferrer e Voinnet, 1998). O dsRNA é clivado por endoribonucleases (chamadas DICER) em pequenos fragmentos chamados siRNAs que se caracterizam por possuir migração electroforética bimodal, com 2 nucleótidos em posição 3' não emparelhados, um grupo fosfato na posição 5' e um hidroxilo na posição 3' (Cullen, 2004). Este processo é ATP dependente e envolve interações com outras proteínas como a Argonauta que se liga ao dsRNA e RNA helicases.

Os ditos fragmentos vão hibridar com RNA de cadeia simples (homólogos com o RNA genómico viral ou, no caso do silenciamento induzido por transgênese, RNA da planta homólogos com o transgene) e são então incorporados no complexo RISC conduzindo a uma continuada degradação do RNA de sequencia específica e supressão viral ou silenciamento genético (Whaterhouse et al., 2001).

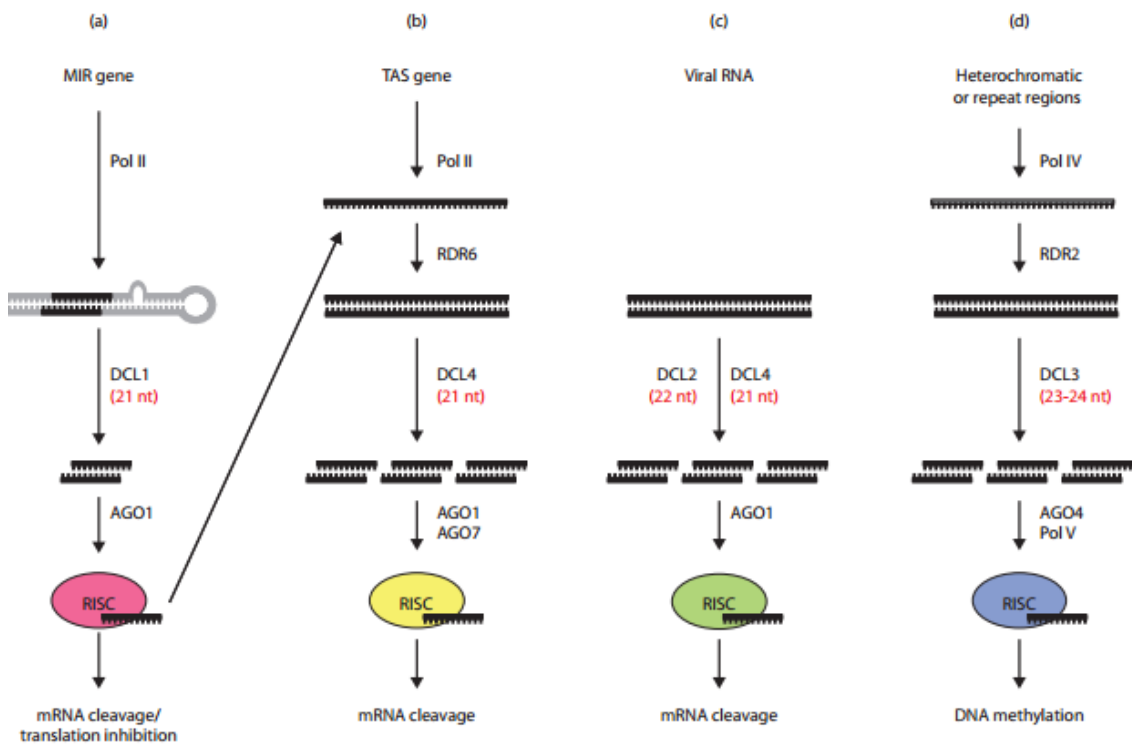
A maioria dos vírus de plantas são de RNA e replicam-se por meio de uma RNA polimerase RNA dependente, a qual produz um dsRNA intermediário. As plantas utilizam dsRNAs como indutores da degradação de uma sequência viral determinada. A indução do silenciamento génico por transgenes parece ser consequência de esta adaptação viral em plantas. Os transgenes que provocam silenciamento são agora utilizados rotineiramente para produzir dsRNAs ou hairpins RNAs (Smith et al, 2000). Os hairpins são um tipo de estrutura secundaria do RNA que surgem por emparelhamento de pares de bases intramoleculares, quando duas sequências

complementares em uma única molécula de mRNA se encontram e se unem, depois de uma dobragem ou enrolamento da molécula.

Um dos aspetos mais intrigantes do silenciamento é que pode ser induzido localmente e depois propagar-se a locais distantes através do organismo (Palauqui et al., 1997).

As experiências de enxertia realizadas por Palauqui revelaram a transmissão sistémica do PTSG. O silenciamento de uma nitrato reductase e um transgene codificando glucuronidase, foi transmitido do porta-enxerto silenciado para o enxerto não silenciado. Nas plantas o silenciamento gera um sinal que se propaga desde o sitio de iniciação às células vizinhas através de os plasmodesmos o que permite a comunicação direta de moléculas entre células vegetais adjacentes. O silenciamento também se propaga sistemicamente por longas distâncias através do floema. Uma pesquisa recente (Molnar et al., 2011) tem mostrado conclusivamente que pequenas moléculas de RNA não-codificantes (sRNA com 21 a 24 nucleótidos de comprimento) são componentes do silenciamento móvel.

Para mostrar a diversidade de rotas existentes no silenciamento por RNA em plantas Molnar et al, (2011) apresentam um diagrama a partir das funções da família de proteínas DCL (Figura 1.2.1). Estas rotas que se esquematizam individualmente podem também interatuar.



**Figura 1.2.1-** Diagrama esquemático das vias do silenciamento em plantas. Uma visão geral dos (a) microRNA, (b) siRNA (c) siRNA viral e (d) siRNAs vias heterocromáticas. siRNAs são processados a partir de precursores dsRNA por proteínas parecidas as DICER. As polimerases dependentes de RNA (RDR) convertem transcritos gerados pela polimerase DNA dependente II (Pol II) e IV (Pol IV) em dsRNA. Se indicam as RDR, DLC e proteínas AGO asi como os tamanho e funções dos siRNAs produzidos. RISC é o complexo de indução do silenciamento de RNA, as diferentes composições se indicam com cores diferentes. (Extraído de Molnar et al, 2011).

O êxito das infecções virais resulta da capacidade do vírus para prevenir a degradação do seu genoma e da sua expressão, fenómeno desencadeado pelo silenciamento génico pós-transcricional. Ao longo do seu processo evolutivo alguns vírus têm desenvolvido uma estratégia para contornar o PTSG com recurso a moléculas que atuam como supressoras do silenciamento. Uma classe importante de supressores que bloqueiam o silenciamento, são proteínas virais sugerindo uma coevolução da defesa e contra defesa entre a planta hospedeira e o vírus invasor ao nível da disseminação sistémica (Roth, et al., 2004).

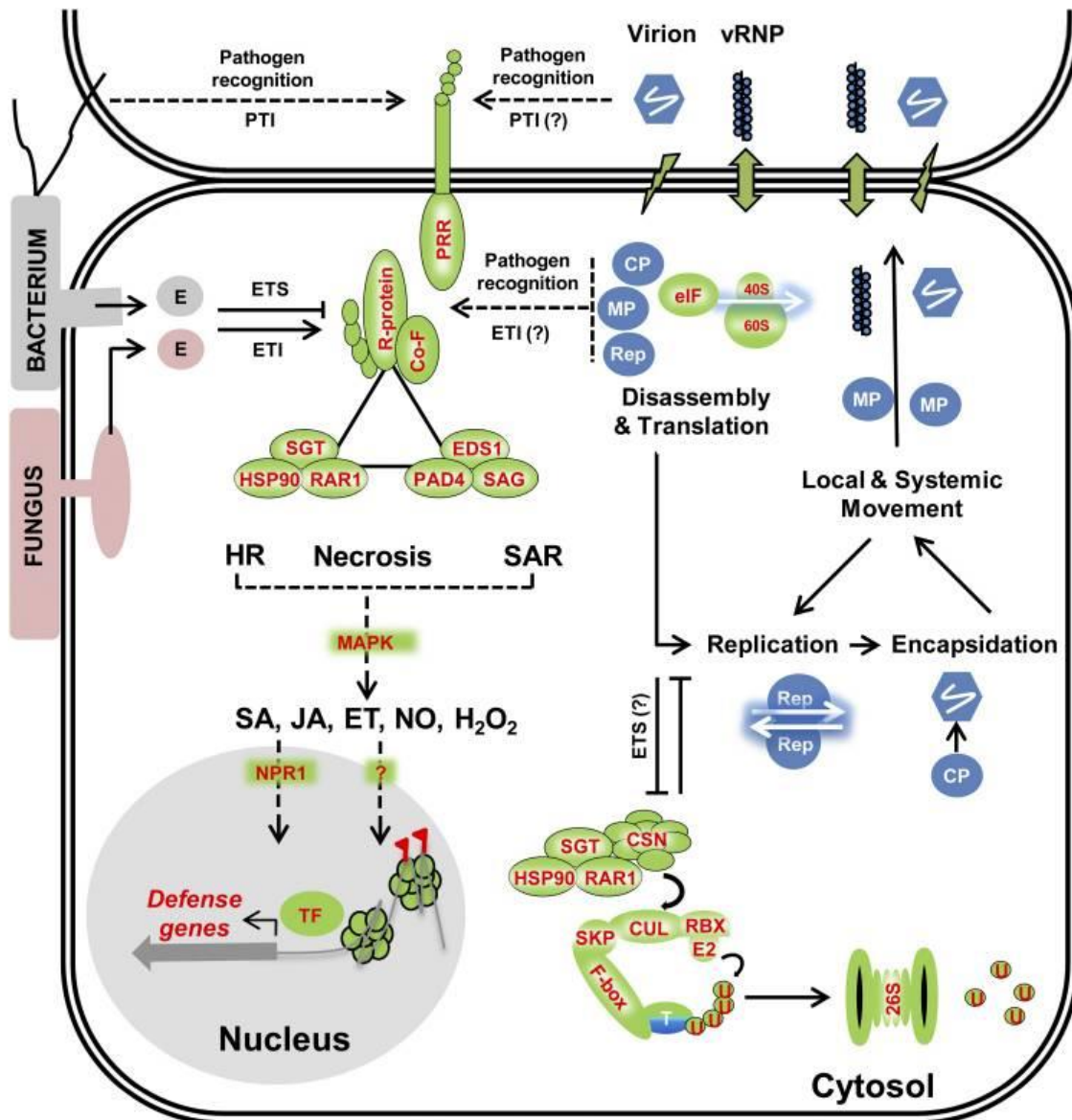
Os ensaios de expressão transientes permitem uma rápida identificação dos supressores virais, com recurso à *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas são simultaneamente inoculadas com uma estirpe de agrobacterium que induz o silenciamento de RNA de um gene repórter (habitualmente GFP) e com uma outra estirpe que expressa o supressor. A espécie vegetal comumente utilizada para estes ensaios é a *Nicotiana benthamiana*. Após alguns dias, as plantas começam a exibir a cor verde da proteína fluorescente no local da inoculação, quando observadas com luz ultravioleta. Entre três a cinco dias depois inicia-se o silenciamento local e a cor verde desaparece. O processo de silenciamento sistémico acontece porque o silenciamento inicialmente desencadeado, não fica confinado ao ponto de inoculação. O sinal sistémico traslada-se a outros locais na planta, pelos plasmodesmos ou pelo floema (Mallory et al., 2005).

No caso dos supressores que afetam o metabolismo dos pequenos RNAs, existem supressores que impedem o silenciamento bloqueando a produção de siRNAs e outros que se ligam aos siRNAs sequestrando-os do sistema talvez bloqueando a sua função. O efeito dos supressores sobre o metabolismo dos pequenos RNAs, pode afetar também outro tipo de reguladores RNAs (Roth et al., 2004). Por exemplo, plantas expressando

supressores virias de silenciamento génico que alteram a acumulação de miRNA, exibem anomalias durante o desenvolvimento vegetativo e floral (Mallory et al., 2005). No caso do silenciamento sistémico há também supressores com um papel ativo. Existem evidências de que alguns supressores podem ser efetivos no silenciamento sistémico originado em ensaios de tipo transientes, mas não mostrar capacidade supressora nas linhas transgénicas estáveis e vice-versa.

### **1.3. Sistemas de defesa nas plantas hospedeiras**

O sistema defensivo das plantas depende da **imunidade inata** de cada célula e dos sinais que delas derivam (Jones et al., 2006). Pensa-se que existam dois níveis no sistema defensivo inato. A defesa primária, ou basal, é desencadeada principalmente por recetores de transmembrana que reconhecem moléculas conservadas libertadas por uma variedade de patógenos, os quais podem superar essas defesas basais, pela secreção de efetores específicos (Wladimir et al., 2008). Posteriormente, existe um reconhecimento subsequente destes efetores por recetores especializados (proteínas de resistência), que ocorre ao nível citoplasmático, e que desencadeia a indução de uma segunda camada de respostas de defesa da planta. Estas respostas são qualitativamente semelhantes às respostas primárias de defesa; no entanto, são geralmente mais rápidas e mais fortes (Wladimir et al., 2008). Os genes R são polimórficos e evoluem rapidamente, acompanhando a evolução dos genes de avirulência do patógeno. As proteínas R podem interatuar diretamente com os fatores de avirulência (Jones et al., 2006) ou de modo indireto, reconhecendo sinais próprios do hospedeiro afetados pelo Avr do patógeno (Jones et al., 2006).



**Fig. 1.3.1** Resposta imune antiviral análoga à resposta imune de Bactérias e Fungos.

Os vírus normalmente entram nas células vegetais através de dano celular (raio) e passam de uma célula para outra principalmente através dos plasmodesmata como complexos de ribonucleoproteínas virais (vRNP) e / ou viriões. Proteínas codificadas por vírus, tais como replicase (Rep), proteína da cápside (CP), e proteína de movimento (MP) são convertidos no interior do citosol da célula hospedeira e funcionam cooperativamente na tradução, replicação, encapsidação, e o movimento do vírus. Semelhante aos eventos que ocorrem durante as respostas imunitárias bacterianas e fúngicas, fatores associados a vírus, tais como componentes de viriões ou proteínas codificadas pelo vírus, pode ser detetadas pelos PRRs da superfície celular ou receptores NB-LRR citosólicos (por exemplo, proteínas R) para desencadear respostas ETI ou suscetíveis (ETS), culminando com fenótipos HR, SAR, e / ou necrose. As Proteínas efetoras bacterianas e fúngicas segregadas envolvidas na sinalização ETI são indicadas por "E." De um modo similar às respostas ETI bacterianas e fúngicas, as respostas ETI desencadeadas vírus também envolvem complexos de proteínas SGT1 / RAR1 / HSP90 (Liu et al., 2004) e EDS1 / PAD4 / SAG101 (Zhu et al., 2011). Interações combinatórias entre proteínas virais, proteínas R, cofatores R (Co-F), SGT1 / RAR1 / HSP90, e EDS1 complexos / PAD4 / SAG101 mediam as distintas mudanças a jusante, nos níveis de AS, AJ, etileno (ET), NO, e os níveis de peróxido de hidrogênio ou a sinalização através de cascatas de sinalização da Kinase MAP. NPR1, uma

proteína núcleo-citoplasmática crítica para as respostas de defesa não viral mediadas por AS, intervém nas alterações na expressão da transcrição de genes de defesa através de interações com fatores de transcrição específicos (TFS) (Dong, 2004). A maior das respostas desencadeadas pelo vírus a AS, parece ser independente de NPR1 (Whitham et al., 2003). Além das mudanças de transcrição mediada por TF, os vírus também provocam modificações da cromatina incluindo mudanças na metilação do DNA (bandeira vermelha) e aumento das taxas de recombinação homóloga (Kovalchuk et al, 2003; Boyko et al, 2007; Kathiria et al, 2010). O complexo SGT1/RAR1/HSP90 também interage com componentes da CSN para mediar a degradação de proteínas virais ou qualquer proteína do hospedeiro (T) via o complexo 26S-proteasome (Liu et al, 2002b; Shirasu, 2009). Os proteasome 26S tem também funções no núcleo (Padmanabhan e Dinesh Kumar-2010). A ubiquitina é abreviada como "U." Paradigmas desconhecidos ou supostos são indicados como "?" Extraído de Mandadi K e Scholthof KB, 2013.

Entre as técnicas disponíveis para combater infecções virais, uma das abordagens mais eficaz e sustentável é a implantação de resistência genética direcionada diretamente contra os vírus (Mazier et al., 2011). Foram caracterizados genes de resistência dominantes e recessivos a nível molecular e estão emergindo novos princípios de imunidade viral inata, associados ao silenciamento de genes (Mazier et al., 2011). A **resistência genética passiva** resulta da ausência no hospedeiro duma variante genética que permita a infeção. Nas interações proteína-viral -proteína do hospedeiro podem acontecer casos de perda de interação por mutações, *knock-down* nas proteínas do hospedeiro, que resultam em resistência. Tem sido demonstrado que a resistência recessiva contra potyvirus mediada pelo fator de alongação proteico eIF4E do hospedeiro, resulta de mutações na proteína eIF4E, que prejudicam a sua interação direta com a proteína VPg de potyvirus (Mazier et al., 2011).

Os mecanismos de **resistência genética induzida** desencadeiam-se posteriormente à infeção, como acontece na resposta hipersensitiva (HR) (Jones et al., 2006). Na HR o vírus é limitado às zonas de infeção inicial provocando a morte celular e evitando assim a dispersão do vírus noutras zonas da planta. A partir da HR, pode-se desencadear uma resistência local adquirida (LAR), que é uma resposta defensiva ativada nas células vizinhas, ou resistência sistémica adquirida (SAR) quando se propaga por toda a planta (Jones et al., 2006). A SAR é acionada durante uma interação incompatível, envolvendo o Avr e as proteínas R nas células inicialmente infetadas, e resulta no estabelecimento de resistência em tecidos afastados não infetados (Vlot et al., 2008).

A ativação de genes da defesa induz outras moléculas muito importantes no papel do estabelecimento dos mecanismos de defesa das plantas. São principalmente as fitohormonas ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) e etileno, e as espécies reativas de oxigénio como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> – e NO.

#### **1.4. A Proteína supressora 2B do CMV**

As vias de silenciamento por RNA funcionam como reações de defesa induzidas contra patógenos virais. Para neutralizar esse mecanismo de defesa, muitos vírus de plantas codificam supressores de silenciamento que lhes permitem proliferar nos seus hospedeiros específicos. A importância destes supressores é refletida no facto de que muitos deles já foram identificados como fatores de patogenicidade ou proteínas virais movimento como célula-célula ou de longa distância, essencial para a infetividade em hospedeiros indicados (Voinnet, 2005).

As proteínas supressoras de silenciamento de ARN e ADN de vírus não relacionados, não têm qualquer semelhança umas com as outras em qualquer sequência de codificação de proteína ou estrutura, sugerindo origens distintas e mecanismos funcionais variáveis para cada tipo supressor.

Uma das primeiras proteínas supressoras identificadas e estudadas foi a proteína 2B do *Cucumber mosaic virus* (CMV). A proteína 2B é um pequeno polipéptido de 12KDa que desempenha um papel importante na patogenicidade. Este papel parece estar estreitamente relacionado com as diversas funções que desenvolve: inibição do silenciamento por ligação aos siRNAs; participação na movimentação sistémica e celular do vírus como referido por Ding et al., (1995); proteção das defesas virais mediadas pelo ácido salicílico (Ji e Ding, 2001) etc. Tem sido demonstrado que a proteína 2B do CMV atua a nível nuclear (Guo e Ding, 2002) e poderia também ter um papel regulador na transcrição (Qi et al, 2004).

O fenótipo causado pela proteína 2B do CMV, varia desde aquele que não produz sintomas até aquele que produz sintomas severos, dependendo da estirpe viral a partir da qual o transgene foi isolado, e está relacionada com a ligação da proteína 2B à proteína Argonaute 1 (Lewsey et al., 2007 ; Zhang et al., 2006).

Para que a proteína 2B exerça a sua atividade supressora, parece indispensável estar ligada aos pequenos RNAs (Gonzalez, et al, 2009), embora tenham sido identificadas interações com proteínas do hospedeiro que podem oferecer mecanismos adicionais para bloquear o silenciamento por RNA (Díaz-Pendon et al., 2008). O seu alvo é principalmente o silenciamento sistémico porque bloqueia o movimento do sinal, mas tem um efeito menor sobre o silenciamento local (Brigneti et al., 1998)

Ziebell et al., (2011) mostraram a relação da proteína 2B do CMV com a via do ácido jasmónico. O efeito da proteína 2B na sinalização defensiva regulada por ácido jasmónico, pode ser significativo dado que o CMV é transmitido por afídios. O facto de

Ziebell ter comprovado um aumento da sobrevivência dos afídeos em plantas infetadas com o CMV de tipo selvagem quando comparadas com plantas controle infetadas com o mutante CMV  $\Delta$ 2B (mutante sem a sequência completa do gene 2B), indicia uma relação entre a proteína 2B e o desaparecimento de resistência. O autor presume a existência de moléculas elicitoras derivadas do gene CMV, que não a proteína 2B, a qual exerce seu efeito no sentido inverso, encobrindo ou inibindo os efeitos das moléculas elicitoras. A importância dos insetos na transmissão dos vírus de plantas é indiscutível e por isso o autor sugere um possível papel para as proteínas supressoras na manipulação das vias de sinalização. Deste modo a melhoria na sobrevivência do vector, enquanto transmissor do vírus, implicaria o estabelecimento de uma interação benéfica entre ambas partes.

### **1.5. As aplicações dos vírus na Biotecnologia**

São as próprias características dos vírus que fazem com que eles sejam um alvo para o desenvolvimento de aplicações no campo da biotecnologia vegetal (Fox et al., 1991).

A indução do silenciamento utilizando um vector viral (VIGS) demonstrou ser uma ferramenta útil para a análise da função dos genes (Lú et al., 2003). Existem vectores que induzem o silenciamento génico de forma rápida, desencadeando uma diminuição no nível de RNAm do gene de interesse, no prazo de uma semana após a infecção. O fenómeno de silenciamento desencadeado pode promover alterações metabólicas que afetem determinadas vias bioquímicas ou mecanismos moleculares específicos. O termo silenciamento génico induzido por vírus (VIGS) foi utilizado pela primeira vez por van Kammen em 1997 para descrever o fenómeno de recuperação da infecção viral (Anand, et al, 2013). Este mecanismo de defesa antiviral está agora a ser explorado, para conceber vectores para o estudo das funções de genes de plantas e aumentar a resistência das plantas aos vírus (Anand et al., 2013). A sua aplicação tem sido exclusivamente dirigida à técnica envolvendo vírus recombinantes para silenciamento da expressão de genes endógenos de plantas (Baulcome, 1999). O VIGS como ferramenta, está ganhando imensa popularidade no campo da genómica funcional, pois é um método muito simples usando agro-infiltração ou pistolas de genes biolísticos e os resultados são obtidos num período de apenas 2-3 dias (Anand et al., 2013).

Durante as últimas duas décadas, as plantas têm estado sob intensa investigação para fornecer um sistema alternativo de produção, em alta escala, segura e eficaz em termos de custos de proteínas recombinantes (Lico et al., 2008). Embora a engenharia genética

de plantas e a utilização de vetores virais para a expressão de gene heterólogo possa ser datada do início de 1980, o entendimento recente de virologia vegetal e progresso técnico em biologia molecular têm permitido melhorias significativas e ajuste fino desses vetores (Lico et al., 2008). Esses avanços permitiram o florescimento de uma variedade de novos sistemas de expressão baseados em vírus e sua ampla aplicação por grupos acadêmicos e da indústria (Lico et al., 2008).

Atualmente, está a ser colocada muita ênfase na utilização de vetores para a expressão de supressores em plantas (Scholthof, 2007). Durante as últimas duas décadas muito esforço em biotecnologia vegetal tem sido dirigido na geração de plantas transgênicas que expressam proteínas heterólogas. No entanto, o nível de expressão alcançado é frequentemente influenciado negativamente, pela ativação dos circuitos de silenciamento gênico (Lindbo et al., 1993). Acontece que as plantas efetivamente empregam esse mecanismo como uma proteção contra a invasão de RNA estranho, neste caso RNAm expresso pelo transgene (Scholthof, 2007). Os supressores virais atuam protegendo o genoma viral e RNAm de modo não específico, pelo que podem ser utilizados para aumentar a expressão do gene estranho em plantas. É possível encontrar muitas referências bibliográficas, que descrevem a aplicação dos supressores na promoção de níveis elevados de genes repórter expressos transitoriamente ou transgenicamente (Voinnet e Baulcombe, 1997; Brigneti et al., 1998; Voinnet et al., 2003).

A engenharia de algumas proteínas supressoras promete também novas aplicações na biotecnologia e na medicina, onde as moléculas de sRNA são de elevado interesse dada a sua capacidade reguladora de genes (Danielson e Pezacki, 2013). Um exemplo é o caso da p19, que se liga a sRNA com especificidade pelo tamanho mas não pela sequência, apresentando grande afinidade pelos duplexes de 20-22 nucleótidos. A especificidade na ligação da p19 tem-na tornado uma ferramenta única para sondar mecanismos de silenciamento complexos, numa variedade de sistemas (Danielson e Pezacki, 2013).

## **1.6. Os metabolitos secundários**

As plantas são capazes de produzir diversos componentes bioativos para além dos metabolitos primários, conhecidos como metabolitos secundários. Devem este nome ao facto de não serem diretamente utilizados para o crescimento e desenvolvimento delas. A capacidade de sintetizar metabolitos secundários tem sido selecionada no curso da

evolução em diferentes linhagens de plantas, quando os ditos compostos eram dirigidos para uma necessidade específica. A existência destes componentes é de extrema importância na competição e sobrevivência das plantas, desempenhando diversas funções entre as que se destacam: atuar nos mecanismos de defesa da planta contra patógenos e em situações de stress; atrair polinizadores e agentes de dispersão de sementes; participar nos fenómenos de competição entre plantas e ser peça chave na interação da planta com microrganismos simbiotes.

Na maioria das referências, encontramos os metabolitos secundários divididos principalmente em três grupos: terpenos, alcaloides e compostos fenólicos. Os terpenos são um grupo importante de compostos ativos em plantas, com 23.000 estruturas conhecidas (Kabera et al., 2014). Trata-se de polímeros derivados do isopreno, sintetizados pela via do mevalonato ou pela via alternativa da desoxixilulose-fosfato (Litchenthaler, 1999 e Dewick, 2002). Em função do número de moléculas de isopreno (C5) que constituam a sua molécula, os terpenos podem ser classificados em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (30), tertaterpenos (C40) e politerpenos. Mono e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais e conferem o odor e sabor característico as plantas. A modo de exemplo podem ser mencionados alguns monoterpenos como o mentol, o limoneno e o timol os sesquiterpenos como o  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -farneseno e o bisabolol. Os outros terpenos são constituintes de bálsamos, resinas, ceras, e borracha.

Conhecem-se alguns compostos terpenoides, sesquiterpenos e diterpenos, derivados de angiospermas, que têm ação defensiva induzível bem conhecida (fitoalexinas) (Stoessl et al., 1976). Existem também terpenoides que são hormonas vegetais como o ácido abscísico, as giberelinas que são diterpenos tricíclicos modificados, e as citoquininas (Primo Yufera, 1995).

Alguns diterpenoides são compostos de grande importância ou formam parte deles, como a Vitamina A ou retinol, a vitamina E ou tocoferol a vitamina K ou fitoquinona e o fitol (Primo Yufera, 1995).

O grupo dos triterpenoides inclui esteroides, limonoides, quasinoídes e saponinas, consta de mais de 30.000 compostos isolados e identificados (Dzubak et al., 2006).

Alguns terpenoides tem um papel importante nas especiarias e sabores, bem como na indústria de perfumes (Gershenzon e Duradeva, 2007). Na sua maioria possuem atividade farmacológica e são utilizados para tratamentos em humanos e animais (Kabera et al., 2014).

Os alcaloides são substâncias orgânicas cíclicas que contêm um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos, geralmente com uma ação biológica marcante como a morfina, a cafeína ou a nicotina (Pelletier, 1983). Uma das suas características é a basicidade. 75 % dos alcaloides provêm das plantas sendo de rara ocorrência em bactérias, fungos e líquenes. São originados na via biossintética dos aminoácidos. O reconhecimento dos alcaloides pelo homem é ancestral. Muitos dos alcaloides tem sido utilizados há centos de anos com fins medicinais e ainda hoje persistem como drogas (Roberts, 2013), outros são reconhecidos como substâncias venenosas extremamente potentes. Os alcaloides pirrolizidínicos são hepatotóxicos, e alguns são também inibidores da colinesterase e ligam-se a neuroreceptores afectando deste modo o sistema nervoso (Belakhdar et al., 2014). Entre os alcaloides mais conhecidos encontram-se a morfina, a cafeína, a nicotina, a colchicina, a estricnina, e a piperina (Roberts, 2013)

Os compostos fenólicos são os metabolitos secundários mais abundantes, encontram-se distribuídos em todo o reino vegetal. Possuem estruturas variadas, com pelo menos um hidroxilo ligado a fenol, podendo existir também na sua estrutura açúcares ou ácidos orgânicos. Incluem ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos e ligninas. Os flavonoides são os mais abundantes na nossa dieta e subdividem-se em seis grupos: flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, isoflavonas e antocianinas, dependendo do estado de oxidação do C no anel central (Dai e Mumper, 2010; Manach et al., 2004). Os ácidos fenólicos podem ser divididos em duas classes, os derivados do ácido benzóico como o ácido gálico, e os derivados do ácido cinâmico como o ácido cumárico (Manach et al., 2004). Os taninos são compostos fenólicos de elevado peso molecular e que apresentam a capacidade de interagir com proteínas (Baxter et al., 1997). Podem inibir enzimas ligadas ao metabolismo de lípidos, carboidratos e proteínas podendo ainda formar complexos com algumas proteínas que estão na dieta deixando de estar acessíveis (McDougall et al., 2005).

Os compostos fenólicos naturais têm sido reconhecidos como potentes antioxidantes *in vitro*, mais potentes do que a vitamina C, E e os carotenoides (Rice-Evans et al., 1995). Podem também exercer um efeito quimioprotetor, devido a sua capacidade para sequestrar e reduzir radicais livres, e de agir como agentes quelantes de metais de transição, sendo ainda referenciados pela promoção de um efeito inibitório na carcinogénese e crescimento de tumores (Kampa et al., 2007).

### 1.7 O género *Thymus* L., *Thymus vulgaris* L. e *Thymus x citriodorus* L

*Thymus*, é um género pertencente à família *Lamiaceae* que compreende 300-400 espécies endémicas amplamente distribuídas no mundo, em particular na região mediterrânica. Atualmente reconhecem-se mais de 250 taxa, com 214 espécies e 36 subespécies (Morales, 2002). Trata-se de plantas herbáceas, perenes de folhas pequenas que constituem arbustos com inúmeros ramos, que alcançam tipicamente 10 a 30 cm (Reddy et al., 1998). Vulgarmente conhecidos como tomilhos, estas plantas exibem propriedades muito interessantes. Na culinária são utilizados como condimentos, na confeção de diversos pratos e saladas. Desde o ponto de vista medicinal possuem propriedades biológicas e farmacológicas diversas, entre as quais se incluem expectorantes, analgésicas, antiespasmódica, antimicrobianas e antioxidantes (Salgueiro, 1994). Estas atividades devem-se aos seus óleos essenciais e polifenóis especialmente flavonoides (Salgueiro, 1994).

Tal como acontece noutras plantas aromáticas, nos tomilhos existem polimorfismos químicos, havendo enorme interesse em aqueles que possuem uma elevada quantidade de compostos fenólicos, devido a sua potente atividade antioxidante. Miguel, (2010) faz uma revisão da atividade antioxidante de diversas plantas aromáticas, referenciando o bom desempenho do género *Thymus* e encontrando, que para algumas espécies do género, os valores das atividades eram comparáveis com as dos padrões universalmente aceites, o ácido tio-barbitúrico (BHT) e o hidroxianisol butilado (BHA).

*Thymus vulgaris* L. doravante, *T. vulgaris* é a espécie com maior distribuição dentro do género *Thymus*, está presente na zona mediterrânica com pelo menos seis quimiótipos diferentes (Thompson, 2003). De todos eles apenas o tipo” timol “está em conformidade com a definição constante da Farmacopeia Europeia. A espécie *T. vulgaris* tem sido amplamente utilizada pela medicina tradicional mas destaca-se também a sua utilização como conservante alimentar.

Nas últimas décadas têm-se desenvolvido vários estudos tentando a caracterização química do seu óleo essencial e dos seus extratos, assim como das suas atividades biológicas e farmacêuticas. O potencial terapêutico da espécie assenta no conteúdo de flavonoides, timol, carvacrol, eugenol, fenóis alifáticos, luteoninas, saponinas e flavonas tetrametoxiladas (Javed et al., 2013). Estes compostos são responsáveis pelos efeitos bactericidas, antioxidantes, antissépticos, anti-helmínticos e antiespasmódicos (Monira et al., 2012 citado em Javed et al., 2013) que esta espécie apresenta. A existência de diferenças nas atividades antimicrobianas reportadas pode dever-se a variações na

composição química, e à existência de sinergismos e interações aditivas evidenciadas entre compostos maioritários e minoritários que ocorrem em *T. vulgaris* (Ahmad et al., 2014). O conteúdo de monoterpenos oxigenados e/ou sesquiterpenos presentes no óleo essencial (Miladi et al., 2013), assim como a presença de elevadas quantidades de polifenóis nos extratos (Roby et al, 2013) têm sido reportados como responsáveis pela atividade antioxidante de *T. vulgaris*.

*Thymus x citriodorus* L. doravante *T. x citriodorus*, ou tomilho limão, é um híbrido muito utilizado como ingrediente na culinária. Utiliza-se em pratos variados, petiscos, saladas e na confecção de doces e sobremesas. É consumido também em forma de infusão pelas suas propriedades medicinais.

A caracterização química do óleo essencial de *T. x citriodorus* L. encontrada na bibliografia exibe algumas diferenças, mas em geral são referidos como componentes maioritários, o geraniol, geranil acetato, neral, e borneol (Omidbaigi et al., 2005; Sacchetti et al., 2004). À semelhança do que acontece com outras plantas do género *Thymus*, esta espécie produz também uma elevada quantidade de compostos fenólicos, destacando-se o ácido rosmarínico como o maioritário (Pereira et al., 2013). Os outros compostos fenólicos são derivados das flavonas luteonina, crisoeriol e apigenina, das flavanonas eriodictiol e naringenina e do flavonol quercetagetina (Pereira et al., 2013). O perfil químico mostra a importância que esta espécie pode ter como agente nutracêutico com potencial interesse para as indústrias alimentar e farmacêutica (Pereira et al., 2013).

Entende-se assim o interesse económico destas espécies e o potencial que tem a procura de métodos destinados a melhorar os padrões de qualidade dos mesmos. A relação evidente entre a composição química dos tomilhos e a suas atividades, deixa aberta a porta de ser este o caminho a percorrer por quem deseje cultivar e transformar estas plantas, com fins comerciais.

### **1.8. *Coriandrum sativum* L.**

*Coriandrum sativum* L. doravante *C. sativum*, é uma planta da Família das Umbelíferas, com importância económica visto ser utilizada em produtos alimentares, perfumes e cosméticos. É extensivamente cultivada na Índia, Rússia, Ásia, Marrocos e Europa central (Ravi et al., 2006). O fruto seco é utilizado como aromatizante em molhos e preparações de carne e faz parte do pó caril. O aroma e sabor do coentro devem-se à

presença de óleo essencial no mesocarpo (Ravi et al., 2006). É frequentemente utilizado em preparações medicinais para mascarar os sabores amargos, e também, em países da Europa e Estados Unidos de América, para aromatizar licores (Ravi et al., 2006)

A composição química dos óleos essenciais de *C.sativum* tem sido alvo de diversos estudos (Bandoni, Mizrahi, e Juarez, 1998; Matasyoh et al., 2009), tanto os provenientes das folhas como os dos frutos. A composição do óleo essencial de coentros é dominada por aldeídos (56,1%) e álcoois (46,3 %) (Matasyoh et al, 2009). As diferenças reportadas na composição são atribuídas a fatores ambientais, genéticos e ao estado de maturação dos frutos (Eyres et al., 2005).

Existem evidências documentadas da existência de atividade antioxidante e antibacteriana dos óleos e extratos de *C. sativum* ( Burt, 2004; Cantore et al., 2004; Matasyoh et al., 2009; Silva et al., 2011). Diferentes preparações a base de coentros como: sementes pulverizadas, extrato em pó, chá, tintura ou infusão, têm ainda sido recomendadas para a perda de apetito, dispepsia, ansiedade e convulsões (Emamghoreishi et al, 2005 citado em Msaada et al., 2006).

### **1.9. Alterações de metabolismo secundário por vírus**

Existem alguns exemplos documentados que mostram a alteração quantitativa de certos metabolitos secundários como resposta à infecção viral. A *Lavandula vera DC* e *Lavandula angustifolia Miller* mostraram um decréscimo de 25% no rendimento dos terpenos oxigenados, e um aumento nos esterres, quando infetadas pelo vírus mosaico da alfalfa AMV (Bruni, et al 2006; Bellardi et al, 2006).

Foram também registradas alterações na composição dos óleos essenciais de *Echinacea purpurea L.* e *Agastache anethiodora L.* quando infetadas com o CMV (Kumari et al, 2014; Bruni et al., 2007). Para o género *Thymus L.* existem poucos registos de infecção por vírus. *Dikova, (2013)* reportou a existência de infecção por CMV em diversas espécies incluindo o tomilho e Rubies-Autonell e Bellardi, 1999 reportaram a infecção de *T. vulgaris L.* pelo *Broad bean wilt virus*.

Alguns autores têm mostrado a interação existente entre os supressores virais do silenciamento por RNA e os genes da resistência (R) que dirigem as reações defensivas das plantas (Jones e Dangl, 2006; Li et al., 1999; Shimura et al., 2011). A ativação dos genes R origina alterações no metabolismo secundário que têm repercussões ao nível metabólico e podem exercer efeitos sobre diversos mecanismos e vias bioquímicas existentes nas plantas.

### **1.10. A aplicação de vectores virais na formação de nanopartículas**

Na revisão que fazem Singh et.al, 2011 referem que a primeira descrição das propriedades das nanopartículas coube a Michael Faraday no seu artigo “Experimental Relations of Gold and others Metals to Light”. É também indicada a data de 1959 como a primeira vez em que o termo nanotecnologia foi utilizado pelo cientista Richard Feynman. A nanotecnologia pode ser definida como a tecnologia aplicada ao desenho, síntese e manipulação da estrutura de partículas com dimensão menor do que 100 nm. As características e propriedades únicas das nanopartículas têm conduzido à sua aplicação prática generalizada. A nanotecnologia tem-se desenvolvido dinamicamente como um campo importante na investigação moderna com efeitos potenciais na electrónica e medicina. A produção de nanopartículas é um processo custoso e com certa perigosidade para o meio ambiente e organismos vivos. A procura de processos de produção alternativos e sustentáveis, amigos do ambiente, tem levado ao desenvolvimento de uma nova área conhecida como “Green Nanotechnology” ou nanobiotecnologia.

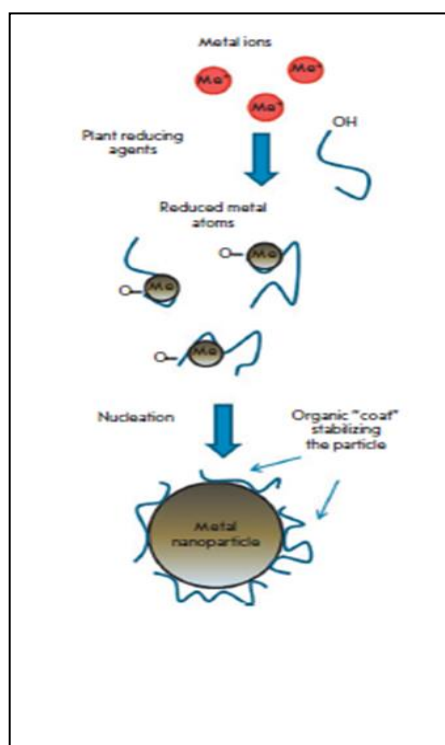
No geral, a nanobiotecnologia significa sintetizar nanopartículas ou nanomateriais utilizando vias biológicas que envolvam microrganismos, plantas e vírus ou seus subprodutos, recorrendo à ajuda de ferramentas biotecnológicas. As técnicas verdes eliminam a utilização de químicos custosos, consomem menos energia e geram produtos e subprodutos ambientalmente inócuos (Patra e Baek, 2014).

Sendo conhecida a capacidade que possuem as plantas para reduzir e acumular iões metálicos e, existindo evidências de que a acumulação de metais se faz sob a forma de nanopartículas, os extratos vegetais começaram a ser testados como uma alternativa para a produção de nanopartículas. Na bibliografia podem-se encontrar exemplos em algumas plantas que crescem em substratos contendo sais metálicas, acumulam nanopartículas no seu interior, tal o caso de *Medicago sativa* que acumula até 13% do seu próprio peso em nanopartículas de prata (Harris e Bali, 2008).

Assim, nos últimos tempos têm sido realizadas experiencias de produção de nanopartículas *in vitro*, com recurso à utilização de extratos de plantas na biorredução de iões metálicos.

Shankar et al. (2003), mostraram que o extrato de *Pelargonium graveolens L.* em contacto com uma solução de nitrato de prata, reduz de forma muito rápida os iões

prata. Extratos de *Azadirachta indica* L. foram utilizados para reduzir ácido tetracloraurico a nanopartículas triangulares e hexagonais de ouro (Shankar et. al, 2004). Foi também demonstrada a produção de nanopartículas de ouro a partir da alga marinha *Sargassum wightii* L.(Singaravelu et al., 2007). As espécies vegetais utilizadas são muito variadas bem como o tipo de ião metálico (prata, ouro, ferro, platina).

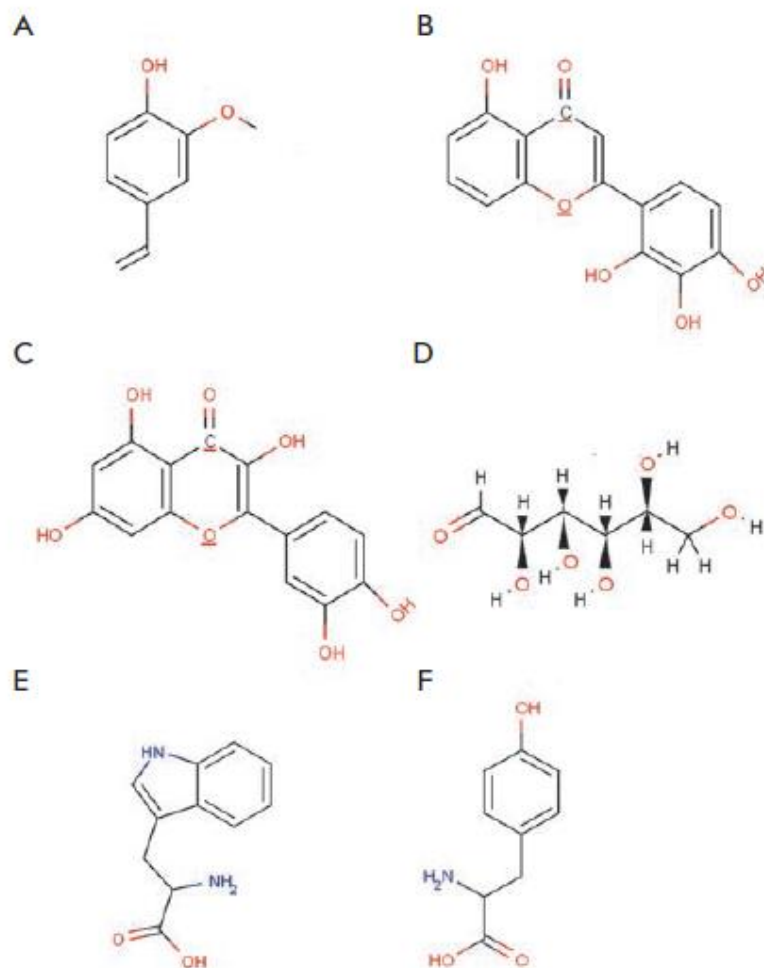


**Figura 1.10.1-** Representação esquemática da síntese de nanopartículas metálicas num extrato de planta. (Extraído de Makarov et al., 2014)

Na Figura 10.1 apresenta-se a representação esquemática de como ocorre a síntese de nanopartículas nos extratos de plantas. Na fase de ativação os íões metálicos ligam-se aos metabolitos redutores e agentes estabilizadores, acontecendo a redução dos íões metálicos e nucleação dos metais atômicos. Segue-se a fase de crescimento durante a qual pequenas nanopartículas adjacentes coalescem espontaneamente em partículas de tamanho maior (formação direta de partículas por meio de nucleação heterogénea e crescimento, e posterior redução do ião metálico, um processo conhecido como Ostwald ripening). Este processo é acompanhado por um incremento na estabilidade termodinâmica das nanopartículas. Na fase de terminação as nanopartículas assumem uma forma e tamanho estáveis.

As nanopartículas metálicas são de grande interesse devido à modificação das propriedades catalíticas, eletrônicas e óticas que se observa, por efeito do tamanho (Bronstein et al., 2000). Nos últimos tempos as investigações sobre a síntese de nanopartículas têm-se debruçado sobre os mecanismos de obtenção das mesmas, recorrendo cada vez mais ao desenvolvimento de metodologias amigas do ambiente. Vários autores referem a utilização de sistemas biológicos tais como fungos, bactérias e extratos de plantas para a síntese de nanopartículas metálicas.

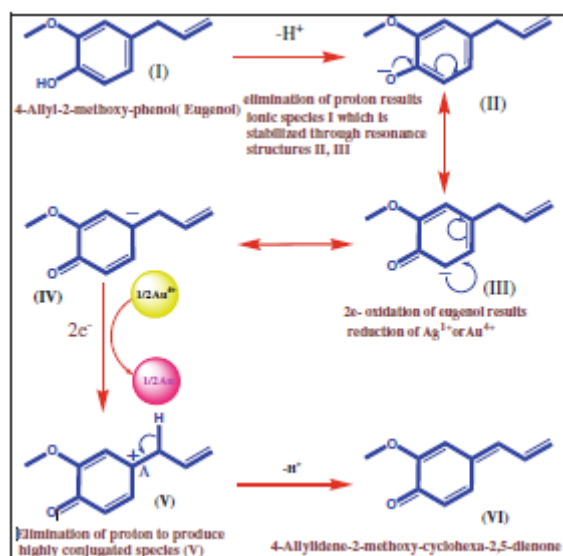
Os extratos de plantas são constituídos por diferentes metabolitos responsáveis pela redução dos iões metálicos. A morfologia das nanoestructuras pode estar relacionada com a interação desses metabolitos com os iões metálicos. Os extratos vegetais são uma fonte de compostos bioativos tais como terpenoides, polifenóis, açúcares, aminoácidos, proteínas, vitaminas etc. Os fitoquímicos presentes nos extratos incluem grupos funcionais hidroxilos, carboxilos e aminos que servem para a efetiva redução dos metais e ofíam como agentes de proteção para prover um revestimento robusto das nanopartículas metálicas, num só passo (Hutchison, 2008).



**Figura 1.10.2-** Principais metabolitos de plantas envolvidos na síntese de nanopartículas metálicas. A – Fenilpropanoides (eugenol); B,C – flavonoides (luteolina, quercetina); D – Uma hexosa redutora na forma de cadeia aberta; E,F – aminoácidos (triptofano) (E) a tirosina (F). (Extraído de Makarov et al., 2014).

Alguns dos metabolitos apontados como responsáveis pela formação de nanopartículas, são os terpenoides. Singh et al., (2010) utilizando extrato de cravo-da-índia, do qual o principal componente é o eugenol, conseguiram obter nanopartículas de forma e tamanhos diferentes, variando os rácios de prata e ouro (Fig. 10.3).

O efeito indutor dos grupos alil e metoxi promove a dissociação de um próton do grupo hidroxilo do eugenol; a forma aniônica do eugenol é posteriormente estabilizada por estruturas ressonantes, sendo simultaneamente libertados 2 elétrões.



**Fig.1.10.3-** Representação esquemática da redução de iões Ag e Au

Dentro dos compostos fenólicos, os flavonoides são um grupo amplo e variado de metabolitos, também referenciados como responsáveis pela produção de nanopartículas, em virtude da sua capacidade quelante e redutora de iões metálicos. Esta capacidade está em estreita relação com os grupos funcionais que os flavonoides possuem. As transformações tautoméricas dos flavonoides da forma enol à forma ceto, podem libertar um átomo de hidrogénio reativo que pode reduzir os iões metálicos para formar nanopartículas (Makarov, et al., 2014).

Makarov et al, 2014 referem também que a capacidade redutora dos açúcares presentes nos extratos vegetais pode ter participação na formação de nanopartículas dependendo da sua estrutura. Os oligossacáridos e polissacáridos que possuam na sua constituição monossacáridos que possam adotar uma forma de cadeia aberta, de modo a permitir o acesso do ião metálico ao grupo aldeído, podem ter um papel ativo.

Para além da constituição dos extratos vegetais, o processo de redução de iões metálicos para a formação de nanopartículas é afetado por um grande número de fatores. O pH da reação, a temperatura de incubação, o tempo da reação, as concentrações e o potencial eletroquímico do ião metálico, são parâmetros que devem ser analisados e otimizados para maximização do rendimento da reação, assim como para definir as características que se pretendem para um tipo específico de nanopartículas. O poder redutor mede a capacidade de ceder eletrões por parte de um antioxidante (Yen e Cheng, 1995). Na Patente WO2014045055 encontra-se documentada a utilização de extratos vegetais com elevado poder redutor para a produção de nanopartículas e, tem-se proposto a utilização

de vírus conjuntamente com os extratos para conseguir nanopartículas mais uniformes e sem agregação.

### **1.11. Objetivos**

Existem referências que envolvem alterações nos metabolitos secundários em alguns hospedeiros do *Cucumber mosaic vírus* (Bruni et al,2007; Bellardi et al, 2001; Dikova et al., 2013). Também é amplamente conhecida a atividade supressora da proteína 2B do CMV assim como o seu efeito na resistência dos vírus induzida por ácido salicílico (Lewsey et al., 2009) e a sua ação na inibição da resposta dos genes regulados pelo ácido jasmónico (Ziebell al., 2011), uma molécula de sinalização fundamental na defesa contra insetos.

O objetivo do presente estudo é avaliar a possibilidade de utilizar o supressor de silenciamento do CMV, proteína 2B, para aumentar a produção de metabolitos secundários em plantas.

Especificamente vão-se avaliar a existência de alterações induzidas na produção de terpenoides e compostos fenólicos em *T. vulgaris*, *T. citriodorus*, *C. sativum* e *N. benthamiana*.

Inicialmente será avaliada a resposta á infeção pelo CMV e posteriormente, utilizar-se-ão um vector de transformação transiente e um vector sistémico, apenas com o gene supressor 2B.

Será também avaliada o efeito nas características de nanopartículas metálicas produzidas com recurso à síntese verde, utilizando para tal, extratos de plantas infetadas com CMV e inoculadas com o vector sistémico pTRV que leva o gene supressor 2B.

## Capítulo 2- O *Cucumber mosaic virus*, a sua capacidade de infectar plantas de *Nicotiana benthamiana*, *Thymus vulgaris* e *Coriandrum sativum* e os seus efeitos nos metabolitos

### 2.1 Introdução

Têm sido descritas várias estirpes de CMV, sendo que a espécie inclui três subgrupos, IA, IB e II, com até 25% de divergência de sequência de nucleótidos entre eles (Roossinck et al., 1999). Estas estirpes ocasionam diferentes patologias e afetam um grande número de plantas hospedeiras. O subgrupo I causa sintomas de mosaico severo e o subgrupo II provoca sintomas mais atenuados (Roossinck et al., 1999). A estirpe Fny do CMV pertence ao subgrupo I e a cepa LS-CMV ao subgrupo II. Os subgrupos I e II, diferem na sua sequência nucleotídica e podem ser distinguidos por PCR (Rizos et al., 1992). Rao e Francki, 1982 referem que todos os genes de CMV têm algum papel na expressão fenotípica da interação vírus/planta, mas que, aparentemente, os RNAs 2 e 3 têm maior importância na indução dos sintomas quando comparadas com o RNA1. As numerosas estirpes deste vírus com distribuição mundial, exibem diferenças na patologia e/ou tipo de hospedeiros (Kaper e Waterworth, 1981).

O estudo da variabilidade viral é importante visto que estas variações podem refletir diferenças na patogenicidade do vírus. A tipificação molecular de vírus com recurso à análise mutacional por SSCP (Nolasco e De Sequeira, 1993) é uma metodologia de fácil aplicação e baixo custo. Esta análise deteta variações de sequência através de diferenças de mobilidade electroforética. Sob condições desnaturantes e temperatura reduzida as moléculas de DNA de cadeia simples podem assumir conformações exclusivas que variam em função das suas sequências nucleotídicas.

Existem referenciadas aproximadamente 1200 espécies entre monocotiledóneas e dicotiledóneas, como hospedeiras do CMV, englobando plantas herbáceas, lenhosas e semilenhosas. Contudo existem poucas referências a plantas aromáticas.

As referências encontradas fazem parte de um trabalho de pesquisa desenvolvido entre 2006 e 2009 na Itália (Davino et al., 2012), onde foi possível encontrar algumas espécies de plantas aromáticas infetadas com CMV, não existindo no entanto referências de infeção comprovada no Género *Thymus*. No caso de *Coriandrum sativum*, há informação de que é susceptível à infeção por CMV na base de dados Plant Virus Online (<http://pvo.bio-mirror.cn/famly134.htm#Coriandrum%20sativum>). Como

já referido em 1.9 do Capítulo I, a infeção por CMV confirmou-se em *Echinacea purpurea* e *Agastache anethiodora*.

Plantas de *T. vulgaris*, de *N. benthamiana* e de *C. sativum* foram testadas de modo a confirmar a sua susceptibilidade de infeção com a estirpe CMV-Fny. Para poder ter um isolado perfeitamente caracterizado foram utilizados clones infeciosos CMV-Fny desenvolvidos pelo laboratório do Dr. Garcia Arenal. Dado o facto do genoma de CMV ser por si só infecioso, um dos métodos para estabelecimento da infeção nas plantas é a utilização de RNAs transcritos “in vitro” a partir de plasmídeos albergando uma cópia em DNA do genoma viral. Para o estabelecimento da infeção, no caso de um vírus multipartido como o CMV, é preciso a reunião de todos os RNAs transcritos, de modo a que a planta seja inoculada com o equivalente ao RNA genómico parental.

A infeção viral é acompanhada por alterações fenotípicas visíveis e também por alterações metabólicas dos hospedeiros, que podem ser avaliadas com recurso a técnicas cromatográficas apropriadas. A análise do perfil de voláteis dos óleos essenciais nas plantas recorre à Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG / EM). Esta é uma técnica instrumental, que consiste num cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrómetro de massa, através da qual as misturas complexas de substâncias químicas podem ser separadas, identificadas e quantificadas. Para que um composto seja analisado por CG / EM deve ser suficientemente volátil e termicamente estável. A amostra é injetada e varrida na coluna cromatográfica por um gás de transporte, geralmente hélio. Os compostos que formam parte da amostra são separados em virtude da sua interação com o revestimento da coluna (fase estacionária) e o gás de arraste (fase móvel). A última parte da coluna passa através de uma linha de transferência aquecida e termina na entrada para a fonte de iões, em que os compostos que eluem da coluna são ionizados. Posteriormente, um analisador de massa separa os iões carregados positivamente de acordo com várias propriedades de massa dependendo do equipamento utilizado. Depois da separação, os iões entram no detetor que envia estas informações para um computador.

No caso da análise de alcalóides, a técnica de análise utilizada é uma Espectrometria de massa de cromatografia líquida de alto desempenho. Compreende um cromatógrafo líquido de alta eficiência “high-performance liquid chromatography” (HPLC) ligado, através de uma interface adequada, a um espectrómetro de massa (EM). O HPLC / EM é capaz de analisar uma gama muito ampla de componentes. Os compostos que são termicamente lábeis e apresentam uma elevada polaridade ou têm uma massa molecular

elevada podem ser todos analisadas utilizando HPLC / EM. As amostras de interesse são injetadas numa coluna de HPLC. Os compostos são separados com base na sua interação para com o revestimento químico dessas partículas (fase estacionária) e o solvente da coluna (fase móvel). Os componentes que eluem da coluna cromatográfica são então introduzidos para o espectrómetro de massa.

O objetivo deste capítulo é avaliar a susceptibilidade das espécies *T. vulgaris*, *N. benthamiana* e *C. sativum* à infecção por CMV, e determinar se após estabelecimento da infecção, existem alterações na composição de alguns metabolitos.

## **2.2 Materiais e Métodos**

### **2.2.1. Material biológico**

Clones cDNA do CMV-Fny facultados pelo Dr. Fernando Garcia Arenal contendo RNA1, RNA2 e RNA3 no plasmídeo pUC18.

Plantas de *Nicotiana benthamiana* wt produzidas a partir de sementes de plantas mãe do laboratório de virologia.

Plantas de *Thymus vulgaris* e *Coriandrum sativum* produzidas a partir de sementes certificadas provenientes de Semillas Silvestres S.A. em Espanha.

### **2.2.2 Crescimento das plantas em condições controladas**

As sementes foram colocadas a germinar numa mistura de substrato comercial, vermiculite e perlite. Após a aparição das folhas cotiledonares as plantas foram transferidas a tabuleiros de alvéolos (8x8 cm) e mantidas durante um fotoperíodo de 14h luz:10h escuro a temperatura de 24°C. Posteriormente as plantas foram transferidas para vasos individuais para promover o crescimento e desenvolvimento de biomassa.

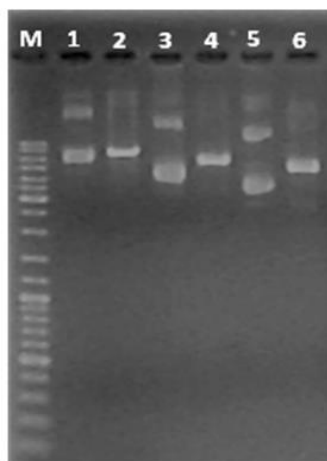
### **2.2.3 Preparação dos transcritos**

A partir dos plasmídeos portadores do cDNA dos RNAs genómicos de CMV-Fny procedeu-se à transcrição “in vitro” utilizando o Megascript Kit (Ambion Lyfe technology), baseado no promotor T7. No procedimento foram seguidas as instruções do fabricante.

Os plasmídeos contendo o CDNA do CMV-Fny RNA1, CMV-Fny RNA2 e CMV-Fny RNA3 foram linearizados com PstI (Figura 2.1). Após 1 hora a reação de digestão foi parada por adição de 1/20 volumes de 0,5 M de EDTA; 1/10 Volumes de 3M de acetato de sódio e 2 volumes de etanol. As amostras foram colocadas a -20 ° C durante 30 min e

posteriormente centrifugadas durante 15 minutos a 12000xg. O sobrenadante foi removido e o pellet ressuspensionado em TE (10 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 1 mM) a uma concentração de 0,5-1 mg / ml. 1 µg de cada plasmídeo linearizado foi adicionado à mistura de transcrição contendo: 1X tampão T7; 7,5 mM de cada solução de ribonucleótido e 2 µl da enzima T7 num volume de 20 µl. Esta mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, adicionaram-se 2 unidades de DNASE Turbo-DNA free da Ambion para eliminar todo o DNA remanescente na amostra.

A seguir procedeu-se à purificação com fenol clorofórmio e precipitação com 1 volume de isopropanol. Após 30 minutos a -20°C os transcritos obtidos foram centrifugados, ressuspensionados em TE e quantificados no nanodrop.



**Figura 2.1-** Linearização dos clones infecciosos CMV-Fny. **1-** CMV-Fny RNA1, **2-** CMV-Fny-RNA1 digerido com Pst1, **3-** CMV-Fny RNA 2 digerido com Pst1, **4-** CMV-Fny-RNA2, **5-** CMV-Fny RNA 3; **6-** CMV-Fny RNA 3 digerido com PSt1 e **M-** Marcador Gene Ruler 1Kb DNA ladder (gel de agarose 1% (p/v)).

#### **2.2.4 Inoculação de plantas de *Nicotiana benthamiana* com os transcritos**

Foram preparadas amostras com aproximadamente 37 µg de cada um dos três transcritos numa diluição de 1/15 de 1M de tampão fosfato pH 7,4.

Os transcritos foram inoculados nas folhas das plantas de interesse por inoculação mecânica. Na altura da inoculação as plantas contavam com 4 folhas.

#### **2.2.5 Extração de RNA**

Após 30 dias da inoculação das plantas com os transcritos, foi feita a extração de RNA. Cerca de 100 mg de tecido foliar fresco foram pulverizados em almofarizes de porcelana com azoto líquido até a obtenção de um pó bem fino, sendo posteriormente

transferido para tubos de microcentrífuga de 2 ml. Foi adicionado a cada tubo 1 ml de Trizol e após 5 min a amostra foi centrifugada a 5000 rpm durante 10 min a 4°C.

O sobrenadante recolhido foi extraído com 200 µl de clorofórmio e novamente centrifugado durante 10 min a 10000 x g a 4°C. O sobrenadante contendo o RNA foi precipitado com 1 vol. de isopropanol e deixado incubar por 20 min à temperatura ambiente. A amostra foi imediatamente centrifugada durante 10min a 10000 x g e a 4°C. O pellet obtido foi lavado com etanol 70% e após a centrifugação nas condições anteriormente indicadas, o pellet foi ressuspendido em 30 µl de água miliq.

### **2.2.6 Imunocaptura (IC/RT-PCR)**

A confirmação das plantas infetadas foi realizada por imunocaptura seguida de transcrição reversa e amplificação num só passo (IC/RT-PCR), segundo Nolasco et. al., 1993. Os anticorpos utilizados haviam sido obtidos há vários anos na Estação Agronómica Nacional.

Para a imunocaptura os tubos de PCR foram revestidos com anticorpos para o CMV durante 3 horas a 37°C. Os extratos de plantas foram preparados por maceração de 100 mg de folhas com 0.5 ml de tampão de extração, constituído por PBS, 2% PVP-40 e 0,05% Tween 20 e posteriormente clarificados por centrifugação a 5000 x g durante 5 min e a 4 °C.

Em cada tubo revestido foram adicionados 50 µl de extractos, sendo que a incubação decorreu durante 16 horas a 4°C.

As reações de transcrição reversa e amplificação (RT-PCR) do gene da CP, foram feitas num volume final de 50 µl contendo 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM do mix de dNTPs, 0,2 µM de cada um dos “primers”, 50 U/ µl de transcriptase reversa MuMLV Roche, 5U/µl de Taq DNA polymerase (Fermentas) e 1X o respetivo tampão.

Os “primers” usados na amplificação foram:

**CMV-IR3-fw:** 5'-CTT ACT TTC TCA TGG ATG CT-3'

**CMV-CP4-rev:** 5' CCA CAC GGT AGA ATC AAA-3'

Estes primers foram desenhados com base na sequência do RNA3 de Fny CMV (Genbank: NC001440) e hibridam respectivamente nas posições 1148-1167 e 1622-1605. Amplificam um fragmento que compreende parte da região intergénica a montante da proteína da cápside e parte desta.

Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes: 38 °C durante 45 min, 94° 2 minuto, seguido de 30 ciclos de 92 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s, com uma incubação final de 72 °C durante 5 min.

### **2.2.7 Clonagem e Análise por SSCP**

Os fragmentos de PCR obtidos da amplificação do gene da CP, de 482 bp, foram ligados pelo sistema “TA Cloning” em plasmídeos pGEM-T Easy. Os produtos de ligação foram clonados em células competentes de *Escherichia coli* One shot MacOne. Posteriormente, efetuou-se a análise por polimorfismos conformacionais de cadeia simples (“Single Strand Conformation Polymorphism” - SSCP) dos fragmentos clonados, de modo a avaliar a diversidade genética. Para tal, adicionou-se solução desnaturante de formamida (95%), 20 mM EDTA pH 8, 0,05% Azul de Bromofenol) a 1-3 µl de produto PCR de modo a perfazer 10 µl. Desnaturou-se a solução a 90 °C durante 5 min e colocaram-se as amostras em gelo. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% não desnaturante em TBE durante 3 h a 4 °C e a 200 V. As bandas de DNA foram visualizadas através da coloração com Gel Star acid Stain (Lonza).

### **2.2.8 Infecção por transmissão mecânica de plantas de *Thymus vulgaris* e *Coriandrum sativum***

Folhas sintomáticas de *Nicotiana benthamiana* foram cortadas e maceradas com uma diluição de 1/10 de 1M de Tampão fosfato pH 7,4. Esta preparação foi utilizada para inoculação de novas plantas de *Nicotiana* e também de plantas de *Thymus vulgaris* e *Coriandrum sativum*. As folhas foram previamente pulverizadas com carborundo e logo esfregadas com o extrato obtido de folhas infetadas.

### **2.2.9 Avaliação do conteúdo de nicotina em plantas de *Nicotiana* infetadas com CMV**

#### **2.2.9.1 Reagentes**

Os padrões de nicotina foram adquiridos de Sigma –Aldrich com pureza de 99.9%. O metanol , o acetonitrilo qualidade HPLC e o ácido fosfórico qualidade HPLC eram da marca Merck.

### **2.2.9.2 Preparação do extrato bruto**

As folhas depois de lavadas foram secas a 40°C e posteriormente macerados em almofariz com azoto líquido. 0,1 g de folhas foram extraídas com 2 ml de uma solução de metanol: água acidificada com 5% de ácido acético, com agitação durante 2 horas a temperatura ambiente. As amostras foram filtradas com filtro 0,2 µM e logo armazenadas em -20°C até ser analisadas.

### **2.2.9.3 Cromatografia em fase líquida**

Os extratos foram separados por cromatografia em fase reversa. Os solventes foram (A) 0.25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em água (pH 2,2) e (B) acetonitrilo. O sistema de eluição foi o seguinte: 0-6 min 0-12% de B; 6-10 min 12-18% de B; 10-30 min 18-58% de B. A monitorização foi feita a 254 nm e o fluxo foi de 1 mL/min. A coluna utilizada foi uma Purospher-RP 18 da marca Merck.

O tempo de retenção e o espectro UV-vis dos compostos foram comparados com compostos autênticos de referência.

Foi utilizada como padrão a nicotina 99% (GC) referencia N3876 da marca Sigma. Para a reta de calibração foram preparados padrões com 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL de nicotina.

## **2.2.10 Extração e análise do óleo essencial de *Thymus vulgaris* em plantas inoculadas com CMV - Fny**

### **2.2.10.1 Obtenção do óleo essencial de *Thymus vulgaris***

A obtenção de óleo essencial de *Thymus vulgaris* foi levada a cabo no laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve.

O óleo essencial foi isolado do material vegetal seco por hidrodestilação utilizando um equipamento tipo Clevenger, de acordo com o método referenciado na Farmacopeia Europeia (Council of Europe, 2007).

As plantas de *Thymus vulgaris* infetadas e as correspondentes ao controlo foram cortadas e pesadas para a extração de óleos essenciais por hidrodestilação. Sendo impossível obter uma quantidade de material suficiente para destilar a partir de cada planta individual (devido ao baixo rendimento), recorreu-se a preparação de “bulks”, amostras com folhas provenientes de diferentes plantas, mas todas com o mesmo peso. Foi utilizado pentano para poder colher o máximo de óleo essencial do equipamento.

Posteriormente deixou-se evaporar o pentano e utilizou-se para análise a amostra com uma diluição conhecida.

#### **2.2.10.2 Análises da composição dos óleos essenciais por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa (CG-EM)**

As análises dos óleos essenciais foram realizadas no CCMAR na Universidade do Algarve. A unidade de CG era um equipamento Varian 450-GC acoplado com espectrómetro de massa Varian 240-MS *ion trap* equipado com coluna capilar BR5-MS da Bruker. Condições: Volume da amostra: 1 µL, Split 80:1, Temperatura do injetor: 280 °C. Fluxo de He 1.0 mL / min, Programa de Temperatura: rampa de 45°C a 175°C, com incremento de 3°C/min, seguido de 15°C/min até aos 300°C, mantendo-se nesta temperatura por mais 10 minutos. MS: 220 ° C Interface de Temperatura: 200 °C. Intervalo de massa: 50-350 (*m/z*). O software utilizado foi Varian MS Workstation versão 6.9.1. As amostras foram previamente diluídas em hexano antes da injeção.

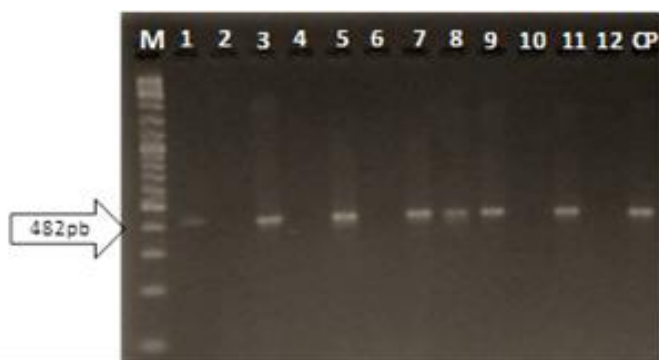
Os padrões utilizados foram todos da marca Sigma com pureza 99-98% com as seguintes Referencias: 89329 (timol); 282197 (Carvacrol); 62118 (limoneno); 30039 (p-cimeno); 80605 (a-pineno); 30627 (a-terpineol); 86476 (g-terpineno). Para as retas de calibração foram preparadas diferentes diluições dos mesmos em hexano.

### **2.3 Resultados**

#### **2.3.1 Infecção das plantas de *Nicotina benthamiana* com os transcritos CMV-Fny**

As plantas de *N. benthamiana* inoculadas com os transcritos foram analisadas 1 mês após a inoculação.

Das 20 plantas inoculadas com os transcritos, 75% foram confirmadas como positivas, amplificando um fragmento de 482 bp correspondente ao tamanho esperado para o fragmento amplificado com os primers CMV IR3-FW e CMV CP4-REV (Figura 2.2).



**Fig 2.2-** IC/RT-PCR de algumas das plantas de nicotiana inoculadas com transcritos. As plantas positivas amplificaram um fragmento de 428 bp. **1 a 12** resultados da amplificação em plantas inoculadas com o transcrito; **CP-** Controlo positivo; **M-**Marcador Gene Ruler 1Kb DNA ladder (gel agarose 1%)

### 2.3.2 Inoculação de Plantas de *Nicotiana benthamiana* e *Coriandrum sativum* por transmissão mecânica

As plantas de *N. benthamiana* e *Coriandrum sativum* inoculadas de forma mecânica, a partir de plantas de *N. benthamiana* infetadas com transcritos CMV-Fny, começaram a apresentar sintomas transcorridos 15 dias após a inoculação. Na figura 2.3 pode-se verificar o maior desenvolvimento da planta controlo (P3) quando comparada com as duas plantas inoculadas (P1 e P2) 70 dias após a inoculação. A taxa de infeção para ambas espécies rondou sempre os 85-90%.



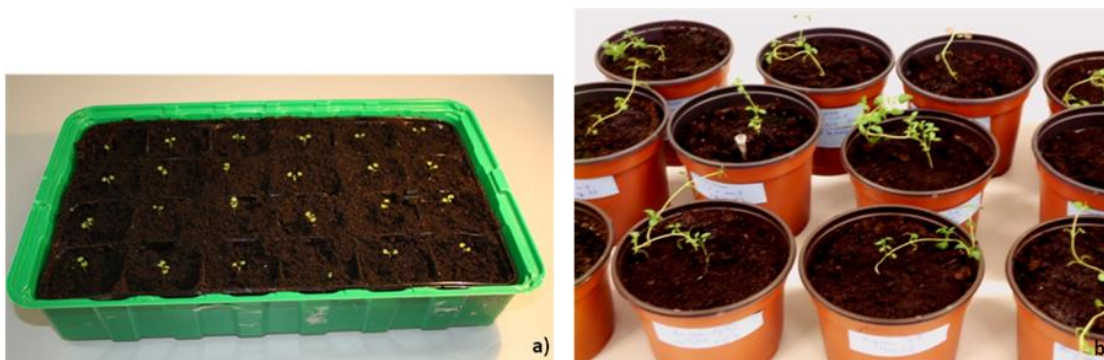
**Figura 2.3-** Plantas de *Nicotiana benthamiana*. **P1 e P2** – Plantas inoculadas com CMV 70 dias após a inoculação e **P3** – Planta controlo

Com o passar do tempo as plantas apresentaram sintomas mais patentes, sendo manifesta a rugosidade nos tecidos foliares, e um mosaico (Figura 2.4b).



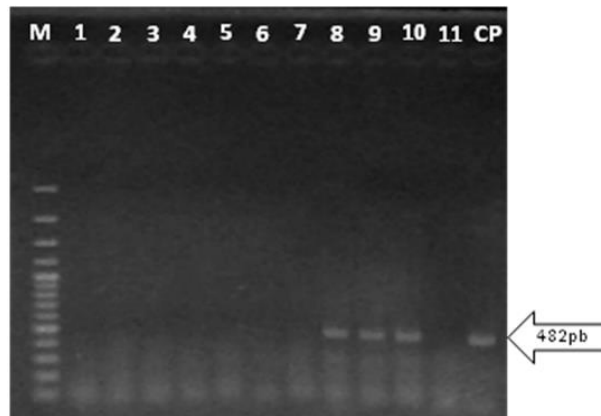
**Figura 2.4- a)-** Plantas de nicotiana infetadas com CMV após 6 meses de infecção. **b)-** Pormenor de planta de nicotiana infetada com CMV

As plantas de tomilho (Figura 2.5) foram inoculadas por transmissão mecânica a partir de plantas de *N. benthamiana* infetadas com os transcritos CMV-Fny.



**Figura 2.5- a)-** Plântulas de *Thymus vulgaris* com 2 a 4 folhas. **b)-** Plantas de *Thymus vulgaris* 90 dias após inoculação com CMV.

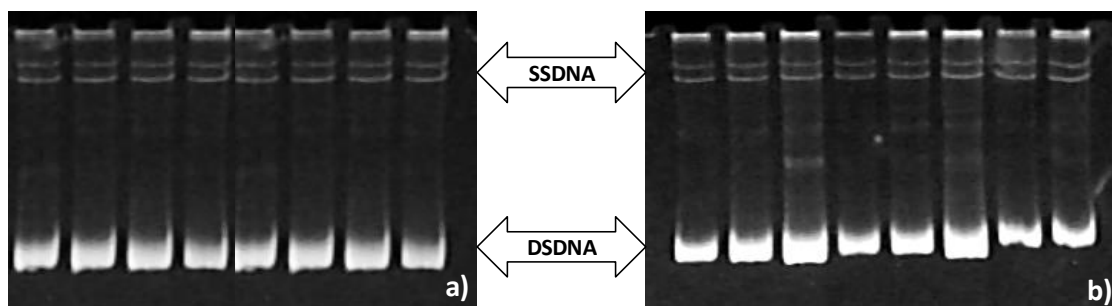
Mesmo com transmissão mecânica as plantas de *Thymus vulgaris* tiveram uma taxa de infecção muito baixa (12,5 %), representando 3 plantas num total de 24 (Figura 2.6). Foram feitas várias tentativas novas mas só num caso foi possível obter melhores resultados.



**Figura 2.6-** IC/RT-PCR das plantas de *Thymus vulgaris*. **1 a 7 e 11** – Plantas não infetadas, **8 a 10** – Plantas infetadas que amplificaram um fragmento de 482 pb, **CP**- Controlo positivo para amplificação do fragmento de interesse e **M** – Marcador Gene Ruler 1Kb DNA ladder (gel de agarose 1% (p/v))

### 2.3.3 Avaliação da variabilidade genotípica do CMV em plantas de *N. benthamiana*.

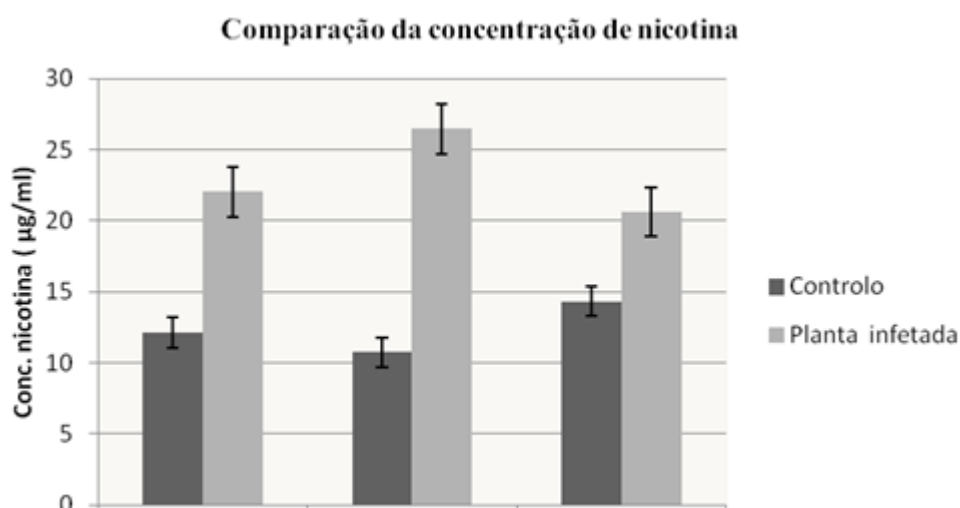
Para verificar se o clone infeccioso utilizado mantinha a estabilidade genómica, efetuaram-se análises por SSCP nos produtos de amplificação obtidos de algumas amostras positivas por IC/RT-PCR. Na figura 2.7 são demonstrados os resultados obtidos para 8 amostras selecionadas, no início e após 4 passagens sucessivas, por transmissão mecânica, em *N. benthamiana*. As passagens foram efetuadas ao longo de 2 anos com intervalos de 6 meses. Os resultados não evidenciam variabilidade entre as amostras analisadas.



**Figura 2.7-** Tipificação por SSCP de CMV. **a)**- Primeira passagem e **b)**- Quarta passagem. **SSDNA** – Single Strand DNA e **DSDNA** – Double Strand DNA (gel de poliacrilamida 8%).

### 2.3.4 Comparação dos valores de nicotina entre plantas de *Nicotiana benthamiana* infetadas com CMV e plantas saudáveis

A nicotina foi quantificada utilizando a recta de calibração do respectivo padrão. Para a quantificação por cromatografia de alta resolução em fase líquida, foram realizados três ensaios independentes, com três réplicas biológicas em cada um (Gráfico 2.1).



**Figura 2.8** - Comparação do conteúdo de nicotina em plantas de *N. benthamiana* infetadas com CMV e em plantas saudáveis. (Cada valor representa a média de 3 repetições biológicas)

Em todos os ensaios verificou-se um aumento na quantidade de nicotina nas plantas infetadas quando comparadas com os valores de nicotina nas plantas controlo.

### 2.3.5 Resultados obtidos na análise GC-MS entre os óleos essenciais de plantas saudáveis e de plantas infetadas com CMV de *Thymus vulgaris*

A Figura 2.9 mostra o perfil cromatográfico dos óleos essenciais obtidos de plantas de *T. vulgaris* controlo e plantas infetadas com CMV-Fny.



**Figura 2.9** - Cromatogramas sobrepostos mostrando o perfil dos óleos essenciais de tomilhos em plantas infetadas (vermelho) e não infetadas (verde).

A comparação das áreas, entre amostras controlo (verde) e amostras provenientes de plantas infetadas com CMV Fny (vermelho), exhibe diferenças para alguns dos compostos. Estas diferenças são também confirmadas quando se comparam as concentrações de alguns dos princípios ativos analisados em ambos tipos de amostras. Na tabela 2.1 se encontram os valores de concentração de alguns componentes obtidos a partir dos óleos essenciais de plantas de *T. vulgaris* infetadas por CMV Fny, em comparação com a composição do óleo essencial de plantas saudáveis.

**Tabela 2.1** – Concentração de alguns componentes nos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, em plantas infetadas com CMV Fny e não infetadas ( $Y=0,4463x + 0,2676$ ;  $R^2=0,9995$ ) (Anova: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , ns (não significativo))

T. Retenção (min)	Compostos	Controlo $\mu\text{mol/ml}$	CMV-Fny $\mu\text{mol/ml}$	ANOVA (P)
7.899	$\alpha$ -Pineno	5,87E+07	4,75E+08	***
10.119	$\gamma$ -Terpineno	1,20E+03	6,72E+03	***
11.491	<i>p</i> -Cimeno	9,17E+02	2,32E+05	ns
11.832	Limoneno	1,24E+02	9,30E+02	***
12.029	$\alpha$ -Terpineol	1,04E+02	3,05E+03	***
19.714	Timol	6,83E+05	1,56E+06	***
24.373	Carvacrol	5,70E+01	8,59E+02	ns

As diferenças encontradas na concentração de  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol, limoneno e timol entre plantas controlo e plantas infetadas, são muito significativas.

### 2.3.6 Resultados obtidos na análise GC-MS dos óleos essenciais de *Coriandrum sativum* infetados com CMV e em plantas saudáveis

Na Tabela 2.3 estão representadas as áreas de alguns dos componentes encontrados na análise por CG-EM do óleo essencial de *C. sativum*. Este óleo mostra um perfil constituído principalmente por aldeídos. A comparação entre os óleos essenciais obtidos a partir de plantas infetadas e saudáveis verifica diferenças no perfil da composição quando analisadas por CG-EM. Para este óleo essencial só foi possível a quantificação do composto Dodecano, devido à inexistência de padrões disponíveis.

**Tabela 2.3** – Área dos Componentes nos óleos essenciais de *Coriandrum sativum*, em plantas infetadas e saudáveis. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$

Compostos	Controlo Área	CMV-Fny Área	ANOVA
cis-4 Decenal	1,30E+09	2,25E+09	**
E-2-Decenal	1,84E+11	2,97E+11	***
Dodecano	4,28E+10	5,42E+11	**
Tetradecanal	2,48E+10	6,04E+10	***
Dihidrocumarina	3,62E+10	1,29E+11	*
Decanal	1,72E+05	1,26E+09	***
E-2-Decenol	1,88E+09	1,46E+09	ns
1-Decanol	2,79E+05	2,79E+09	ns
Dodecanal	2,55E+09	3,15E+10	***
cis-9-Hexadecanal	1,13E+09	1,58E+10	***

Para o Dodecano foi elaborada uma reta de calibração de modo a permitir a quantificação das áreas correspondentes nas plantas infetadas e saudáveis (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4** - Comparação da concentração de Dodecano em plantas de *C. sativum* infetadas com CMV e não infetadas. ( $Y=2E+0,7x + 1E+0,8$  ;  $R^2=0,994$ )

Quantificação	<i>C. sativum</i>	
	Controlo	Infetados
Dodecano ( $\mu\text{mol/ml}$ )	2134	27112 ***

A avaliação da concentração do dodecano evidenciou uma diferença significativa entre as concentrações, sendo referida um aumento na concentração de dodecano nos óleos essenciais provenientes de plantas infetadas. (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

## 2.4 Discussão

Um mês após a inoculação dos RNAs transcritos, era possível observar nas plantas de *N. benthamiana*, alguns sintomas relacionados (mosaico) à manifestação da doença, nomeadamente a apresentação de áreas de cor verde mais escura e rugosidades nos tecidos folhares. Os sintomas, incipientes no início foram progredindo e com o decorrer do tempo as deformações e rugosidades foram acentuando-se, e em algumas folhas, era possível evidenciar a existência de pintas amarelas.

Foi evidente também uma diferença no desenvolvimento das plantas de nicotiana, denotando-se um crescimento mais rápido e um maior desenvolvimento folhar nas plantas não inoculadas. Contudo, é de referir que as folhas das plantas infetadas, possuíam uma robustez e espessura superior à das folhas das plantas não inoculadas.

A confirmação de infeção por CMV nas plantas efetuou-se por IC/RT-PCR. 75% das plantas inoculadas com os transcritos de CMV-Fny revelaram estar infetadas. A inoculação por transmissão mecânica de CMV-Fny em plantas de nicotiana e coentro apresentaram sempre taxas de infeção que rondavam os 85-90%, revelando ser este um método muito eficiente e de rápida aplicação. No caso da transmissão mecânica para plantas de *T. vulgaris* a situação foi bem diferente visto só se ter verificado 12,5% de plantas infetadas.

Na avaliação da estabilidade genómica do vírus nas diversas passagens, realizada por análise de SSCP da proteína da cápside do CMV, não foram encontradas diferenças. Durante todo o período de realização dos ensaios, que se prolongou por dois anos, todas as amostras exibiram o mesmo padrão electroforético. A análise da estabilidade genómica por SSCP da CP sugere a inexistência de variações genómicas que poderiam ocorrer por adaptação a novos hospedeiros.

O CMV é um vírus com um número excecionalmente elevado de hospedeiros. A descoberta de que a proteína 2b do CMV é capaz de suprimir o silenciamento por RNA e as defesas antivirais da planta mediadas por Ácido salicílico (AS), revela novas estratégias defensivas usadas pelos virus e fornece alguma explicação molecular para a existência de uma gama tão elevada de hospedeiros para o CMV (Ji e Ding, 2001). Contudo têm sido reportados vários casos de resistência ao CMV. A resistência induzida ao CMV por AS em *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* resulta da inibição de movimento sistémico do vírus e é induzido através de uma via de transdução de sinal que também pode ser desencadeada por antimicina A, um indutor da enzima oxidase mitocondrial alternativa (AOX) (Ji e Ding, 2001). Estes resultados indicam que os mecanismos subjacentes à indução de resistência ao CMV em tabaco e *A. thaliana*

são muito semelhantes. Em contraste, em *Cucurbita pepo*, a resistência induzida por AS resulta da inibição da acumulação de vírus nos tecido diretamente inoculado (Ji e Ding, 2001). Nos resultados por nós obtidos, *T. vulgaris* revelou a aparição de necrose nas áreas inoculadas, podendo ser atribuída a uma reposta hipersensitiva (HR), o que mostra que diferentes espécies hospedeiras podem utilizar diferentes abordagens para resistir a infecção pelo mesmo vírus.

Se bem que alguns vírus possam contornar os mecanismos de defesa basais das plantas, as plantas respondem com o suicídio das células infetadas impedindo a progressão do vírus para outras partes da planta (Pontier et al., 1998). As lesões ou manchas cloróticas associada ao vírus, *ringspots*, e lesões necróticas nas folhas, caules e frutos são várias manifestações sintomáticas da resposta imune do hospedeiro desencadeado nas células infetadas (Mandadi e Scholthof, 2013). Enquanto as infeções onde as interações hospedeiro-vírus são de tipo resistente ou incompatível, disparam o mecanismo de resposta hipersensitiva e necrose, no caso de interações suscetíveis ou compatíveis, não se produzem fenótipos de lesão necrótica localizada para limitar a propagação do vírus nas plantas hospedeiras (Mandadi e Scholthof, 2013). Na infecção viral a resposta hipersensitiva é desencadeada quando um fator de avirulência codificado pelo patógeno, é reconhecido por um produto dos genes de resistência do hospedeiro (Moffett, 2009). Esta interação- fator de avirulência/proteína de resistência- ocasiona trocas nos níveis das hormonas, ácido salicílico, ácido jasmónico e monóxido de azoto e na acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS), tanto nos tecidos infetados como nos outros (Carr et al, 2010). As alterações ocasionadas a nível celular afetam a homeostasia do cálcio e alteram a permeabilidade e potencial das membranas (Carr et al., 2010). São também ativadas as enzimas de processamento vacuolar que participam como efetoras da morte celular ou necrose (Mur et al., 2008). A necrose é observada concomitantemente com a resposta hipersensitiva, se bem que pode em noutros casos estar desacoplada da resposta de resistência (Mandadi e Scholthof, 2013). Nos casos de HR e necrose, a acumulação do vírus está limitada a algumas centenas de células infetadas. Nas plantas de *Thymus vulgaris* por nós observadas, as lesões necróticas que as folhas apresentavam limitavam-se às zonas de inoculação, sendo que o resto da planta continuava a desenvolver-se normalmente. Análises efetuadas em folhas afastadas do local de inoculação, procurando a presença de vírus, nunca foram positivas, o que permite concluir que possivelmente fosse este mecanismo de resposta

hipersensitiva e necrose, que impediu a disseminação com êxito do CMV pelas plantas de *T. vulgaris*.

A avaliação de alterações no perfil de produção de alguns metabolitos nas plantas infetadas com CMV-Fny, teve por alvo a nicotina dentro do grupo dos alcaloides, no caso de *N. benthamiana*. No caso de *T. vulgaris* e *C. sativum* foi avaliada a composição dos óleos essenciais obtidos a partir das plantas infetadas.

As plantas de tabaco e de outras espécies de *Nicotiana* produzem o alcaloide nicotina, que é tóxico para os afídeos e contribui para a resistência à herbivoria. Pandey et al., (2008) demonstraram que em *Nicotiana attenuata* a RNA polimerase 1 (RdR1), que faz parte da via de silenciamento por RNA, regula uma série de processos de resposta ao ácido jasmónico, entre os quais a produção de nicotina. Demonstraram que em *N. attenuata* silenciando a RNA polimerase 1 endógena (RdR1), as plantas ficavam susceptíveis aos insetos. Estas observações sugerem que os siRNAs gerados, dependentes de RdR1, estão envolvidos na regulação das respostas de defesa da planta, e estas respostas por sua vez, são reguladas principalmente por fito-hormonas. O silenciamento por RNA é uma parte do sistema de defesa contra invasores virais e transposones (Pandey et al., 2008), que neste caso parece funcionar envolvendo a RdR1 na defesa mediada por siRNAs. A maioria das respostas de defesa contra herbívoros mastigadores em *N. attenuata* estão diretamente subordinados à regulação do ácido jasmónico, que domina fortemente a indução da resposta de defesa (Onkokesung et al., 2010). No entanto, um subconjunto de defesas reguladas pelo ácido jasmónico parece ser controlado e/ou requer etileno para a sua elicitação completa. Este mecanismo de regulação dupla pode não ser essencial para a defesa de *N. attenuata* contra herbívoros mastigadores, no entanto, pode ter um papel importante na defesa contra herbívoros de outros sistemas alimentares (por exemplo insetos perfuradores ou sugadores), que induzem um perfil diferente das respostas hormonais em plantas (Pandey et al., 2008). Após ataque de *Manduca sexta* em *N. attenuata* se verifica um aumento nos níveis de ácido jasmónico, relacionado com um incremento nos níveis de transcritos dos genes da biossíntese de ácido jasmónico (Pandey et al., 2008). Esta hormona é requerida para desencadear defesas químicas, como o aumento da nicotina. Ocorre simultaneamente um incremento no etileno que atinge seu máximo quando o nível de AJ começa a decair; o que sugeriria que o etileno atuaria regulando negativamente a produção de nicotina (Pandey et al., 2008). Provavelmente este mecanismo ajudaria a evitar a autotoxicidade e conduziria à poupança de recursos. O aumento no conteúdo de nicotina

verificado nas plantas de *N. benthamiana* infetadas com CMV-Fny (Fig. 2.8), parece estar relacionada com uma resposta defensiva ao ataque do vírus. Sendo o CMV um vírus que se transmite de modo não persistente é provável que esta estratégia favoreça um aumento na taxa de transmissibilidade, visto que após o ataque do afídeo e a ativação da via de defesa por ácido jasmônico, o aumento de nicotina, tóxica para os afídeos, estimularia a sua rápida deslocação para outras plantas saudáveis.

Na avaliação dos efeitos da infecção por CMV-Fny nas plantas de tomilhos estudadas, deparamo-nos com a morosidade no desenvolvimento da planta e a sua pouca biomassa. As folhas dos tomilhos possuem dimensões reduzidas o que dificulta a obtenção de amostras com massa suficiente para destilar. Assim sendo, as amostras provenientes de plantas de *T. vulgaris*, tanto saudáveis como infetadas, foram constituídas por “bulks” de folhas procedentes de várias plantas diferentes, normalizadas pela massa. O perfil cromatográfico dos óleos essenciais provenientes de plantas de *T. vulgaris* infetadas com CMV, foi comparado com o perfil de plantas não infetadas (Figura 2.9). Nos tomilhos infetados registaram-se diferenças significativas na concentração de timol,  $\beta$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol e limoneno (Tabela 2.1).

Em paralelo foi realizado um ensaio com *C. sativum*, referida na bibliografia como hospedeira de CMV. Estas plantas, quando inoculadas com CMV, demonstraram uma redução pouco acentuada do desenvolvimento. A composição do óleo essencial de *C. sativum* incluía voláteis na sua maioria não terpénicos, principalmente aldeídos e álcoois (Tabela 2.3). A análise do perfil da composição de estes óleos essenciais revela algumas diferenças quantitativas e qualitativas dos princípios ativos nas plantas infetadas com CMV. A quantificação do dodecano mostra um aumento na sua concentração nos coentros infetados. Foram confirmadas também diferenças qualitativas devido à existência de fitol e eicosanal em plantas saudáveis que não aparecem em plantas infetadas.

Ainda são pouco entendidos os mecanismos que dirigem as interações vector-planta nos hospedeiros infetados por vírus. No caso de CMV-Fny é reportada a indução duma resistência suave à alimentação de *Myzus persicae* em plantas de *Cucurbita pepo*, e o aumento na produção de voláteis que atraem insetos (Mauck et al., 2010). Isto está em relação com o modo de transmissão não persistente do CMV, onde a dispersão do vírus se vê favorecida por períodos de alimentação curtos (Macuk et al., 2010). Contrariamente, para o tabaco, Ziebell et al., (2011) encontraram que a infecção por CMV-Fny promovia a sobrevivência dos afídeos.

A verificação de alterações na composição de voláteis também em plantas de *T. vulgaris* e *C. sativum*, obtida por nós, revela que a infecção por CMV Fny afeta de alguma maneira os mecanismos de produção de metabolitos secundários. Neste sentido, o incremento dos aldeídos registado nas plantas de coentros infetadas com o CMV, poderia ser explicado como resultado da oxidação dos ácidos gordos, produto do aumento da acumulação de ácido salicílico em resposta à infecção viral, por parte da planta. Os efeitos antivirais do ácido salicílico traduzem-se em alterações nas espécies reactivas de oxigénio (ROS) a nível das mitocôndrias (Singh et al. 2004; Wong et al. 2002). A fonte do aumento das ROS mitocondriais é a oxidação dos ácidos gordos. A oxidação dos ácidos linoleicos e  $\alpha$ -linolénico induz a formação de ácidos C9-C12 e subsequentemente álcoois, aldeídos e esteres de baixo peso molecular (Bruneton, J. 1999).

Foi também recentemente reportado que o *stress* causado pela infecção de CMV em plantas de *Echinacea purpurea*, induz a libertação de uma elevada quantidade de dois monoterpenos, o mirceno e alfa-pineno (Kumari et al., 2014).

Estes resultados, vêm mostrar que o *stress* biótico originado pela infecção por CMV causa alterações no perfil dos metabolitos secundários, o que se corresponde com os resultados obtidos no presente trabalho. O registo de alterações produzidas em alguns metabolitos em *N. benthamiana* e nas aromáticas estudadas, após infecção com CMV-Fny, parece confirmar este facto. É cada vez mais evidente que o aumento na concentração de proteínas virais tem muitas consequências para a expressão de genes no hospedeiro e para o seu metabolismo (Whitman et al., 2006).

Se bem a infecção por CMV parece ser um caminho possível para elaborar uma estratégia de aumento da produção de metabolitos de interesse em algumas espécies, a dificuldade de inoculação e a morosidade na produção de biomassa poderão revelar-se limitantes.

## Capítulo 3 – A proteína supressora CMV – Fny 2B e seus efeitos na supressão transiente

### 3.1 Introdução

No capítulo anterior ficaram demonstrados os efeitos em alguns dos metabolitos secundários provocados pela infecção do CMV. Foram também evidentes os efeitos do vírus ao nível do crescimento, provocando a lentidão na produção de biomassa e um menor desenvolvimento da maioria das plantas. Assim o objetivo nesta parte do trabalho foi testar se a expressão da proteína 2B do CMV-Fny, poderia afectar os voláteis sem alterar as características das plantas infetadas. Por um outro lado é importante referir que a infecção com CMV com vistas a melhorar a produção de voláteis, não é alternativa viável, visto tratar-se de um vírus com grande capacidade de infecção e capaz de abranger uma diversidade de hospedeiros.

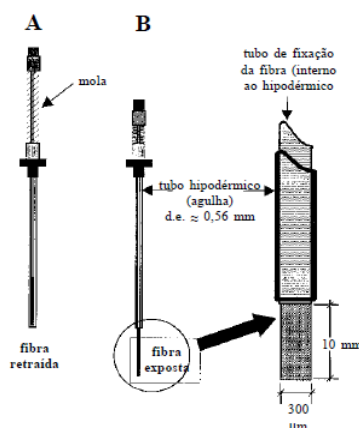
Se bem que a atividade supressora da proteína 2B do *Cucumber mosaic virus* seja amplamente conhecida, assim como o seu efeito na resistência dos vírus induzida por ácido salicílico (AS), o trabalho de Ziebell et al., (2011) veio demonstrar também a sua ação na inibição da resposta dos genes regulados pela fitohormona ácido Jasmónico (AJ), uma molécula de sinalização fundamental na defesa contra insetos. Este autor sugere que a proteína 2B afetaria indiretamente a transmissão do vírus mediada por afídeos. A interrupção da sinalização hormonal por parte da proteína 2B, poderia associar-se ao silenciamento mediado por RNA ou à própria via do AS (Lewsey et al., 2010). Adicionalmente, a ligação do supressor 2B a siRNAs e a dsRNAs (Goto et al., 2007) para além de reforçar o seu papel como agente supressor de silenciamento, pode contribuir para as modificações observadas.

A biossíntese de ácido salicílico facilitado pela proteína 2B durante infecção viral, pode actuar antagonicamente para suprimir a via de defesa regulada por ácido jasmónico via AS/AJ “crosstalk” (Zarate et al., 2007). O fenómeno de “crosstalk” refere-se a vias metabólicas que podem actuar de modo antagónico ou sinérgico, permitindo à planta responder com versatilidade aos estímulos externos e minimizar os custos de defesa.

Em situações de stress biótico ou abiótico as plantas respondem activando mecanismos de defesa induzida. Um destes mecanismos envolve a produção de compostos orgânicos

voláteis, e pode conduzir ao incremento de voláteis emitidos constitutivamente ou a sínteses de novos compostos.

A determinação dos voláteis pode ser feita com recurso ao método da microextração de fase sólida (solid phase microextraction SPME). Trata-se de uma microtécnica que prepara as amostras para análises de cromatografia gasosa, sendo a suas principais valências a não utilização de solvente, a alta capacidade de concentração e o fácil transporte do material extraído para o cromatógrafo. O dispositivo básico de SPME consiste em um bastão de fibra ótica, de sílica fundida de 100 mm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberto com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente (Pires Valente e Augusto F, 1999). O revestimento da fibra remove os compostos da amostra por absorção no caso de revestimentos líquidos e adsorção no caso de revestimentos sólidos. Posteriormente, a fibra é inserida no cromatógrafo para posterior dessorção e análise.



**Figura 3.1-** Dispositivo da fibra de Microextração em Fase Sólida (MEFS). (A) Posição com a fibra retraída na agulha, (B) Posição com a fibra exposta. (Extraído de Pires Valente et al, 1999)

## 3.2 Materiais e Métodos

### 3.2.1. Clonagem da proteína supressora 2B do CMV-FNy

O gene 2B foi clonado utilizando o sistema de clonagem Gateway da Invitrogen. A partir do RNA obtido de plantas infetadas com CMV-Fny, tratado no capítulo 2, foi amplificado um fragmento de 392 bp por RT-PCR, utilizando primers específicos que incluem uma parte da sequência attB. (Tabela 3.1). Posteriormente no segundo passo, os

produtos obtidos foram novamente amplificados com os primers attB adapter, de modo a que o produto tivesse a sequência attb completa necessária para acontecer a recombinação no vector pDONR 221. As reações de amplificação continham 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, o volume final da reação foi 50 µl. Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes: 94°C durante 2 minutos, 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 passos 3 ao 5 foram repetidos 30 vezes. Os produtos resultantes foram analisados em gel de agarose a 1% em tampão TAE e revelados com brometo de etídio. Para registro das imagens foi utilizado o software BIO-1D versão 6.02 (Kodak). Os produtos PCR foram purificados com o Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit e posteriormente quantificados no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). A reação BP continha 1 µl da enzima BP Clonase, 100 ng/µl do vector pDONR221, 50 ng do Produto PCR e tampão TE pH 8, O volume da reação era de 8 µl e a incubação procedia overnight a 25°C. Posteriormente a reação foi parada com a adição de 1% de Proteinase K (Invitrogen), 10 minutos a 37°C.

Para a transformação utilizaram-se 100 µl de células competentes One shot Mach 1 (Invitrogen) e 5 µl da reação BP. Procedeu-se primeiro a uma incubação de 30 min em gelo, seguida de 1 min a 42°C e depois da adição de 250 µl de meio SOC, as células foram incubadas a 37°C com agitação durante 1 hora. Transcorrido dito tempo foram plaqueados 100 µl em meio LB com canamicina 50 µg/ml. As placas foram incubadas overnight a 37°C.

A confirmação da presença das colônias transformadas foi feita por PCR, depois do qual a colônia foi crescida a 37°C, em meio líquido LB com antibiótico apropriado e durante 16 horas. Posteriormente o plasmídeo foi obtido utilizando o Gene JET™ Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante. A confirmação da sequência inserida foi feita por sequenciação.

O gene 2B inserido no vetor de entrada foi transferido para o vetor binário pK7WG2 (Karimi *et al.*, 2002), através da reação de recombinação LR. O vetor pK7WG2 é um vetor de expressão, em que o gene clonado fica regulado a montante pelo promotor 35S, um promotor constitutivo na maioria das plantas e a jusante pelo terminador do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV).

Para a reação LR utilizaram-se 50 ng do vetor de entrada 100 ng do vetor de destino, 1 µl da enzima clonase sendo e 10 mM de tampão TE pH8. A incubação procedia overnight a 25°C.

A transformação, crescimento e seleção dos clones foi feito como anteriormente explicado, utilizando 50 µg/ml de espectinomicina.

### **3.2.1.1. Transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* C1C58**

Neste processo foram utilizadas células competentes de *A. tumefaciens* preparadas pelo método do cloreto de cálcio (Seidman *et al.*, 1997).

Para a transformação genética 100 µl de células competentes de agrobacterium foram incubadas com 1 µl do plasmídeo de interesse, a 37°C durante 5 minutos e logo em gelo durante 30 segundos. Foram plaqueados 50 µl da reação de transformação, em meio LB com rifampicina, gentamicina e espectinomicina 50 µg/ml. As placas foram incubadas durante 48 horas em estufa a 28°C. A confirmação de clones positivos foi feita por PCR como acima referido.

**Tabela 3.1-** Primers desenhados tendo por base a Sequência do Genbank de RNA2 de CMV-Fny: NC002035. *As bases em itálico fazem parte do attb site.*

#### **Primers utilizados para a clonagem Gateway**

**CMV-2B-Gw1: AAAAAGCAGGCTTAATTATGGAATTGAACGTAGG**

**CMV-2B-Gw2: AGAAAGCTGGGTAGTTTCAGAAAGCACCTTCC**

**attB1 adapter GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**

**attB2 adapter-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**

**Primers para amplificação do gene 2B (amplificam todo o gene e algumas bases adjacentes)**

**2B-Fw- GGTTCAGAAAGCACCTTCC (Posição 2412 – 2435)**

**2B-Rev- GGTTCAGAAAGCACCTTCC (Posição 2755 – 2736)**

### **3.2.1.2. Outros plasmídeos usados: pK7-ERGFP; lh-GFP; amiRNA-GFP**

Todos eles foram também construídos no laboratório de virologia da UALG utilizando o sistema de clonagem Gateway. O pk7-GFP-ER foi preparado a partir da clonagem de um fragmento de 644 bp da sequência mGFP-ER (Haseloff *et al.*, 1997), que leva um sinal de localização para o retículo endoplasmático. O lhRNA-GFP (long hairpin) está constituído pelo fragmento da GFP em orientação antisense, um intrão que é parte do vector pk7GWIWG2 e o fragmento da GFP em orientação sense. O microRNA artificial

foi construído seguindo a metodologia descrita por Schawab et al (2006). Para o desenho foi definida uma região de interesse (5'- UCGCUGAUCAUUAUCAACAAA-3') do mGFP5-ER e foi utilizado o servidor online WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). O amiRNA-GFP foi clonado utilizando o sistema Gateway, no vector pk7WG2

### 3.2.1.3. Transformação de *Agrobacterium*

Os plasmídeos foram inseridos em *Agrobacterium tumefaciens*, C1C58 utilizando a transformação química convencional (Hofgen et al., 1988). A seleção foi feita com rifampicina, gentamicina e espectinomicina a 50 µg/ml.

Todas as culturas foram crescidas em médio LB suplementado com 10 mM MES e 20 µM acetoseringona a 28 °C até um OD de 0.6 a 600 nm.

### 3.2.2 Ensaio de coinoculação de *N. benthamiana*

Os plasmídeos pK7-CMV2B, pK7-ER-GFP , lh-GFP e ami-GFP foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* C1C58 e utilizados no ensaio de coinoculação.

Grupos de 5 plantas de *Nicotiana benthamiana* wt, foram inoculadas com as diferentes modalidades de acordo com a tabela 3.2.

Tabela 3.2- Modalidades utilizadas nas inoculações

Modalidade	Vectores
M1	pK7-GFP-ER
M2	pK7-GFP-ER ; lh-GFP
M3	pK7-GFP-ER; lh-GFP; pK7-CMV2B
M4	pK7-GFP-ER; ami-GFP
M5	pK7-GFP-ER; ami-GFP; pK7-CMV2B

Para realizar a coinfiltração, volumes iguais dos três ou dois plasmídeos foram reunidos num tubo falcon e centrifugados a 5000 rpm durante 15 min. Os pellets obtidos foram ressuspendidos em solução aquosa constituída por 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES (pH 5.6) e 100 µM de acetoseringona, pH 5,6, e deixadas em repouso por uma hora a 25°C no escuro.

A inoculação foi feita na página inferior das folhas sem abranger as zonas de nervuras, utilizando uma seringa de 5 ml sem agulha, pressionando o tecido foliar até o líquido se

infiltrar nos espaços intercelulares. A monitorização da infiltração era feita visualmente através do alargamento de uma mancha escura de aspecto encharcado.

### **3.2.3 Inoculação de plantas de *Thymus citriodorus***

A preparação da cultura de *Agrobacterium* contendo o plasmídeo pK7-CMV2B foi equivalente à acima descrita. As plantas de *T. citriodorus* foram inoculadas por infiltração como descrito em 3.2.2. Os ensaios de inoculação e controlos foram feitos em triplicado.

### **3.2.4 RT-PCR para confirmar a expressão da proteína 2B em plantas de nicotina e tomilho**

O RNA total foi extraído das plantas de nicotiana e tomilho utilizando o reagente Trizol (Life Technology) e seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras foram tratadas com DNase Turbo da marca Ambion (1U/ 100 µg RNA) durante 30 min a 37°C. O RNA resultante foi quantificado no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). As reações de amplificação foram efectuadas num volume final de 50 µL contendo 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos “primers”, 3U da transcriptase reversa M-MuLV (Life Technology) e 1 U de Taq DNA polymerase e 1X do seu tampão. Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes: 38°C durante 45 min, 94 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 92 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s, com uma incubação final de 72 °C durante 5 min. Os resultados foram visualizados em gel de agarose (1%).

### **3.2.5 Western Blot**

As amostras de proteína foram extraídas com Trizol (Life Technology) e seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra, 100 µg de proteína foram diluídos em 10 µL de “loading buffer” [Tris-HCl 0,125M pH 6,8, SDS 4% (w/v), glicerol 20% (v/v), β-mercaptoetanol 0,1M e azul de bromofenol 0,02% (w/v)]. Antes da aplicação no gel, as amostras foram fervidas a 100 °C por 5 minutos. As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida-SDS (12%-5%). 8 µL do marcador Page-Ruler Prestained (Fermentas) foi utilizado em todas as corridas. A eletroforese foi desenvolvida durante 90 minutos a 200 V. O tampão de corrida foi Tris-Glicine pH 8,6. Após conclusão da

corrida as proteínas foram transferidas para membranas de polivinilideno (Immobilon-PVDF, Millipore), previamente ativada em metanol, utilizando o sistema de transferência Electrobloetter LKB Multiphor II Novablot (Pharmacia) em tampão Tris-HCl (25 mM), glicina (92 mM), metanol (20%) e SDS (0,1%). A transferência foi realizada a 200 mA durante uma hora.

A membrana foi incubada em solução de bloqueio (5% de leite em pó) em tampão TBS, constituído por 50 mM de Tris e 150 mM de NaCl. Após 3 lavagens a membrana foi incubada overnight a 4°C com uma diluição 1:2000 dos anticorpos policlonais para GFP, (Ref- A11122, Life Technology). Após três lavagens em TBS a membrana foi incubada numa diluição (1:5000) dos anticorpos secundários anti coelho conjugados com fosfatase alcalina (Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase antibody in goat, Sigma), em TBS. A revelação foi feita com o sistema NBT-BCIP AP (Roche).

### **3.2.6 Microextração em Fase Sólida (MEFS) para avaliação dos voláteis**

#### **3.2.6.1 Preparação da amostra**

Duzentos miligramas (200 mg) de folhas de tomilho foram pulverizadas num almofariz com azoto líquido e colocadas em tubos Falcon de 15 ml contendo 1 ml de etanol: água (50:50). Foram extraídas durante 30 minutos com agitação e seguidamente os tubos foram submersos em azoto até o momento da análise. As amostras foram retiradas do azoto 15 minutos antes da análise e colocadas a temperatura ambiente de 25°C. A tampa do tubo era perfurada com uma agulha na altura da análise e a fibra de MEFS era introduzida pelo orifício. Após uma extração de 15 minutos a fibra de MEFS era retirada e transferida para o local de injeção no cromatógrafo gasoso. Durante 5 min os analitos eram des-absorvidos da fibra por ação térmica. A fibra utilizada foi 65µm PDMS/DVB Fused Silica (Supelco).

#### **3.2.6.2 Análise das amostras obtidas**

As amostras foram caracterizadas e identificadas partir do seu espectro de massa utilizando as bibliotecas do National Institute of Standards and Technology (NIST12 ou NIST62). Para a quantificação de alguns compostos específicos, foram preparados padrões que foram analisados em condições idênticas às das amostras.

Para esta análise o equipamento utilizado foi um cromatógrafo Shimadzu 17-A equipado com um espectrómetro de massa Shimadzu QP-500. Para a separação foi

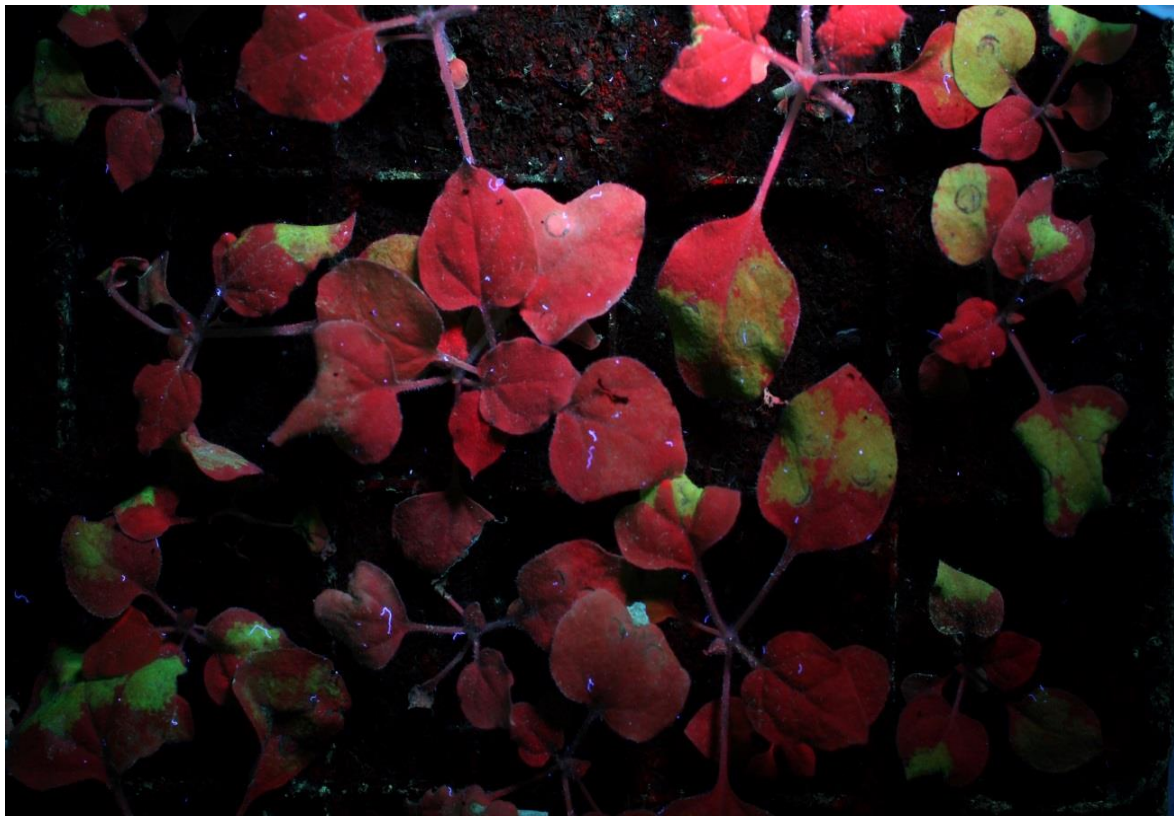
utilizada uma coluna J&W Scientific DB-1701P de 30 m x 0,25 mm i.d. and 0,25  $\mu$ m. A temperatura do forno do CG foi programada de 40°C (5 min) até 230 °C, com uma rampa de 5 °C/min, permanecendo depois durante 5 min a 230 °C. O espectro de massa foi registado no modo de impacto eletrónico (IE) a 70 eV. A temperatura da interface era 250 °C. Para aquisição e processamento dos dados foi utilizado o programa Class 5K. Os perfis dos picos foram caracterizados a partir do seu espectro de massa utilizando as bibliotecas do National Institute of Standards and Technology (NIST12 ou NIST62).

### **3.3 Resultados**

#### **3.3.1 A Proteína supressora 2B do CMV suprime o silenciamento dos indutores lh-GFP e ami-GFP**

O ensaio de coinoculação em *N. benthamiana* teve por finalidade confirmar se o vetor construído expressava a proteína 2B, e se a mesma conseguiria exercer o seu efeito supressor sobre o silenciamento da expressão de uma proteína, a GFP. Para tal utilizaram-se as construções lh-GFP e ami-GFP que se sabia à priori (Gouveia et al., 2012) serem fortes indutores de silenciamento de GFP.

Passados 2 dias as plantas inoculadas com a modalidade 1 estavam a exprimir GFP. Esta expressão continuaria a crescer sendo máxima ao quinto dia e mantendo-se durante pelo menos 10 dias, mas com menor intensidade. As plantas inoculadas com a modalidade 2 e 4, ambas inoculadas com GFP e com os indutores de silenciamento ami-GFP e lh-GFP, ao quinto dia mostraram estar silenciadas. No entanto, as plantas inoculadas com a modalidade 4 e 5 que para além de GFP e indutor expressavam a proteína 2B, mantiveram a cor verde no local de inoculação, persistindo com maior intensidade durante pelo menos 10 dias. A figura 3.2 mostra o aspeto das plantas 5 dias após inoculação.



M3

M2

M1

**Figura 3.2-** Ensaio de Coinoculação. M1-pK7-GFP; M2-pK7-GFP + lh-GFP; M3-pK7-GFP + lh-GFP + pK7-CMV2B



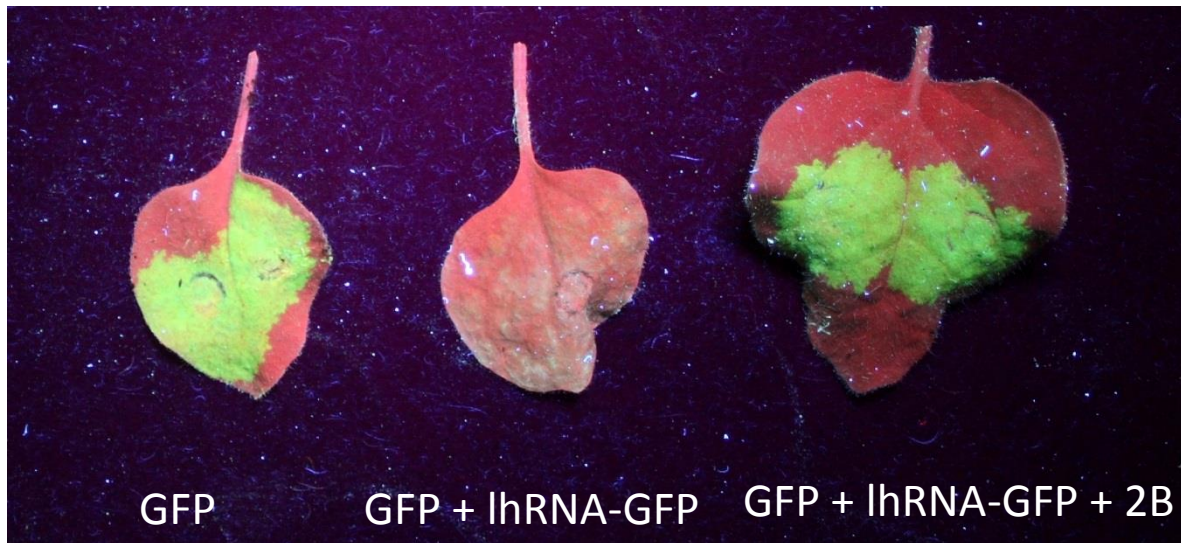
wt

M1

M4

M5

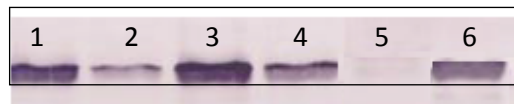
**Figura 3.3-** Ensaio de Coinoculação. Nicotiana wt; M1-pK7-GFP; M4-pK7-GFP + ami-GFP; M5- pK7-GFP + ami-GFP + pK7-CMV2B



**Figura 3.4-**Ensaio de coinfiltração (folhas individuais) - **M1**-pK7GFP;  
**M2**-pK7GFP+lhRNA-GFP; **M3** pK7GFP+lhRNA-GFP+ pK7-CMV2B

### 3.3.2 Expressão de GFP monitorizada por western blot no ensaio de supressão

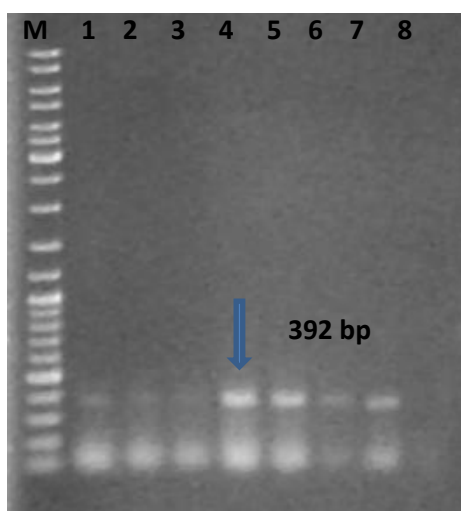
A GFP foi detectada por western blot a partir de anticorpos específicos. A quantidade de proteína dispensada em cada amostra foi de 100 ug. Nas amostras onde estavam presente os indutores lh-GFP e ami-GFP (Fig. 3.5 2, 4) a expressão da proteína é manifestamente mais fraca do que no controlo. Nas amostras em que o supressor 2B inibia o silenciamento dos indutores (Fig 3.5. 1,3) a detecção da GFP é tão intensa como no controlo. Estas amostras foram recolhidas ao terceiro dia após a inoculação.



**Figura 3.5-** Western Blot Ensaio supressão 1- pk7-GFP+lhGFP+pk7-CMV2B; 2- pK7-GFP+lhGFP; 3- pK7-GFP+amiGFP+pk7-CMV2B; 4- pK7-GFP+amiGFP; 5- WT; 6- pk7-GFP

### 3.3.3 Confirmação da acumulação de mRNA 2B em plantas de *Nicotiana benthamiana* e de *Thymus citriodorus*

A acumulação de mRNA 2B nas plantas inoculadas com a construção pK7-CMV2B foi confirmada por RT-PCR utilizando os primers específicos. Procedeu-se à remoção do DNA em todas as amostras testadas, para eliminar eventuais falsos positivos devido à amplificação a partir de pK7-CMV2B. O mRNA 2b foi amplificado em todas as plantas de *Nicotiana benthamiana*, enquanto no caso dos tomilhos a percentagem foi de 70%, mostrando uma menor eficiência de agroinfiltração nestes. A figura 4 mostra o produto de amplificação (392Bp) das amostras de RNA de Thymus.



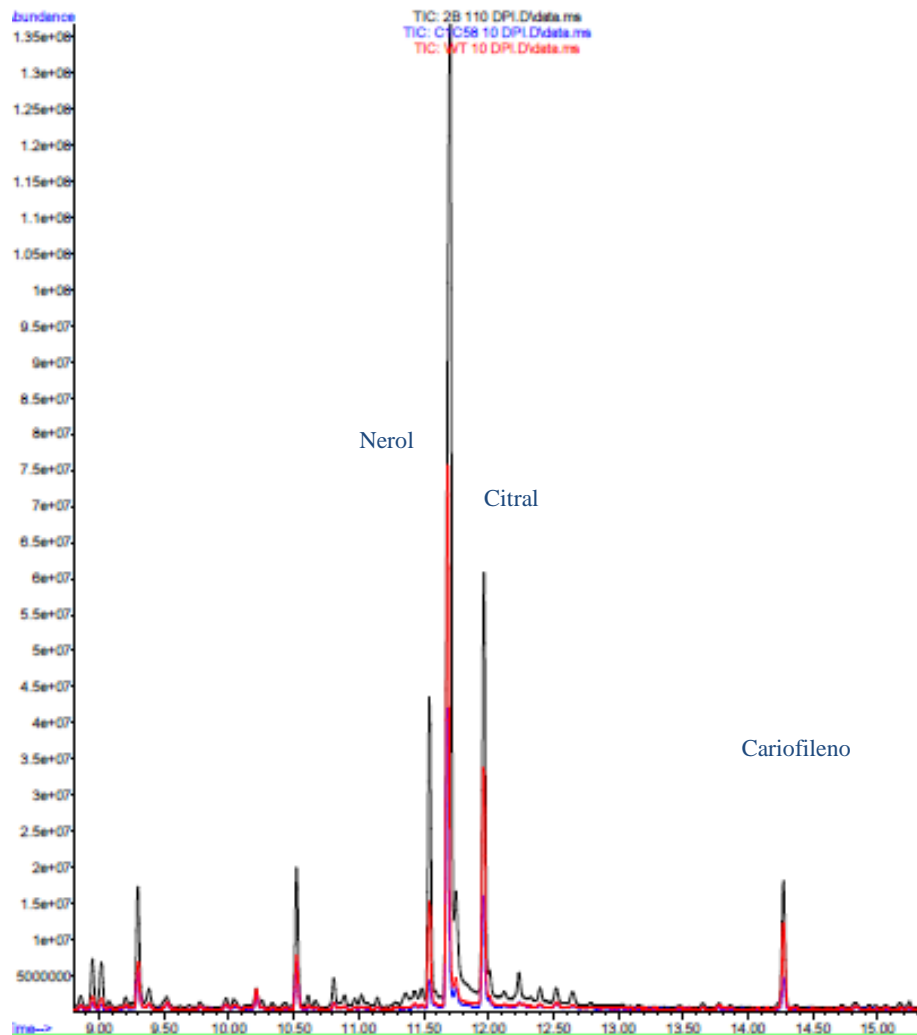
**Figura 3.6-** Confirmação da expressão do supressor 2B (RT-PCR). M- Marcador Gene Ruler 1 Kb . **1,2,3** *Thymus citriodorus* ; **4,5,6, 7** *Nicotiana benthamiana*; **8** Controlo negativo.

### 3.3.4 Efeito da expressão transiente do supressor 2B no perfil dos de voláteis em *Thymus citriodorus*.

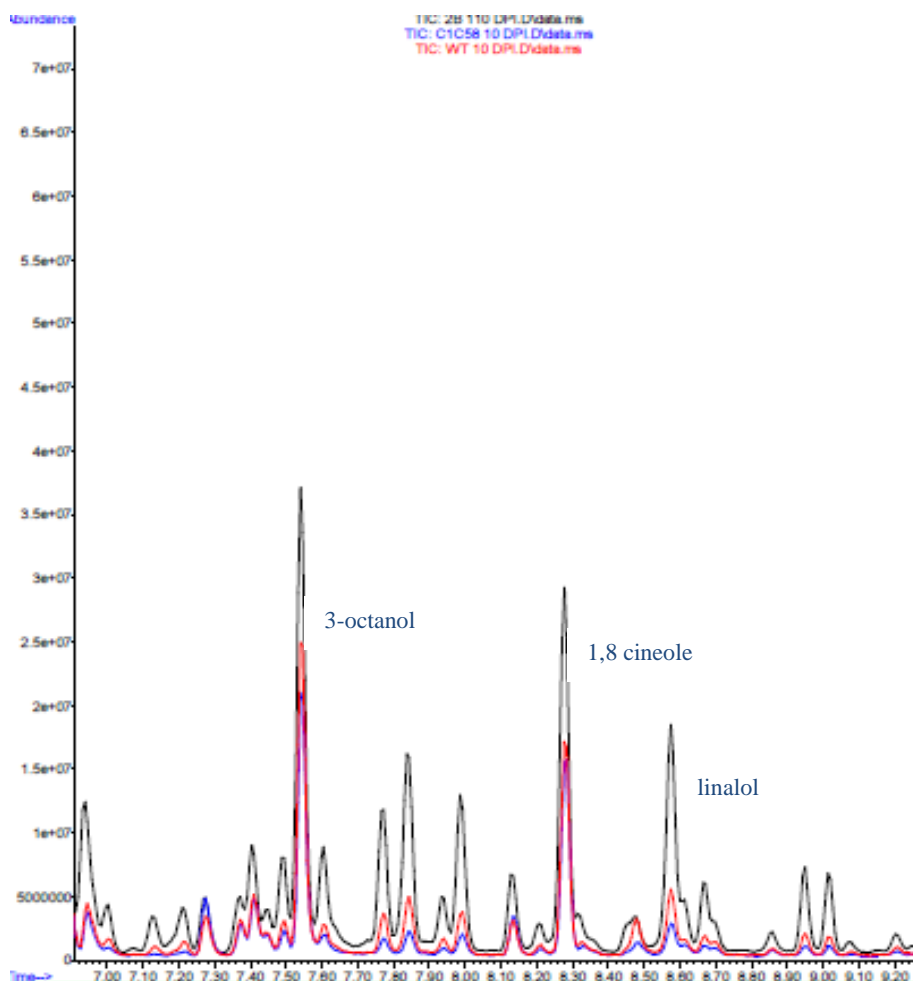
Após confirmação da expressão do supressor 2B do CMV nas plantas de *Thymus citriodorus*, 5 dias após inoculação foi efetuada a avaliação do perfil de voláteis com recurso a MEFS. Os perfis de plantas wt e plantas inoculadas apenas com agrobacterium foram utilizados como controlo negativo e comparadas com o perfil proveniente de plantas expressando o supressor 2B. O perfil de voláteis foi obtido sempre a partir da mesma massa vegetal.

Observou-se um ligeiro acréscimo em alguns dos compostos provenientes de amostras do controlo negativo quando comparadas com as plantas wt. Já nas amostras

provenientes de plantas expressando o supressor 2B o aumento de alguns dos compostos foi significativo (Figuras 3.7 e 3.8).



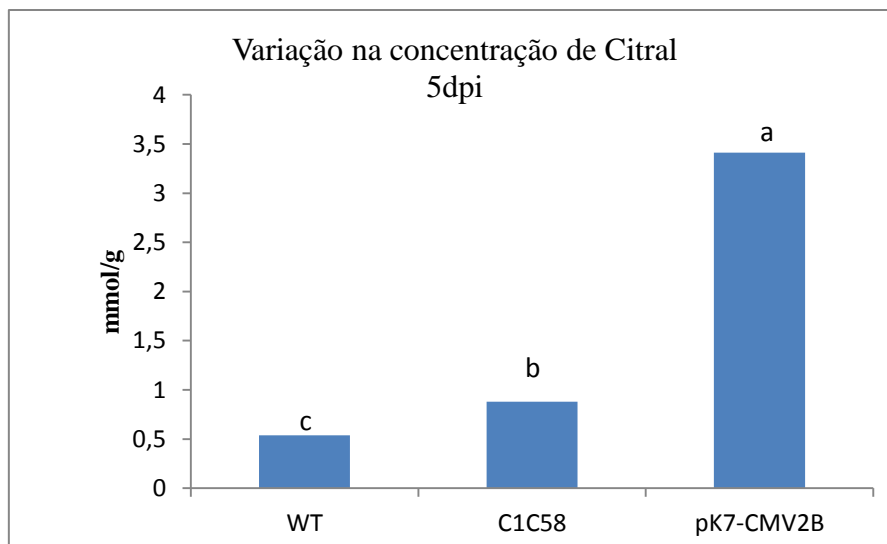
**Figura 3.7-** Efeito da expressão transiente de 2B nos voláteis de *Thymus citriodorus*  
Vermelho: plantas WT; Azul: controlo negativo; Preto: 2B plantas expressando o supressor CMV 2B



**Figura 3.8-** Efeito da expressão transiente de 2B nos voláteis de *Thymus citriodorus*  
 Vermelho: plantas WT; Azul: controlo negativo; Preto: 2B planta expressando o supressor CMV 2B

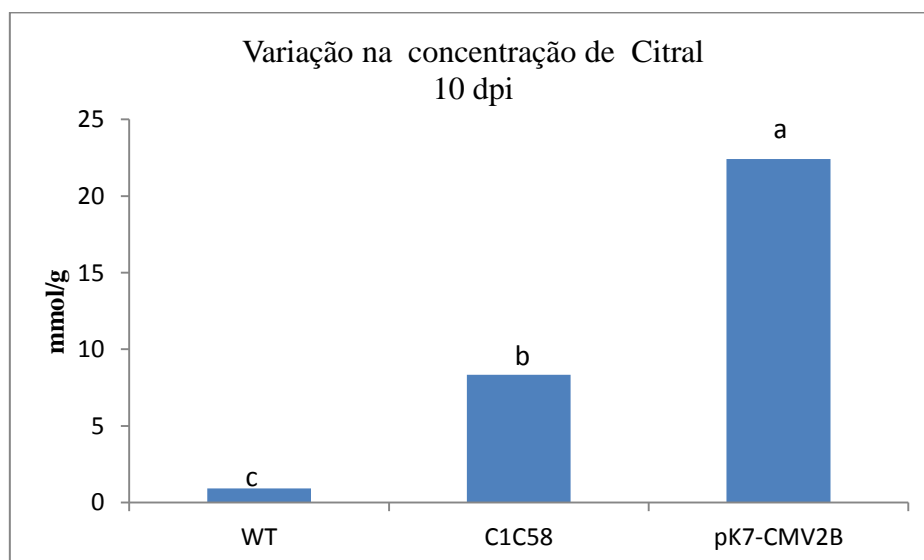
### 3.3.5 Aumento na concentração de Citral e Linalol nos perfis de voláteis em tomilhos expressando a proteína 2B

A partir das alterações observadas nos perfis de voláteis, selecionaram-se dois analitos para quantificação. A figura 3.9 mostra a concentração de citral e linalol em *Thymus citriodorus* 5 dias após inoculação. É evidente o aumento na concentração destes dois metabolitos nas plantas inoculadas quando comparada com as a das plantas controlo. A concentração de citral é 3,5 vezes maior nas plantas expressando o supressor 2B quando comparadas com a do controlo negativo *Agrobacterium* e 6 vezes quando comparadas com o tipo WT. No caso do linalol a sua concentração é 2 vezes superior nas plantas expressando a proteína 2B, quando comparadas com as plantas inoculadas com *Agrobacterium*, e 3 vezes superior quando comparadas com as plantas WT.

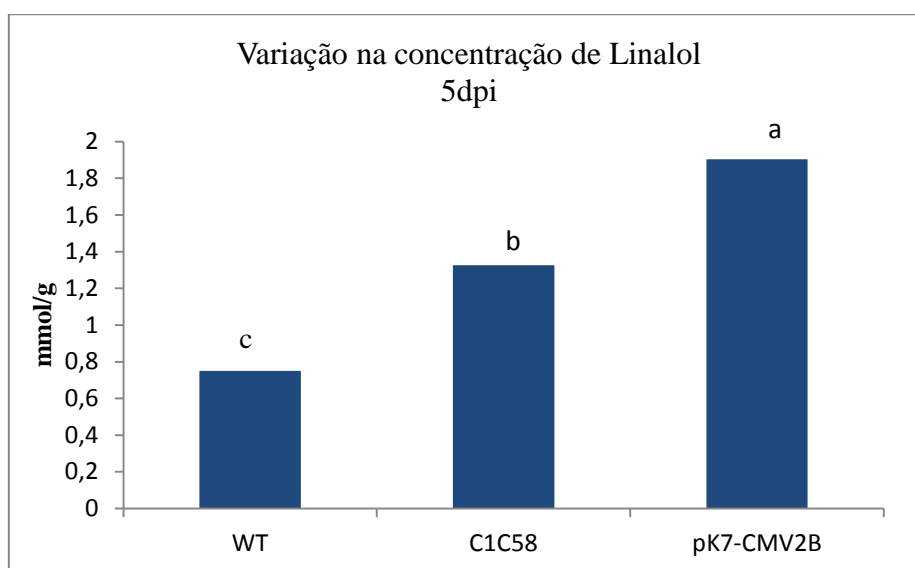


**Figura 3.9-** Concentração de citral em plantas de *Thymus citriodorus* 5 dpi. pK7-CMV2B (plantas expressando 2B); wt plantas não inoculadas; C1C58 controle negativo. Os dados representam triplicados de três ensaios independentes. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ , Duncan's test)

Uma nova avaliação das mesmas plantas, 10 dias após inoculação, revelou um incremento na concentração de citral quando comparado com os dados obtidos para o quinto dia (Figura 3.10).



**Figura 3.10-** Concentração de citral em plantas de *Thymus citriodorus* 10dpi. PK7-CMV2B (plantas expressando 2B); WT plantas sem inoculação; C1C58 (controle negativo). Os dados referem-se a triplicados de três ensaios independentes. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ , Duncan's test).



**Figura 3.11-** Concentração de Linalol em plantas de *Thymus citriodorus* 5 dpi. PK7-CMV2B (plantas expressando 2B); WT plantas sem inoculação; C1C58 (plantas inoculadas só com estirpe *Agrobacterium* C1C58). Os dados referem a triplicados de três ensaios independentes. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ , Duncan's test)

### 3.4 Discussão

A observação de fluorescência devida a GFP em *Thymus* revelou-se muito difícil devido à autofluorescência das plantas e à pequena dimensão das folhas (resultados não mostrados). Assim optou-se por demonstrar a funcionalidade da construção com o gene 2b e sua capacidade em suprimir o silenciamento promovido por indutores de silenciamento considerados fortes, lh-GFP e ami-GFP, em *N. benthamiana*. Ambos indutores demonstraram ser igualmente eficientes em silenciar a GFP e aos 5dpi as folhas, observadas com UVs, exibiam áreas vermelhas mais intensas nos pontos de inoculação, como verificado em Gouveia et al., (2012).

Nas modalidades em que, para além da GFP e do indutor, foi inoculada a proteína supressora 2B observou-se um aumento na intensidade e persistência da cor verde. Estes resultados mostram que a proteína supressora 2B tem a capacidade de suprimir o silenciamento induzido por lhRNA-GFP e amiRNA-GFP em plantas wt de *N. benthamiana*. Estes resultados foram confirmados por western blot onde é evidente a

diferença na quantidade de GFP detetada nas diferentes modalidades. O *western blot* revelou uma diminuição da expressão de GFP na presença dos indutores lh-GFP e ami-GFP (Fig. 3.5. 2,4). Nas amostras em que o supressor 2B inibia o silenciamento dos indutores (Fig 3.5. 1,3) a detecção da GFP foi tão intensa como no controlo.

O supressor 2B do CMV é referenciado como capaz de introduzir alterações no metabolismo do hospedeiro, que facilitam a transmissão do vírus por afídeos. Vários autores, entre os quais Lewsey et al., 2010, atribuem estas mudanças às alterações metabólicas desencadeadas pelo supressor 2B, nomeadamente a promoção da biossíntese de ácido salicílico e a inibição da expressão de genes mediada pelo ácido jasmónico, um sinal químico do hospedeiro que regula a resistência aos insetos.

Os resultados que obtivemos evidenciam alterações significativas no perfil dos voláteis das plantas de *T.x citriodorus* expressando o supressor 2B, 5 dias após a inoculação (Figs 3.9 e 3.11). Em geral ocorreu um aumento que foi reforçado quando as mesmas plantas foram avaliadas, 10 dias após inoculação (Fig.3.10). À luz dos efeitos referidos no parágrafo anterior este aumento nos compostos voláteis, pode estar relacionado com interações planta-insecto-vector que, envolvem mecanismos moleculares pouco entendidos e muitas vezes contraditórios.

Existem diferenças significativas no efeito do Fny-CMV consoante o hospedeiro considerado. Como já foi mencionado, induz uma resistência moderada ao afídeo *Myzus persicae* em abóboras (Mauck et al, 2010) contrariamente ao que se verifica no tabaco (Ziebell et al, 2010). Segundo Mauck et al., 2010 a resistência moderada nas abóboras poderia contribuir com a dispersão do CMV, que ao ser transmitido de modo não persistente, seria favorecido por curtos períodos de alimentação e rápida dispersão para outras plantas.

É igualmente reportado por Mauck et al., (2010) que o CMV-Fny induziu um aumento na produção de voláteis atrativos para os afídeos, comprovando que as plantas infetadas com CMV-Fny emitiam mais voláteis e apresentavam uma fraca qualidade como hospedeiras, isto é, os afídeos migravam com maior frequência das plantas infetadas quando dada a oportunidade e exibiam uma diminuição do crescimento populacional quando forçados a alimentar-se delas. Porém as plantas infetadas com CMV revelaram-se igualmente atrativas para os afídeos do que as plantas saudáveis. Aquele autor conclui que um patógeno pode alterar os fenótipos das plantas, com vista a induzir comportamentos nos vectores, que sejam benéficos para o patógeno em detrimento do vector. Ao que parece o CMV induz um aumento das emissões totais de voláteis nas

plantas infestadas sem se registarem grandes mudanças qualitativas na composição. Assim, as plantas infestadas por CMV, apesar do seu menor porte em relação ao das plantas saudáveis e da sua má qualidade como hospedeiras, podem efetivamente imitar as pistas de odor que as plantas saudáveis de maior porte emitem aos afídeos. Mauck et al., (2010 ) propõe como explicação, que o aumento nos voláteis seria uma estratégia para mimetizar os odores emitidos por plantas saudáveis de maior porte. Deste modo os afídios seriam atraídos para estas plantas doentes o que logo, favoreceria a dispersão do vírus.

No caso do tabaco, Ziebell et al., (2011) reportaram uma inibição da resistência aos afídios, produto da acção do supressor 2B. O autor assume que se bem esta diminuição na resistência pode não contribuir no aumento da transmissibilidade do vírus, pode por outro lado garantir a persistência e re-emergência sazonal dos afídeos. É possível concluir que a manipulação das vias de sinalização de defesa para melhorar a sobrevivência do vector possa ser um papel das proteínas supressoras (Ziebell et al, 2011).

Um outro caso de indução de resistência moderada aos afídeos, foi reportado em plantas de *Arabidopsis* infetadas com CMV-Fny. A conjugação das três proteínas virais (1 a, 2 B e 2 a) parece equilibrar a necessidade do vírus de inibir o silenciamento antiviral enquanto induz uma resistência moderada aos afídeos, o que se pensa que contribui para promover a transmissão (Westwood et al., 2014). A infeção de *Arabidopsis* com a estirpe Fny de CMV induz a biossíntese de 4-metoxi-indol-3-il-methylglucosinolate (4MI3M), substância que inibe a ingestão de traslocados do floema por parte dos afídeos, desencorajando o seu estabelecimento na planta hospedeira. A presença da proteína 2B do CMV em hospedeiros infetados, aumenta a acumulação de CMV e das outras proteínas virais (Westwood et al., 2014). A proteína 2a desencadeia a sinalização defensiva, levando à acumulação de 4MI3M (Westwood et al., 2014). A proteína 2B pode inibir a AGO1, que tanto regula positivamente a biossíntese de 4MI3M como negativamente a acumulação de substâncias tóxicas para os afídeos (Westwood et al., 2014). No entanto, a replicase 1a modera a inibição de AGO1 mediada por 2B, garantindo que os afídeos são dissuadidos de alimentar-se, mas não intoxicados (Westwood et al., 2014). Deste modo, a infeção por CMV conduziria os afídeos a procurar outras plantas para se alimentar, contribuindo para a transmissão do vírus.

Os resultados obtidos no nosso trabalho vão ao encontro do cenário proposto por Mauck et al., (2010). Se bem que tenha sido registado um aumento na abundância dos

compostos presentes nos perfis cromatográficos em plantas de *T.x citriodorus* expressando a proteína supressora 2B, a composição manteve-se constante, quando comparados com os perfis das plantas controle.

A estratégia de utilizar o supressor 2B do CMV para conseguir um aumento nos voláteis parece ter sido bem sucedida. O interesse que a indústria farmacêutica e cosmética têm em certos metabolitos voláteis, leva as empresas produtoras destes compostos a procurar novas estratégias que contribuam para esse fim. A exigência de matéria-prima com elevado teor nestes metabolitos, não é na maioria das vezes considerada pelos produtores de plantas aromáticas, muitas vezes por desconhecimento desta situação.

O ponto negativo deste trabalho é a dificuldade na inoculação de plantas em escala, apesar de terem sido experimentados alguns procedimentos utilizando o sistema de inoculação coletivo por vácuo, que ainda não se encontra suficientemente otimizado e desenvolvido.

## Capítulo 4 Construção do vector viral TRV para expressão sistêmica do supressor 2B do CMV

### 4.1 Introdução

Dadas as limitações da expressão apenas local pela estratégia transiente, o objetivo neste capítulo foi a construção de um vetor, que permitisse a expressão sistêmica e por longo tempo, do supressor 2B. Para tal empregou-se um vector baseado no Tobacco rattle virus (TRV).

O TRV pertence ao grupo dos Tobravirus, é um vírus de RNA de genoma bipartido, de cadeia positiva com 2 segmentos TRV1 (6.79 Kb) e TRV2 (4,5Kb). O TRV1 codifica todas as funções necessárias à replicação, movimento na planta e supressão de silenciamento, sendo capaz de se replicar autonomamente (Senthil-Kumar and Mysore, 2014). O TRV2 varia conforme os isolados e tem genes que codificam a proteína da cápside e proteínas não estruturais com funções relacionadas com a transmissão por nemátodos (Visser and Bol, 1999) (Figura 4.1).

O TRV tem sido empregue como vector de expressão ou de VIGS (Virus Induced Gene Silencing). Padmanabhan e Kumar (2008) eliminaram as proteínas não estruturais substituindo-as por um *multicloning site* em que pode ser inserido o gene a silenciar por corte / ligação ou pelo sistema Gateway. Para evitar a inoculação através de RNA, cada componente do genoma foi inserido num plasmídeo binário que é transferido para a célula vegetal por agro-inoculação (figura 4.2).

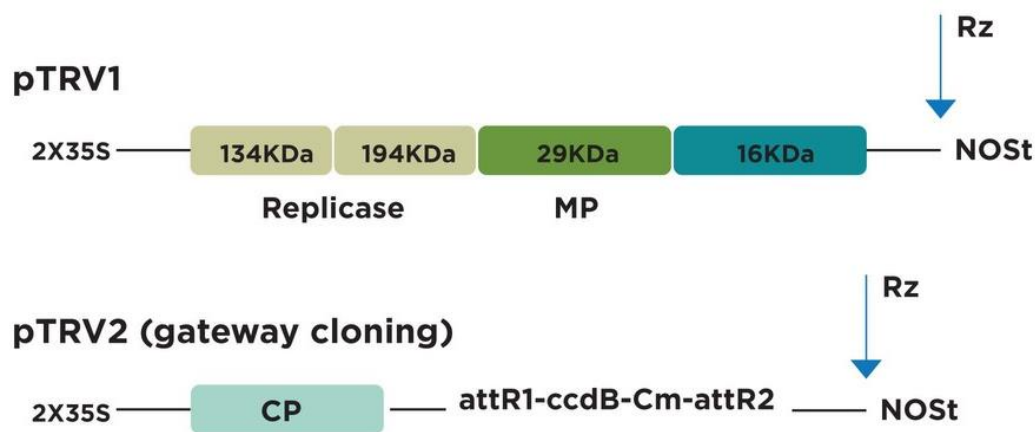
#### Wild-type TRV1



#### Wild-type TRV2



**Figura 4.1-** O *Tobacco rattle virus* é um vírus de RNA bipartido, de polaridade positiva. TRV1 (i.e., RNA1) codifica as proteínas replicases de 134 e 194 KDa a partir de RNA genómico, e a proteína da cápside de 29KDa e uma proteína rica em cisteínas de 16KDa a partir de RNAs subgenómico. O TRV1 pode-se replicar e mover sistemicamente sem o TRV2. (Adaptado de Senthil-Kumar e Mysore , 2014).



**Figura 4.2- Vector VIGS baseado em TRV.** Cada componente genómico está inserido num vector binário, entre o promotor duplicado (2x35S CaMV) e o terminador da nopalina sintetase (noSt). A sequência de uma ribozima foi também incluída para originar uma maior uniformidade de tamanho dos transcritos. Neste caso a inserção do fragmento a silenciar no TRV2 é feita por recombinação LR. (Adaptado de Senthil-Kumar e Mysore, 2014).

As aplicações do vector TRV têm sido muito variadas. Os vectores TRV são utilizados para estudar o efeito do silenciamento de um gene específico nas plantas, ou aspetos relacionados com o desenvolvimento das mesmas, a biossíntese de metabolitos, respostas ao stress biótico e abiótico e aspetos evolutivos (Padmanabhan e Kumar, 2008). O silenciamento mediado por TRV pode ser mantido por um longo período de tempo o que possibilita o planeamento de diversos ensaios na mesma planta. Uma das características específicas deste vector referenciada por Senthil-Kumar e Mysore, (2014) é a sua capacidade de infetar a planta toda, especialmente os meristemas, permitindo a propagação por sementes nas gerações seguintes, o que não acontece na maioria dos vectores virais.

O vector TRV tem sido também utilizado para expressão de proteína heteróloga em suspensões celulares e raízes de *N. benthamiana* (Larsen e Curtis, 2012). Se bem que MacFarlane e Popovich, (2000) tenham reportado que o nível da expressão de GFP nos vectores virais PVX e TRV era semelhante em folhas de *N. benthamiana* infetadas sistemicamente, Larsen e Curtis, (2012) referem que a infeção por TRV resultou numa acumulação 10-25 vezes maior de GFP nas raízes. Esta disparidade de expressão foi atribuída ao tropismo radicular do TRV. A utilização de TRV como vector de expressão requer a inclusão em TRV2 de um promotor sub-genómico adicional a montante do

gene que se deseja expressar. MacFarlane e Popovich, (2000) utilizaram para o efeito o promotor da proteína da cápside de outro Tobravirus, o *Pea early Brown vírus*.

A utilização do TRV como vector de expressão da proteína 2B do CMV, em *N. benthamiana* e *Thymus* permitiria avaliar os potenciais efeitos deste supressor no metabolismo das plantas quando expressado sistemicamente.

## 4.2 Materiais e Métodos

### 4.2.1 Construção do PDONR-ZEO-PEBV-2B

Costa et al, 2014 desenvolveram um vector de expressão baseado em TRV, apto para aplicar ao sistema Gateway, a partir do vector de Liu *et al.* (2002). Este vector tinha sido desenhado para estudos de VIGS, e a clonagem do gene de interesse era feita na orientação antisense. A alteração efetuada permitiu a clonagem de genes em orientação sense sob controlo do promotor da CP de *Pea early-browning virus* (PEBV). A construção consistiu na amplificação da sequência do promotor da CP de PEBV ligado ao gene GFP presente no vetor TRV RNA2- GFP (pTR9598) construído por MacFarlane e Popovitch (2000), e posterior inserção deste fragmento no pDONR-ZEO utilizando a recombinação BP do sistema Gateway. A GFP que estava ligada ao promotor PEBV, foi retirada por dupla digestão incompleta com NCOI (Thermo Scientific) e ECORI (Fast Digest, Thermo Scientific).

Neste caso, para a clonagem do gene 2B, partiu-se da construção pDONR-ZEO contendo o promotor da CP do PEBV a montante da GFP. A amplificação do produto PCR destinado à reação Infusion, foi feita a partir do pK7-2BCMV (referenciado no capítulo3) utilizando os primers específicos contendo respectivamente o local de restrição *Nco* I e *Eco* R1. Os primers utilizados foram os seguintes e as letras em bold correspondem ao gene 2B:

INF-2B-NCO AGTTAACGAGCCAT**GGAATTGAACGTAGG**

INF-2B-ECO TACCGAGCTCGAAT**TTTCAGAAAGCACCTTCC**

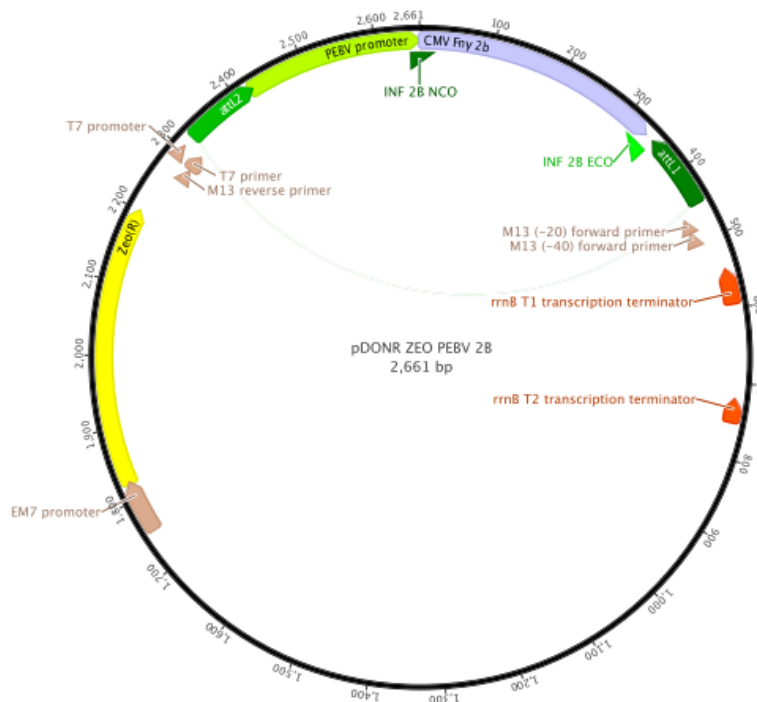
A reação de amplificação continha 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos primers, 1.25U de DNA Polimerase Pfu e o respetivo tampão (Thermo Scientific). Os ciclos de temperatura aplicados foram de 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto e

72°C durante 5 minutos. O produto de PCR foi purificado com o kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery.

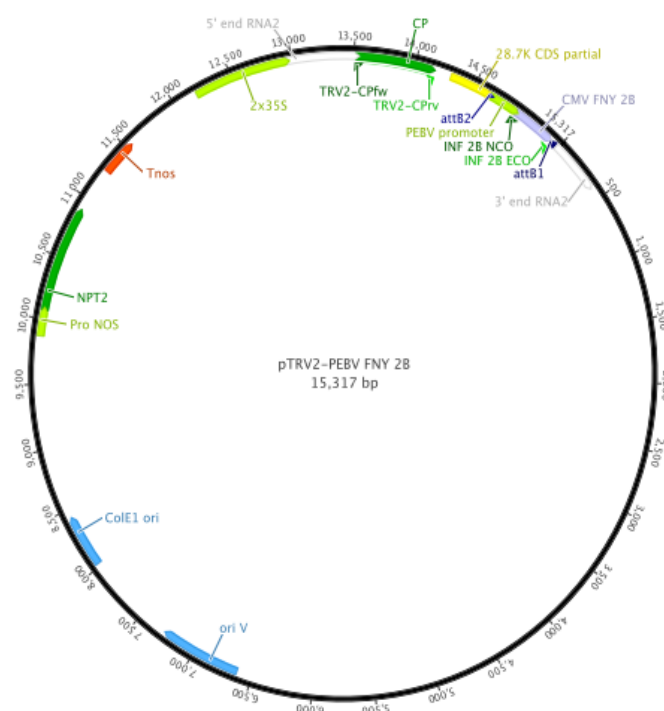
A clonagem foi feita utilizando o kit In-Fusion HD (Clontech) e o procedimento seguiu as instruções do fabricante. Foram utilizados 50 ng do produto PCR purificado e 100 ng do vetor de entrada pDONR-Zeo-pPEBV. Posteriormente foi feita a transformação em células competentes Stellar-Cells (Clontech). Para tal 1 µl do pDONR-ZEO-pPEBV 2B (Figura 4.3) foi adicionado a 100 µl de células competentes e incubados 30 min em gelo, 1 min a 42°C e 3 min em gelo. Após a adição do meio SOC, as células foram incubadas a 37°C durante 1 hora. Foram plaqueados 100 µl e as placas foram incubadas a 37°C. Os clones positivos foram confirmados por sequenciação.

A recombinação LR do sistema Gateway foi utilizada para inserir o gene 2B, a partir do vetor de entrada pDONR-ZEO-pPEBV2B, no vetor de destino pTRV2-Gateway.

A confirmação do vetor pTRV2-2B (Figura 4.4) foi feita por digestão e por PCR com os primers 2b-Fw e 2b-Rev (descritos no capítulo 3).



**Figura 4.3-** pDONR Zeo PEBV 2B



**Figura 4.4-** pTRV2 –PEBV-2B

#### 4.2.2 Transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 com os vetores pTRV1 e pTRV2-2B

Os vetores virais TRV RNA1 e o vetor modificados pTRV-2B foram transformados em *A. tumefaciens* C58C1, através do método de eletroporação usando o Eletroporador II (Invitrogen). As células electrocompetentes foram preparadas segundo (Seidman *et al.*, 1997) e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Numa cuvette de eletroporação foram colocados 50  $\mu\text{l}$  de células competentes com 50 ng de DNA. Para a descarga elétrica foi utilizada uma resistência de 200  $\Omega$ ; capacidade de 50  $\mu\text{F}$  e diferença de potencial de 1800 V. Posteriormente foi adicionado 1 ml de LB e as células foram incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Foram plaqueados 100  $\mu\text{l}$  de células em placas com rifampicina, gentamicina e canamicina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . As placas foram incubadas em estufa a  $28^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.3 Inoculação das plantas de *Nicotiana benthamiana*, *Thymus vulgaris* e *Thymus citriodorus* com o vetor pTRV2-2B

Para a inoculação com *A. tumefaciens* transformadas com o pTRV1 e pTRV2-2B foram preparadas culturas em meio LB suplementado com 10 mM MES e 20  $\mu\text{M}$  acetoseringona, que se mantiveram a  $28^{\circ}\text{C}$  até atingir um OD de 0.6 a 600 nm.

Para realizar a coinfiltração, volumes iguais dos dois plasmídeos foram reunidos num tubo falcon e centrifugados a 5000 rpm durante 15 min. Os pellets obtidos foram ressuspendidos em solução aquosa constituída por 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES (pH 5.6) e 100 µM de acetoseringona, pH 5,6, e deixadas em repouso por uma hora a 25°C no escuro.

A inoculação foi feita na página inferior das folhas sem abranger as zonas de nervuras, utilizando uma seringa de 5 ml sem agulha, pressionando o tecido foliar até o líquido se infiltrar nos espaços intercelulares.

Foram inoculadas 12 plantas de *Nicotina benthamiana* e 12 plantas de *T. vulgaris* e *T.x citriodoros*.

#### **4.2.4 Confirmação da presença de RNA com a sequencia da proteína supressora 2B com Real time RT-PCR**

A confirmação da presença de RNA com a sequencia da proteína 2B, se fez aos 20 dpi. Para tal foi extraído RNA seguindo o método descrito em 3.2.4. Os primers utilizados para Real Time RT-PCR foram os seguintes:

2B 110 Fw: - GTCACAAAAGTCCCAGCGAGA (Posição 2528 – 2548 de NC002035 GeneBank)

2B 178 rev: - TGTCAGTTCCGAACCATCCAC (Posição 2596-2516 de NC002035 GeneBank)

Para as reações de amplificação utilizou-se o kit Iscript One Step RT-PCR com SYBR Green (Biorad). A mistura reativa foi preparada com 12,5 µl do tampão 2XSYBR Green, 0,2 µM de cada primer e 1 µl da enzima iscript transcriptase reversa, a quantidade de RNA utilizado foi 30 ng e o volume da reação foi 25 µl. Os ciclos de amplificação foram os seguintes: 10 minutos a 50°C; 5 minutos a 95°C e 35 ciclos a 95°C durante 5 minutos e 55°C durante 30 segundos. O equipamento utilizado foi um ICycler IQ (Biorad).

#### **4.2.5 Confirmação da atividade supressora do vector pTRV-2B**

De modo a comprovar a supressão após inoculação com o vector pTRV-2B, foi preparado um ensaio de co-inoculação em *N. benthamiana*.

Plantas 16 C que expressam a GFP constitutivamente, foram inoculadas com o vector pK7-ER-GFP. Outras foram co-inoculadas com pK7-ER-GFP e pTRV-2B.

Para a preparação das culturas e inoculação procedeu-se como descrito em 3.2.2.

#### **4.2.6 Preparação dos extratos de *Nicotiana benthamiana* para HPLC**

500 mg de folhas foram maceradas com azoto líquido e transferidos para um erlenmeyer com 5 ml de uma solução de metanol 40% contendo 0,5% de ácido acético. As amostras foram colocadas num agitador orbital durante 2 horas e posteriormente foram centrifugadas 12 min a 13000 rpm. O sobrenadante obtido foi filtrado com membranas de 0,20 µm (Millipore), e armazenado a -80°C até análise.

#### **4.2.7 HPLC dos extratos de *Nicotiana benthamiana***

Os padrões nicotina  $\geq 99\%$  (GC), ref. N3856 e ácido clorogénico  $\geq 95\%$  ref. C3878, eram da marca Sigma, assim como os solventes acetonitrilo, ácido acético e metanol, todos qualidade HPLC (Sigma). O equipamento utilizado e programa de eluição foram idênticos aos descritos na secção 2.2.9.3.

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Avaliação da supressão em *n. benthamiana***

As plantas de *N. benthamiana* 16 C expressam a GFP constitutivamente, pelo que quando observadas com UVs exprimem uma cor verde fluorescente nas folhas e caules. Quando estas plantas foram inoculadas com o vector de expressão para a GFP pK7-ER-GFP (M1), aconteceu silenciamento, e as plantas deixaram de exprimir a cor verde sob luz UV, ficando vermelhas. Na M2 a co-inoculação de GFP com o vector pTRV-2B, promoveu a supressão do silenciamento pelo que as plantas continuaram a expressar a cor verde quando observadas sob luz UV (Fig. 4.5).



**Fig. 4.5** Ensaio de supressão em *N. benthamiana* com vector pTRV-2B.

**M1-** Plantas 16 C inoculadas com pK7-ER-GFP e pTRV-2B; **M2-** Plantas 16 C inoculadas com pK7-ER-GFP 5 dpi.

#### 4.3.2 Avaliação dos resultados obtidos no Real time RT-PCR em plantas de nicotiana e tomilhos.

Os resultados obtidos na determinação do ciclo de limiar (“threshold cycle”, Ct) das amostras em RT-PCR em tempo real, mostraram a presença do gene 2B em 95% das plantas de *N. benthamiana*. Na Tabela 4.1 mostram-se os diferentes Ct que oscilaram entre 10,6 e 16,5 para as amostras inoculadas com TRV-2b. O controlo negativo foi constituído por um vector VIGS preparado no laboratório para silenciamento de quelato reductase férrica pTRV2-Fcr que originou valores de Ct muito elevados, sendo por isso considerados negativos (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1-** Diferenças nos Ct obtidos por Real Time RT-PCR em plantas de nicotiana.

Amostras RNA	Ct
pTRV2-2B	10,3
pTRV2-2B	16,5
pTRV2-2B	12,8

pTRV2-2B	13,8
pTRV2-2B	14,7
pTRV2-2B	15,5
pTRV2-2B	11,9
pTRV2-2B	12,7
pTRV2-2B	14,5
pTRV2-Fcr	31,9
pTRV2-Fcr	32,1
pTRV2-Fcr	31,7

Diversos ensaios feitos para infectar plantas de tomilho revelaram-se infrutíferos, não tendo sido possível demonstrar amplificação por RT-PCR nos sucessivos ensaios efetuados. Isto aplica-se tanto para o *T. vulgaris* como para o *T. citriodoris*.

#### 4.3.3 Concentração em nicotina e ácido clorogénico nos extratos de *Nicotiana benthamiana*, obtidos a partir de plantas infetadas com o vector pTRV2-2B

A concentração destes metabolitos nas plantas de *N. benthamiana* infetadas com pTRV2-2B, foi calculada a partir da reta de calibração dos padrões, ácido clorogénico ( $y=216600x-82,139$ .  $R^2=0.9977$ ), rutina ( $y=203510x+17.7$   $R^2=0.993$ ) e nicotina ( $y=274785x-2.8522$ ;  $R^2=0.9925$ ) (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2-**Quantificação do conteúdo de nicotina e ácido clorogénico em plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com o vetor pTRV2-2B, a expressar a proteína 2B.e plantas controlo inoculadas com pTRV2-FCR

Composto	Controlo (µg/g)	pTRV2-2B (µg/g)	P
Nicotina	240 ± 16.1	475 ±31.5	*
Ácido clorogénico	20 ± 5.4	89 ± 4.4	**
Rutina	305 ± 10.2	522 ±10.5	**

O valores são a média ± o desvio padrão, n = 10 \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ;\*\*\*,  $P < 0,001$ , ns (não significativo)

#### 4.4 Discussão

A construção de um vector de expressão sistémico tinha por finalidade estudar os efeitos do supressor 2B na planta a longo prazo. A expressão de 2B por parte do vector pTRV-2B foi confirmada no ensaio de co-inoculação em plantas 16 C de *N. benthamiana* (Fig. 4.5). 5 dias após a inoculação foi possível observar silenciamento em folhas inoculadas com GFP, que evidenciavam a perda da fluorescência quando observadas com UVs. Nas folhas onde a GFP fora coinoculada com pTRV-2B, observava-se persistência da fluorescência.

A presença de RNA do gene 2B por Real Time RT-PCR, foi confirmada passados 8 dias da inoculação. A monitorização continuou durante 30 dias sendo possível ainda verificar a expressão da proteína nas folhas novas. As amostras de RNA extraídas das plantas de *N. benthamiana* infetadas com o vector pTRV2-2B, mostraram estar a expressar em 95% das plantas testadas. Os Ct obtidos variaram entre valores de 10,6 e 16,6. Uma vez que o gene inoculado é multiplicado pela maquinaria viral na planta, os transcritos são logo espalhados sistemicamente através da mesma. Nos ensaios com pTRV2-GFP (dados não mostrados), foi possível observar que a expressão não é uniforme nos tecidos senão que existem áreas onde se localiza mais fortemente. Assim sendo, as folhas não apresentam um padrão idêntico, pelo que é de esperar diferenças na quantidade de RNA de 2B encontrado nas amostras recolhidas.

No caso do tomilho não conseguimos confirmar a expressão da proteína 2B tanto para *T. vulgaris* como *T. x citriodorus*. Se bem que nenhuma destas espécies se encontra descrita como hospedeira do TRV, está é a primeira referência que se faz ao respeito.

A replicação viral nos tecidos envolve a síntese de grandes quantidades de ácidos nucleicos e proteínas, situação que obriga a direcionar todos os recursos do hospedeiro para a síntese viral, o que pode comprometer alguns aspetos da fisiologia e resposta de defesa da planta (Conti et al, 2012). Os flavonoides são frequentemente produzidos em tecidos vegetativos sob condições de *stress*, tais como luz de alta intensidade, temperatura baixa, deficiência de nutrientes e ataque de patógenos ou senescência (Dixon et al., 1995). As enzimas necessárias à síntese de flavonoides, incluindo as antocianinas, são codificadas por genes estruturais, existindo também um conjunto de genes envolvidos na regulação espacial e temporal destes genes estruturais. Um exemplo bem documentado da relação entre infeção viral e alterações nos metabolitos secundários é um caso de *Vitis vinifera* infetadas pelo vírus que provoca o enrolamento

foliar da videira (GLRaV-3 ) descrito no trabalho de Gutha et al, (2010). Folhas de *Vitis vinifera* infetadas pelo vírus mostraram possuir quantidades significativamente maiores das três classes de flavonoides (antocianinas, flavonóis e proantocianidinas), como consequência da regulação positiva dos genes da via biossintética dos flavonoides, o que provoca um aumento nos níveis de expressão relativa dos mesmos (Gutha et al., 2010).

No nosso trabalho encontramos que a avaliação do conteúdo dos flavonoides, ácido clorogénico e rutina, em plantas de *N. benthamiana* inoculadas com pTRV2-2B, revelaram diferenças significativas. Foi registado um aumento da rutina de 1,7 vezes e de ácido clorogénico de 4,5 vezes, quando comparadas as amostras infetadas com o controlo (Tabela 4.2).

A quantidade de nicotina apresentou também diferenças significativas, sendo 1,98 vezes maior nas plantas expressando 2B do que no controlo (Tabela 4.2). Quando comparadas as quantidades de nicotina obtidas, no presente ensaio, com as obtidas a partir de plantas inoculadas com CMV, os valores são muito próximos. No ensaio com CMV, a nicotina sofreu um aumento relativo de 1,86 vezes quando comparada com o controlo, passou de 240 µg/g até 446µg/g. Nas plantas inoculadas com o vetor pTRV2-2B a nicotina passa de um valor médio de 240 µg/g a 475 µg/g com um aumento relativo de 1,9 vezes entre o controlo e as plantas inoculadas com a proteína 2B.

Nestas avaliações encontraram-se diferenças entre plantas inoculadas com o vetor pTRV2-2B e as plantas controlo inoculadas com pTRV2-FCR. A utilização deste controlo permitiu descartar uma relação entre as alterações nos metabolitos secundários e o efeito exercido pelo próprio vetor.

Os efeitos observados no perfil de metabolitos secundários nas plantas estudadas com recurso à proteína 2B do CMV, serviram como base para redação dum pedido provisório de patente. Esta patente que tem por Título: “Aumento da produção de metabolitos secundários em plantas, com recurso à expressão transiente da proteína 2B do *Cucumber mosaic virus*”, descreve o procedimento para a clonagem da proteína 2B num vector binário ou viral e a sua inoculação nas plantas via *Agrobacterium tumefaciens*. O pedido de registo provisório da patente nº 108397, encontra-se em análise no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

O aumento verificado em alguns dos metabolitos secundários nos extratos provenientes de plantas inoculadas com CMV e o vector viral pTRV2-2B, sugerem um aumento no poder reductor dos mesmos, e a sua possível aplicação no campo das nanotecnologias.

## Capítulo 5 - A utilização do CMV e do vector viral pTRV2-2B na preparação de nanopartículas de Prata

### 5.1 Introdução

A nanotecnologia tem despertado o interesse do mundo científico em virtude das propriedades únicas que os materiais alcançam nesta escala nanométrica. As suas aplicações vão desde a catálise (Jana et al., 1999), até a dermatologia (António et al., 2014), a eletrónica (Lú et al., 2007), etc. Dentro das nanopartículas, as de carácter metálico têm despertado interesse pelas suas aplicações. As nanopartículas metálicas exibem propriedades óticas, eletrónicas e catalíticas únicas, baseadas no seu pequeno tamanho e no elevado rácio superfície volume (Singh et al., 2010). As propriedades destes materiais são diferentes dos produtos a granel do mesmo tipo, e normalmente são afetadas pelo tamanho da partícula.

Convencionalmente, as nanopartículas são sintetizadas por redução de sais metálicos em solução, através de químicos perigosos que actuam como agentes redutores como o boro-hidreto de sódio, o sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfónio (THPS), polivinilpirrolidona ou hidroxilamina (Narayana e Sakthivel, 2011). Os métodos físicos envolvem a vaporização dos metais e a sua posterior deposição e coalescência em vários substratos conduzindo à formação de nano-estruturas (Okitsu et al., 2007). Embora estas abordagens de síntese tenham sido utilizados com êxito para produzir nanopartículas bem definidas, podem ser potencialmente perigosas para o ambiente, porque incluem a utilização de variadíssimos químicos que atuam como precursores, agentes estabilizantes e surfactantes (Rodríguez-León et al., 2013).

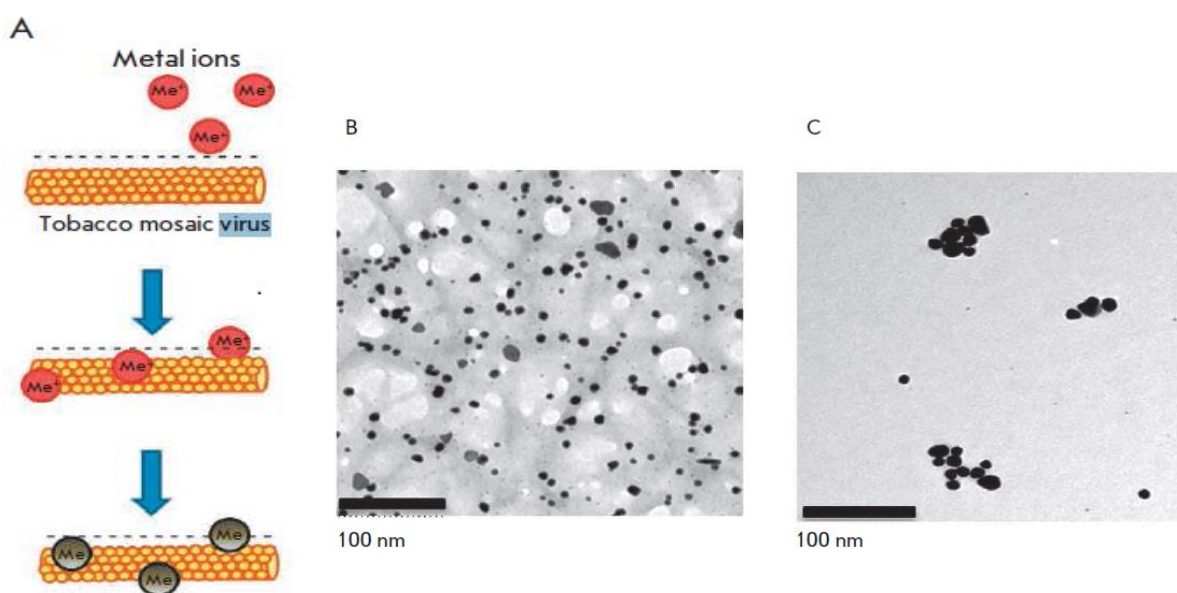
A Síntese verde (*Green synthesis*) tem vindo a contribuir no universo das nanotecnologias, como uma metodologia que não recorre a processos convencionais e que utiliza material vegetal como fonte do processo de síntese, reduzindo consideravelmente o impacto ambiental. É possível encontrar na bibliografia abundante informação sobre a utilização de extratos vegetais como agentes redutores, para conseguir obter NPs com êxito (Mittal, et al., 2013; Vankar et al., 2012; Basavegowda et al., 2013).

Se bem que a nanobiotecnologia recorra a sistemas biológicos para a síntese de nanopartículas, a síntese baseada em extratos de plantas ou biomassa vegetal, resulta ser mais conveniente. As plantas exigem um baixo custo de manutenção e apresentam rápida produção de biomassa, quando comparadas com bactérias e células animais. A

biomassa vegetal é muito abundante e pode ser uma alternativa na rentabilização e eliminação de resíduos industriais ou agrícolas.

Os vírus de plantas são alvo de interesse para a síntese de nanopartículas. A superfície viral possui grupos funcionais que podem ser explorados para a deposição e revestimento de materiais nas superfícies virais. Para além desta aplicação tem sido referida a utilização de vírus como aditivos em reações de sínteses de nanopartículas. Na patente WO2014045055(A1) (Love et al., 2014) mencionam-se como partículas virais adequadas para esta finalidade, os vírus sem envelope com cápside de arquitectura helicoidal, filamentosa ou icosaédrica.

Para efeitos de demonstração na referida Patente foram utilizados os vírus Tobacco mosaic virus (TMV) e Bovine papillomavirus-like particles (BPV VLPs), adicionados nas reações de sínteses com extratos de plantas ou inoculados nas plantas com que se fizeram os extratos (*Nicotiana benthamiana*) (Figura 5.1A). Os resultados obtidos foram inesperados: metalização das partículas virais, melhoria nos rendimentos e monodispersão das nanopartículas e, adicionalmente, influencia na arquitetura das nanopartículas produzidas (Figura 5.1B e 5.1C; Figura 4.2)



**Figura- 5.1.** - Esquema da formação de nanopartículas na presença do Tobacco mosaic virus (TMV) como uma biomatriz. Os íões metálicos que interagem com os grupos carregados negativamente que se encontram na superfície do TMV, são reduzidos pela adição de um extrato de planta. O posicionamento regular de grupos ativos TMV aumenta significativamente o número de eventos de iniciação, aumentando 3 a 5 vezes o número de nanopartículas metálicas produzidas.

A capacidade de produção de nanopartículas metálicas a partir de extratos vegetais ou biomassa vegetal, está diretamente relacionada com o potencial redutor dos mesmos. As plantas quando inoculadas com um vector viral e/ou vírus sofrem alterações nos metabolitos secundários, seja em termos qualitativos ou quantitativos, o que pela sua vez, afeta as características redutoras do extrato obtido a partir delas.

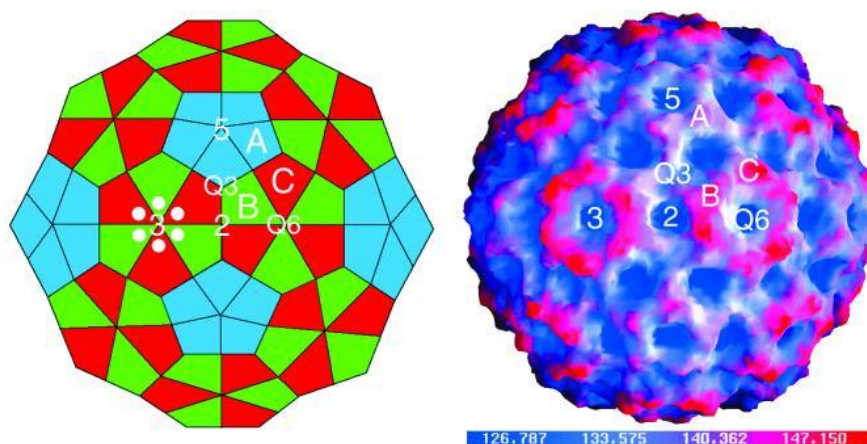
Reações de síntese de nanopartículas metálicas utilizando extratos de plantas previamente inoculadas com vectores virais ou vírus, são sistemas interessantes para avaliar a produção de nanopartículas em função de alguns indicadores como a arquitetura, e estado de agregação.

As partículas virais possuem um elevado grau de simetria apresentando formas e medidas muito semelhantes entre si. Do ponto de vista dos materiais são robustas e resistem a variações de pH e temperatura (Steinmetz, et al., 2011).

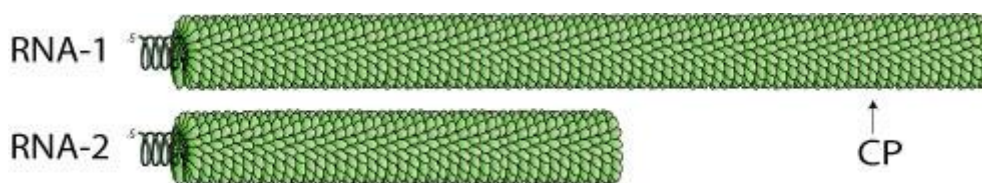
Os viriões de CMV (Fig 5.2) têm aproximadamente 29 nm de diâmetro com simetria icosaédrica T=3, sendo a cápside constituída por 12 capsómeros pentaméricos e 20 hexaméricos ([http://viralzone.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/135.html](http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/135.html)).

Os viriões de TRV (Fig. 5.3) têm forma de haste com simetria helicoidal. Cada virião é composto por dois segmentos de 180-215 e 46-115 nm de comprimento, e 22 nm de diâmetro ([http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/644.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/644.html)).

Estos viriões poderiam servir como pontos de nucleação para a formação das NPs e contribuiriam na melhoria da regularidade das formas e evitando a agregação.



**Fig. 5.2** Partículas de *Cucumber mosaic virus*.



**Fig 5.3** Partículas de *Tobacco rattle virus*-Extraído de <http://viralzone.expasy.org>

O objetivo deste Capítulo é estudar uma possível aplicação do vector pTRV2-2B e CMV na preparação de nanopartículas pelo método da *green synthesis*. Existem dois motivos que levam a explorar esta via. Por um lado, as inúmeras referências bibliográficas que apontam para a aplicação de extratos vegetais na preparação de Nps, referindo uma ligação estreita entre o poder redutor e o êxito na síntese. O aumento verificado em alguns dos metabolitos secundários nos extratos provenientes de plantas inoculadas com CMV e o vector viral pTRV2-2B, sugerem um aumento no poder redutor dos mesmos. Por outro lado, a presença das partículas virais (CMV e TRV) e proteína a ser expressa (2B) poderiam influenciar de modo positivo o processo, atendendo aos efeitos referidos na bibliografia. A presença de cápsides virais e proteína expressa nos extratos, oferece também estruturas disponíveis como suporte de fenómenos de nucleação, que contribuiriam para a homogeneização das formas e redução da agregação, que é um dos maiores problemas que se coloca na síntese química.

## 5.2 Materiais e Métodos

### 5.2.1 Preparação do material vegetal para obtenção de extratos.

Para a realização dos ensaios utilizaram-se quarenta plantas de *N. benthamiana*. As plantas foram mantidas em fitoclima com condições controladas. Após 1 mês, vinte destas plântulas foram inoculadas mecanicamente com CMV segundo metodologia indicada no Capítulo 2 secção (2.2.8) e outras dez com o vector de expressão pTRV2-2B conforme descrito no Capítulo 4 secção (4.2.2). Quando as plantas inoculadas com CMV apresentavam sintomas visíveis de infeção, dez dessas plantas foram inoculadas com o vector de expressão pTRV2-2B, resultando em plantas infetadas com CMV que expressavam proteína supressora 2B devido a CMV e a TRV2-2B.

### 5.2.2 Obtenção dos diferentes extratos de *N. benthamiana*

Os extratos foram preparados triturando 10 g de folhas com 50 ml de solvente constituído por etanol: água (50:50). A solução extrativa foi submetida a agitação em banho a 60°C durante 30 min. Posteriormente a solução foi filtrada através de um filtro de 0,45 µm Millex® polyvinylidene; EMD Millipore, e centrifugada a 13.000g durante 15 minutos. O sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

### **5.2.3 Síntese de nanopartículas de prata**

O nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) *ReagentPlus*®,  $\geq 99.0\%$ , referência S6506, foi adquirido à. Todos os ensaios foram feitos em triplicado.

Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 30 minutos. Os sedimentos obtidos foram lavados com 1 ml de água bidestilada três vezes, recuperados por centrifugação e secados em vácuo.

### **5.2.4 Análise da prata em solução por Espectroscopia de Absorção atômica**

A fração líquida remanescente após recuperação dos precipitados foi analisada por absorção atômica. Para tal foram preparadas diluições convenientes em função da curva de calibração efetuada.

Para a curva de calibração foram preparados padrões com concentrações de 0.25, 0.5, 1, 2.5 e 5 mg/l utilizando uma solução calibrada comercial de nitrato de prata (Sigma-Aldrich). O equipamento utilizado foi um espectrofotómetro de Absorção Atômica de chama novAA® 350 (Analytik Jena AG).

### **5.2.5 Monitorização da formação de NPs de prata por UV-Vis**

O espectro de absorção das amostras foi registrado entre 300 e 800 nm com um espectrofotómetro (Hitachi ModeloU-2800). A monitorização da síntese foi feita ao longo do tempo sendo registrados 4 tempos correspondentes a 4,8,16 e 24 horas após início da reação. O branco utilizado foi água desionizada. O controlo negativo foi feito a partir da adição de água/etanol à solução de prata.

### **5.2.6 Caracterização das nanopartículas obtidas por Difração de RX (DRX) e Microscopia de Transmissão Eletrónica (TEM)**

A caracterização das partículas por Difração de RX (DRX) e Microscopia de Transmissão Eletrónica (TEM) foi realizada no Instituto Superior Técnico da

Universidade de Lisboa (IST). A preparação das amostras para estas análises esteve a cargo do pessoal técnico do IST,

### **5.2.7 Determinação do tamanho médio das NPs a partir das imagens TEM**

A determinação do tamanho das NPs foi feita recorrendo ao programa Image J. A partir de uma imagem TEM seleccionavam-se 30 NPs em que era calculada a dimensão média das mesmas.

### **5.2.8 Determinação de cloretos**

Para a determinação dos cloretos foi utilizado o kit LCK 311 da Hach Lange, baseado no método do Ferro(III)/Tiocianato, com uma gama de concentrações entre 1-1000 mg/l.

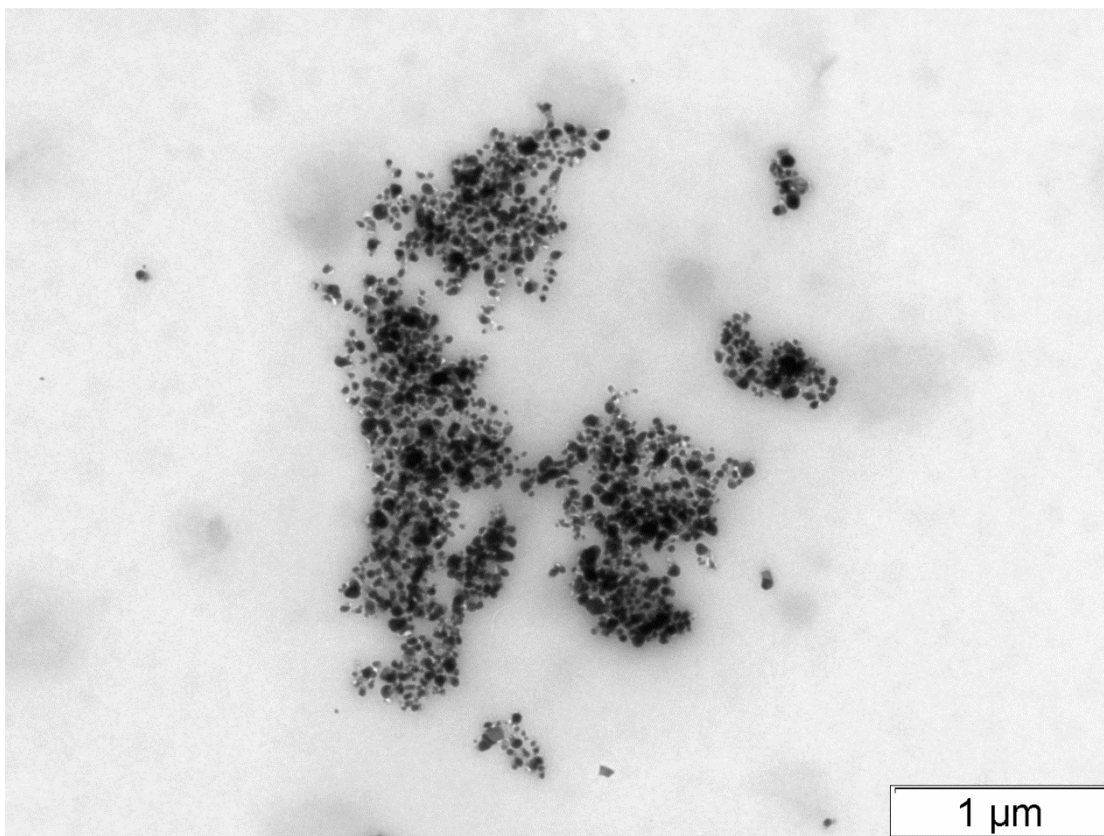
## **5.3 Resultados**

### **5.3.1 Caracterização por Microscopio electrónico de transmissão (TEM)**

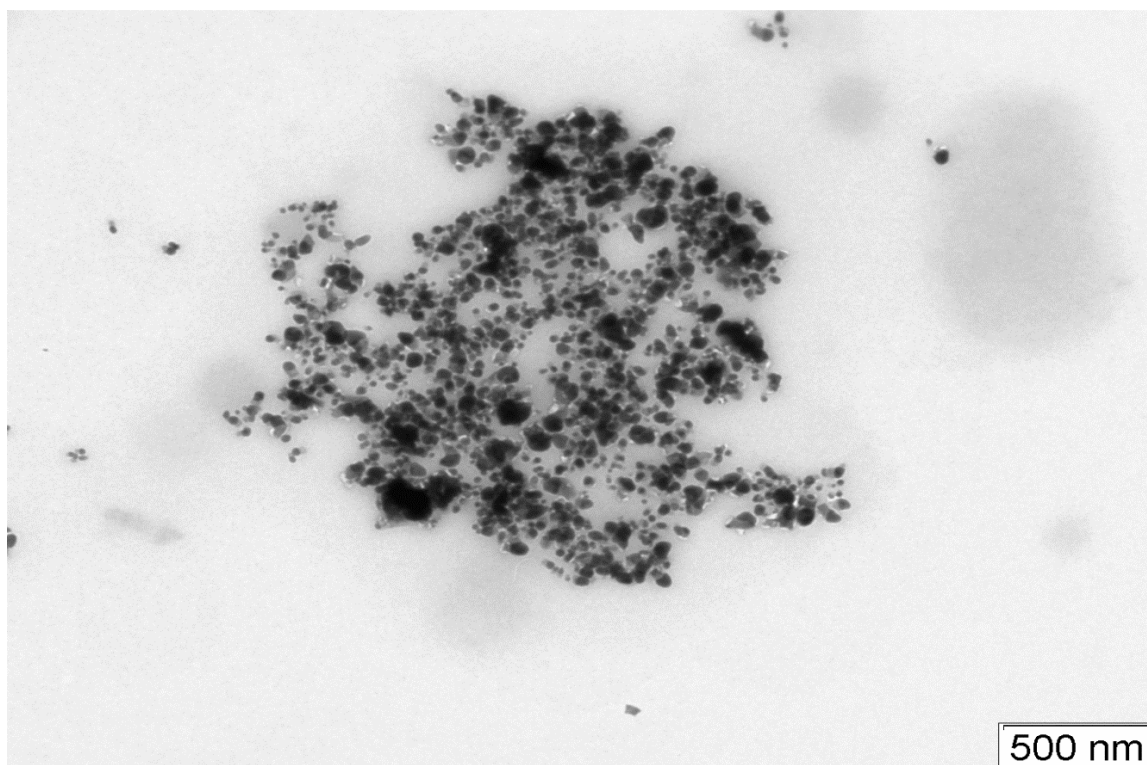
As figuras que se seguem foram obtidas por Microscopia Electrónica de Transmissão.

#### **5.3.1.1 Imagens com escala 1 $\mu$ m e 500 nm**

As Figs. 5.4 e 5.5 são imagens obtidas por Microscopia de transmissão electrónica das NPs sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* wt.

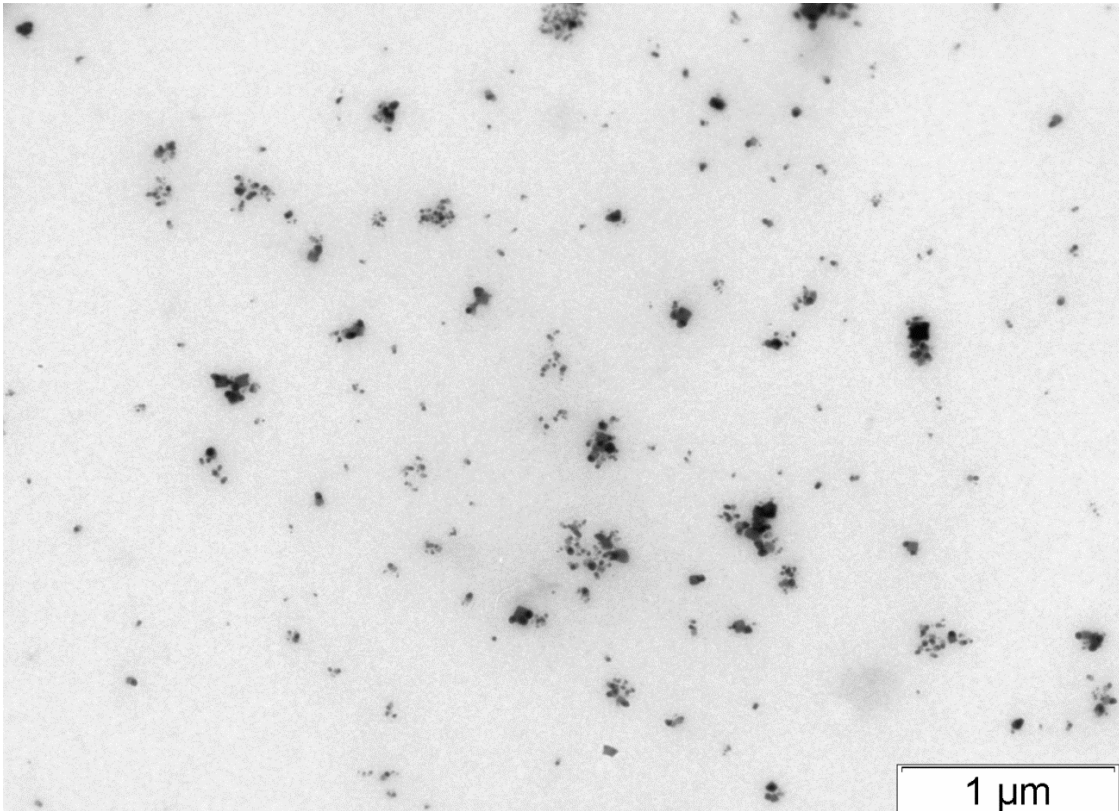


**Fig. 5.4** Micrografia das Nps obtidas a partir de extratos de *N. benthamiana* não inoculadas

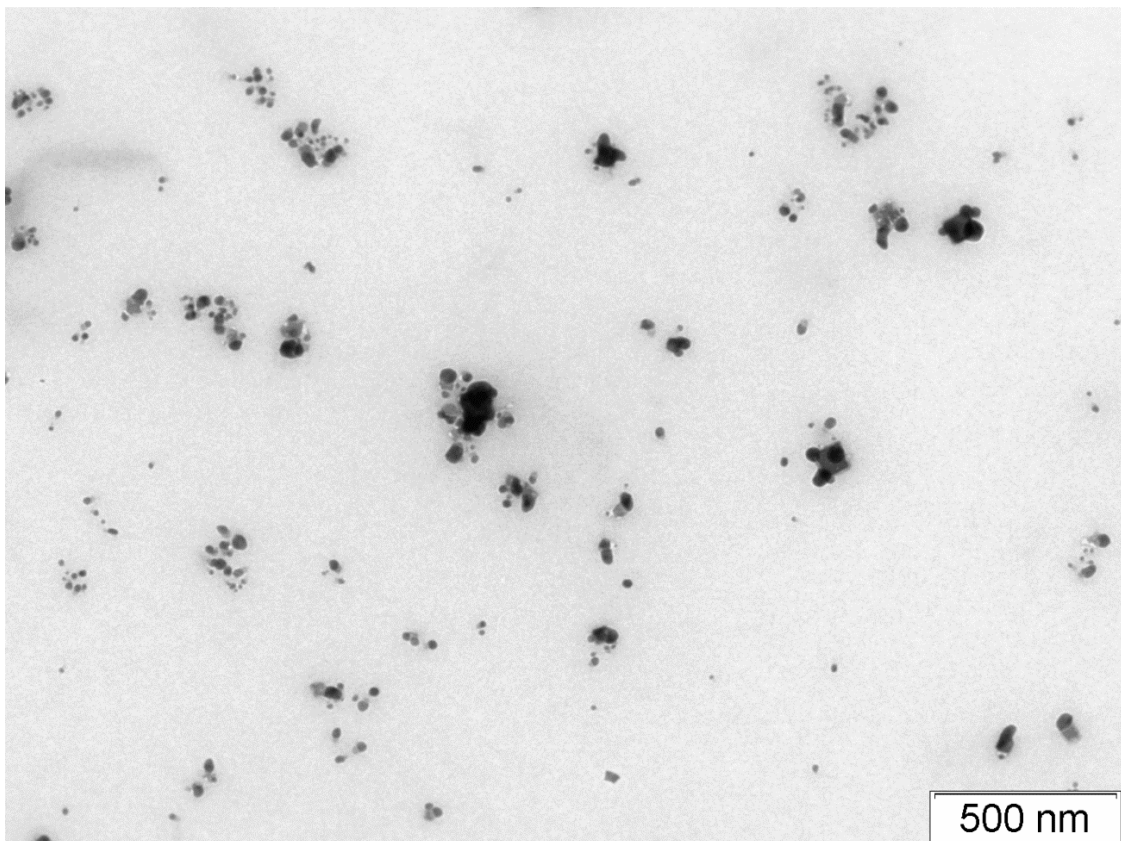


**Fig. 5.5** Micrografia das Nps obtidas a partir de extratos de *N. benthamiana* não inoculadas

As Figs. 5.6 e 5.7 são imagens obtidas por Microscopia de transmissão electrónica, das NPs sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* infetadas com CMV.

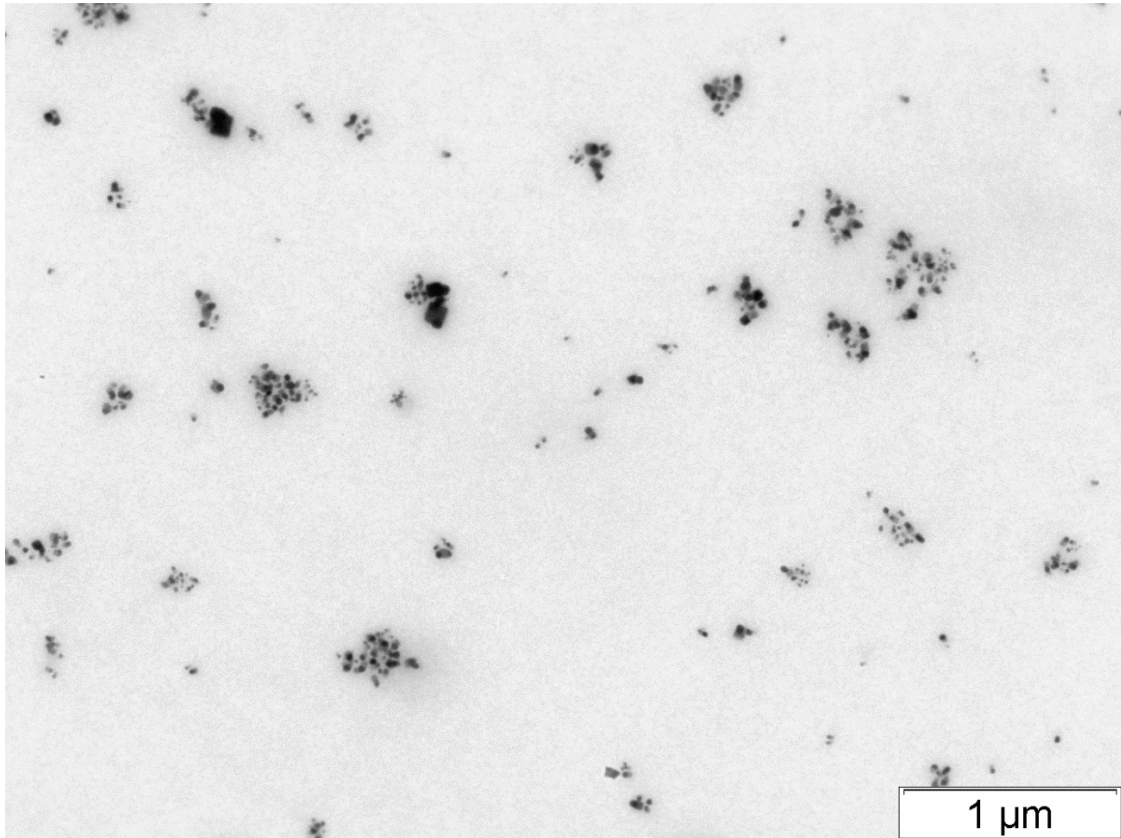


**Fig. 5.6** Micrografia das Nps obtidas a partir de extratos de *N. benthamiana* infectadas com CMV

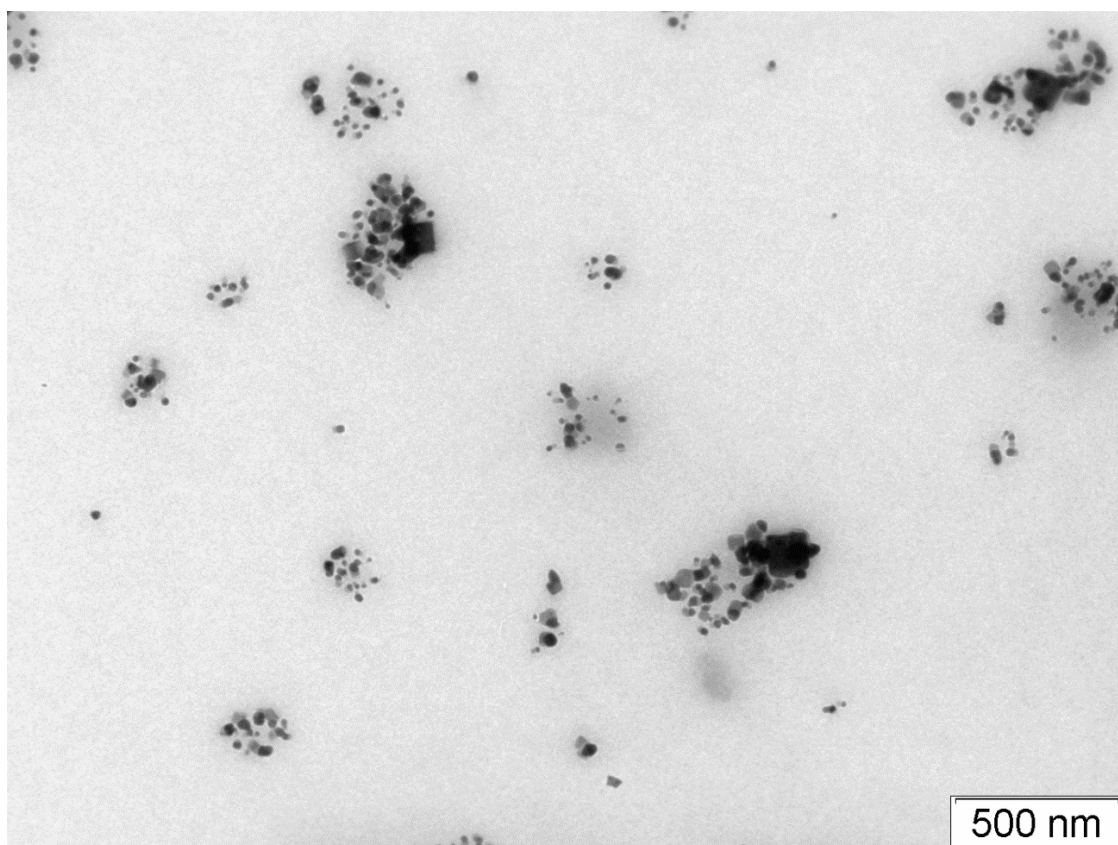


**Fig. 5.7** Micrografia das Nps obtidas a partir de extratos de *N. benthamiana* infectadas com CMV

As Figs. 5.8 e 5.9 são imagens obtidas por Microscopia de transmissão electrónica, das NPs sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* expressando a proteína 2B.

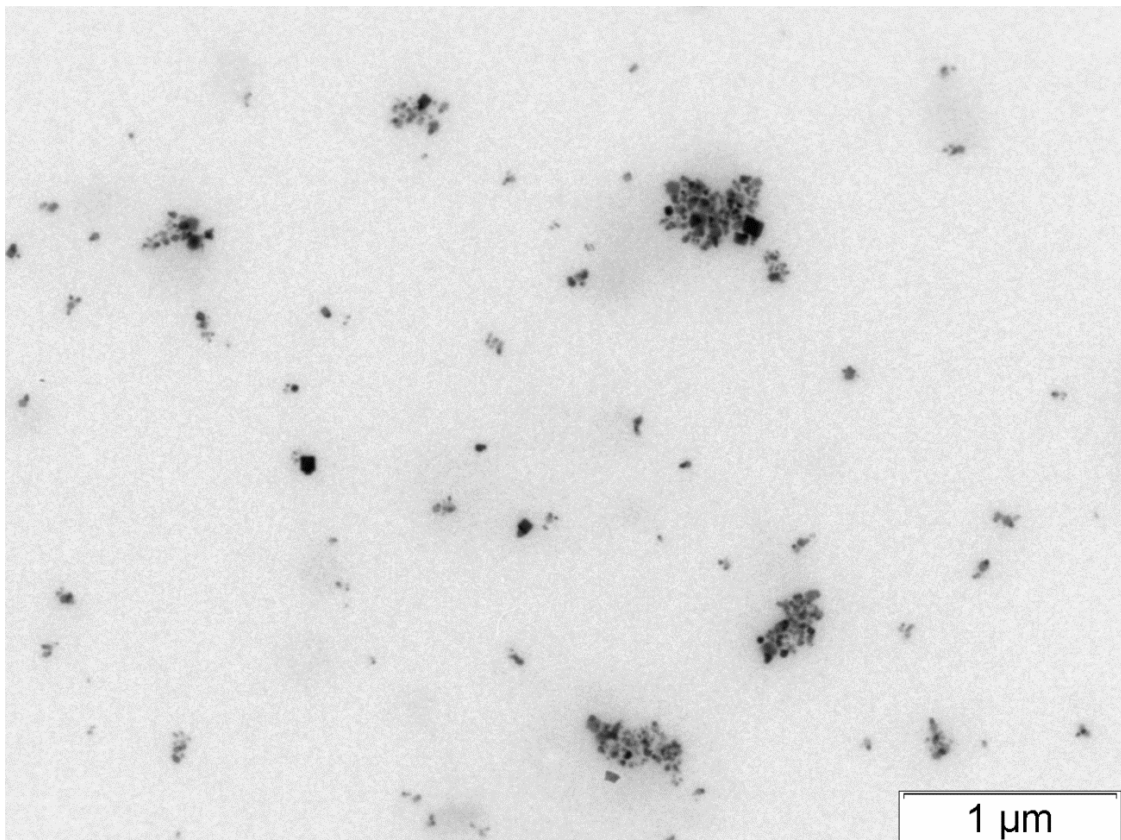


**Fig 5.8** Imagem de partículas obtidas por TEM sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* expressando a proteína 2B

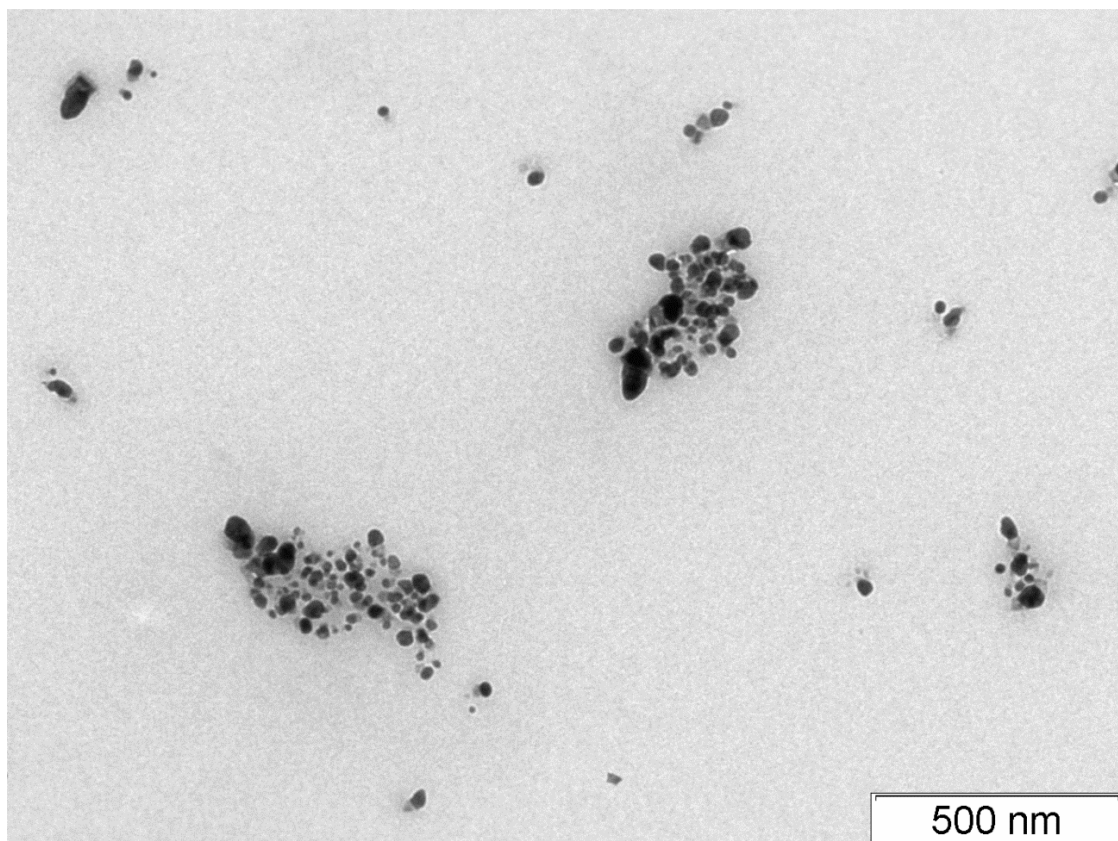


**Fig 5.9** Imagem de partículas obtidas por TEM sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* expressando a proteína 2B

As Figs. 5.10 e 5.11 são imagens obtidas por Microscopia de transmissão electrónica, das NPs sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* expressando a proteína 2B e inoculadas com CMV.



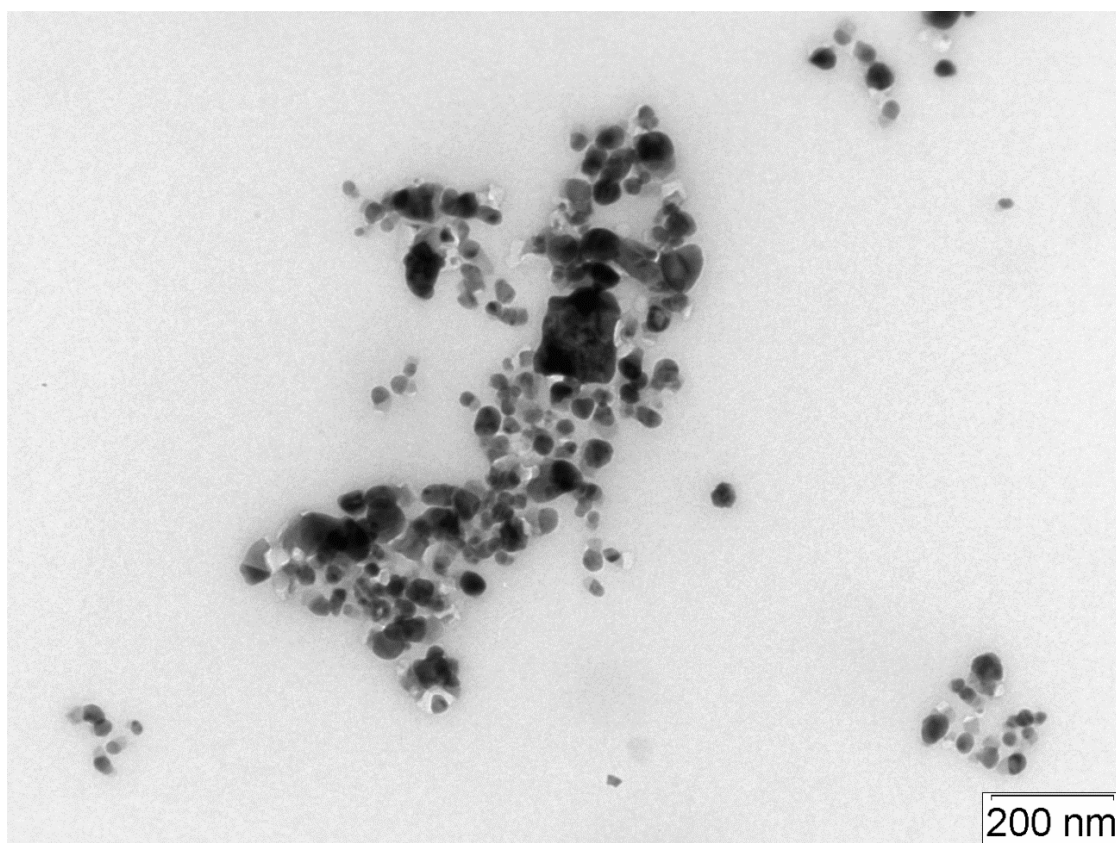
**Fig 5.10** Imagem de partículas obtidas por TEM sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* inoculadas com o vector pTRV-2B e inoculadas com CMV



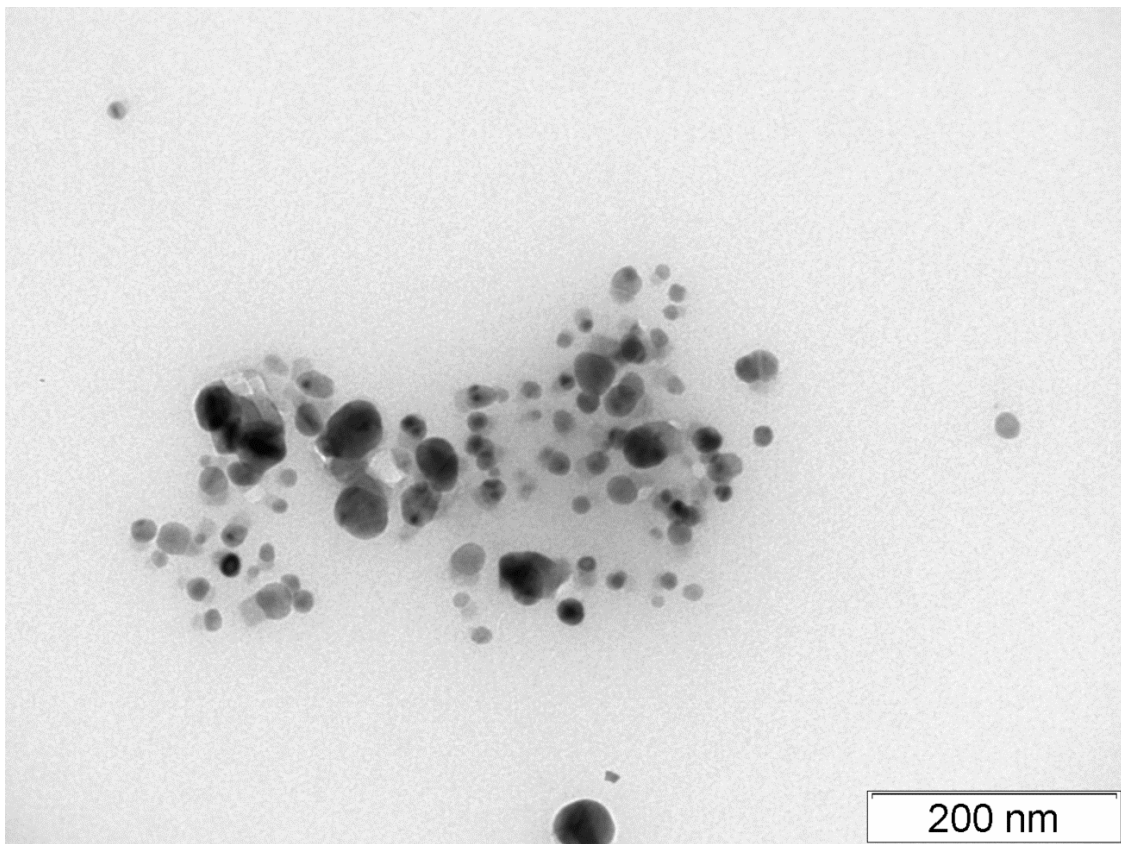
**Fig 5.11** Imagem de partículas obtidas por TEM sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* inoculadas com o vector pTRV-2B e inoculadas com CMV

A comparação entre as imagens 5.4 a 5.11 mostra de modo evidente a maior aglomeração existente nas Nps obtidas a partir de *N. benthamiana* não inoculadas, quando comparadas com as obtidas a partir de extratos de *N. benthamiana* infetados com CMV ou inoculados com o vector pTRV-2B.

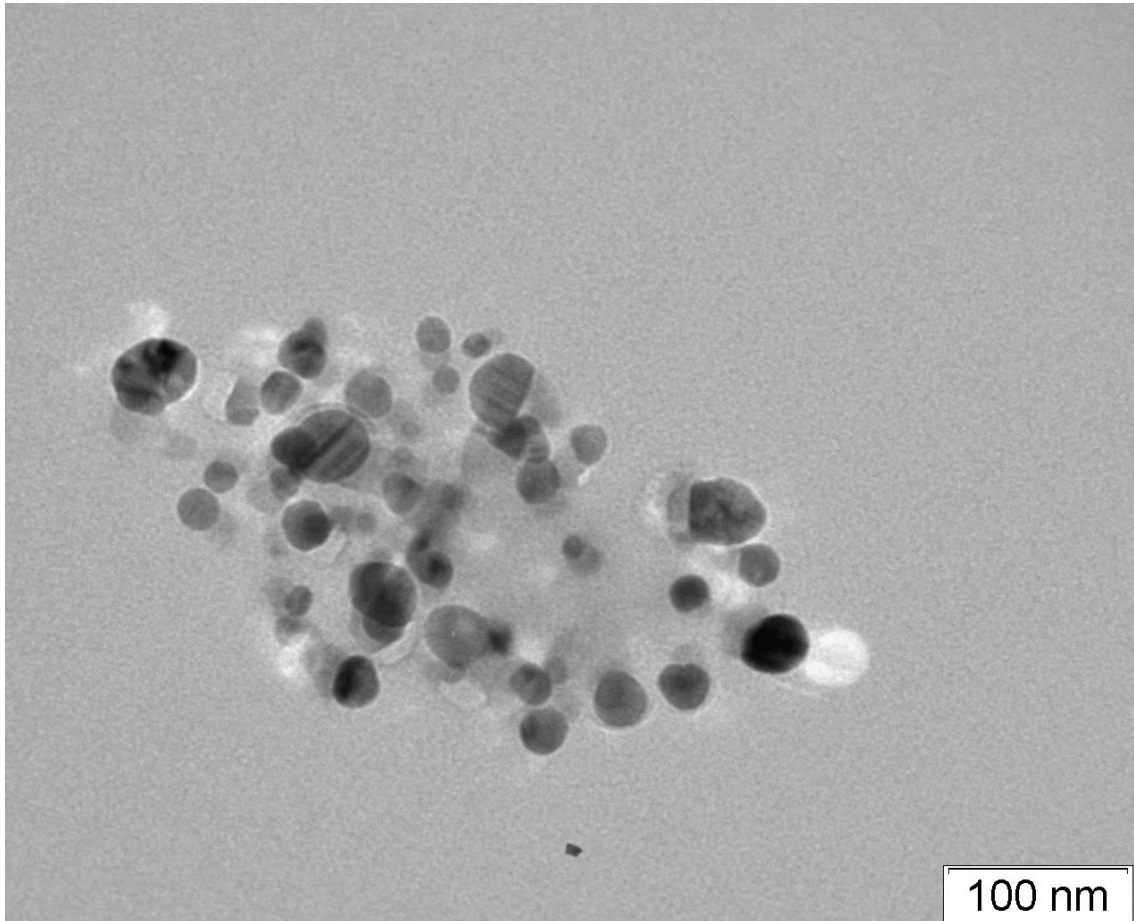
### 5.3.1.2 Imagens com Escala 100-200 nm



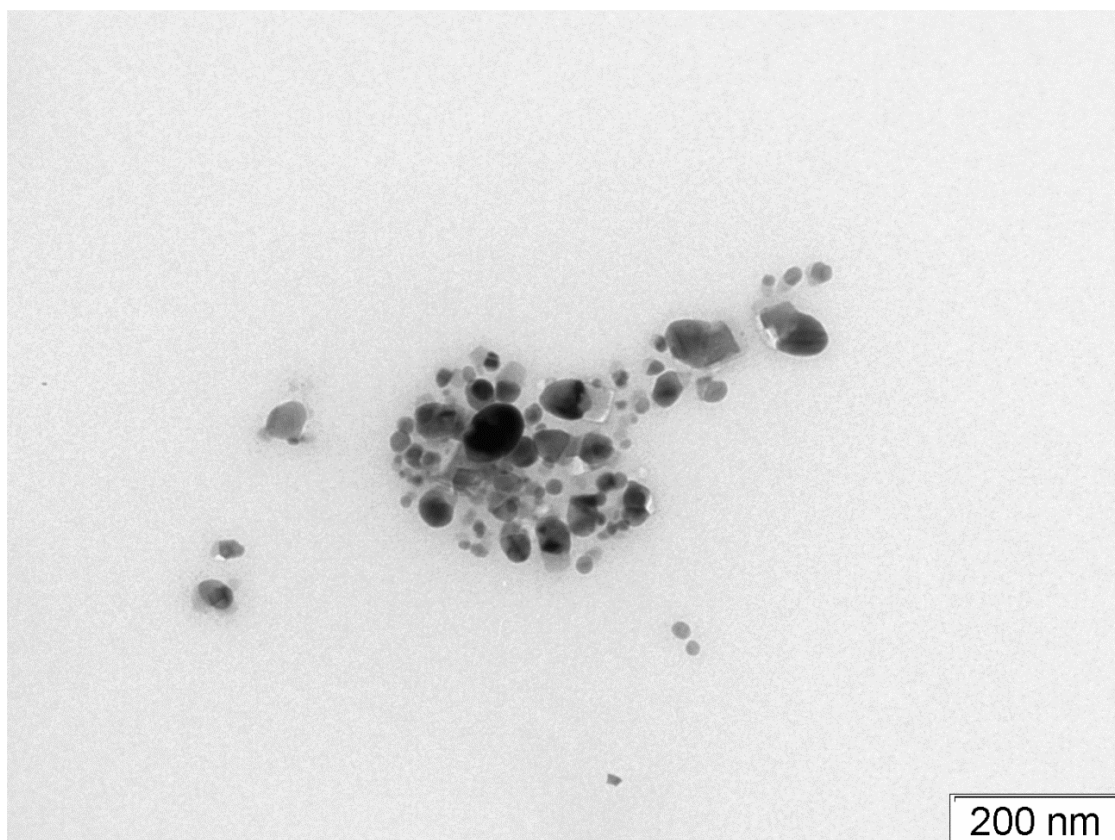
**Fig 5.12** Imagem de partículas obtidas por TEM sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* não inoculadas



**Fig 5.13** Imagem de partículas obtidas por TEM sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* infetadas com CMV



**Fig 5.14** Imagem de partículas obtidas por TEM sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* expressando a proteína 2B

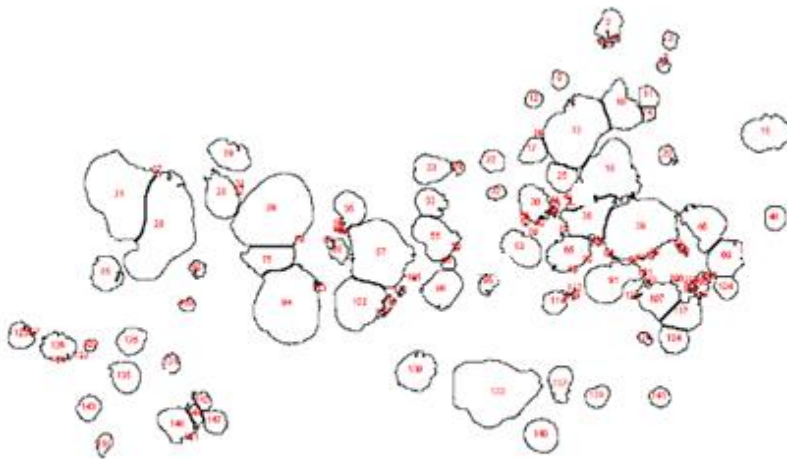


**Fig 5.15** Imagem de partículas obtidas por TEM sintetizadas a partir de extratos provenientes de *N. benthamiana* expressando a proteína 2B e inoculadas com CMV

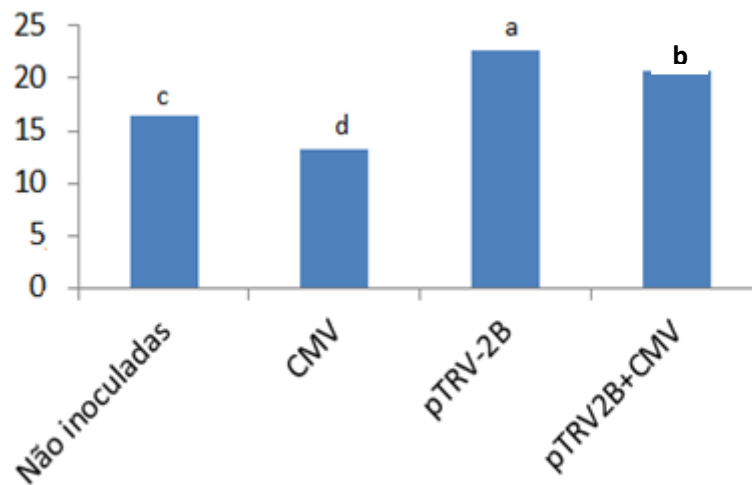
A imagem 5.12 mostra alguns eventos de agregação que parecem ser mais relevantes nas NPs obtidas a partir de *N. benthamiana* sem inoculação, no entanto também podem ser encontrados agregados nas outras modalidades.

### 5.3.2 A dimensão das NPs

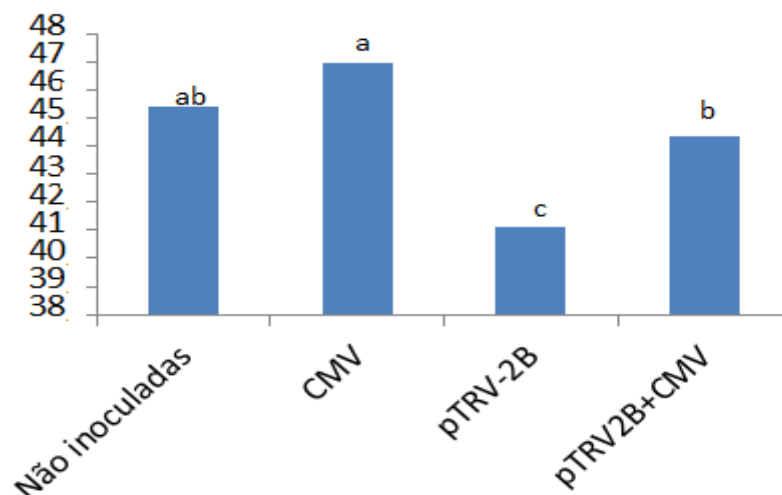
Para a determinação da dimensão das NPs, a partir das imagens TEM, utilizou-se o programa Image J. As NPs eram selecionadas por grupos de tamanho semelhante, para os quais era calculado o tamanho médio. Na figura 5.4 mostra-se uma das imagens geradas utilizando o Programa Imagem J. Neste caso corresponde às NPs preparadas por *green synthesis* utilizando plantas de *N. benthamiana* inoculadas com pTRV-2B.



**Figura 5.16** Imagem TEM com seleção individual de NPs no programa Image J. Esta imagem corresponde as Nps provenientes da *green synthesis* utilizando extrato de plantas de *N. benthamiana* inoculada com pTRV-2B.



**Fig. 5.17** Comparação do tamanho médio das NPs de menores dimensões obtidas por *green synthesis* a partir dos diversos extratos. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes ( $p < 0.05$ , Duncan's test)



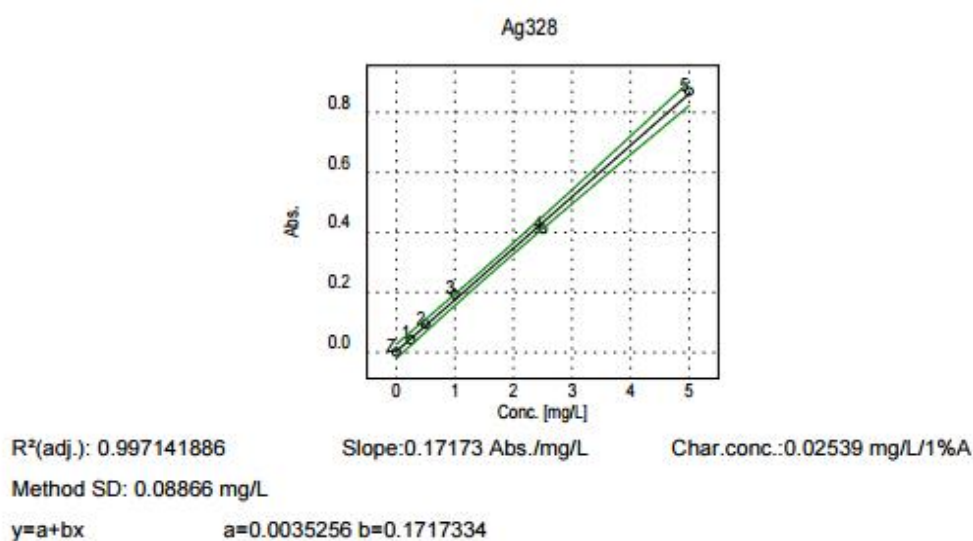
**Fig. 5.18** Comparação do tamanho médio das Nps de maiores dimensões, obtidas por *green synthesis* a partir dos diversos extratos. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes ( $p < 0.05$ , Duncan's test)

Da observação das micrografias parece obvio a existência de duas classes de tamanho de NPs. Assim, para cada modalidade consideraram-se as NPs de maior e menor dimensão, e determinou-se a média em cada classe. Se observaram diferenças significativas entre elas, sendo as NPs mais pequenas e as maiores atribuídas as amostras provenientes de plantas infetadas com o CMV.

### 5.3.3 Resultado da Quantificação dos iões de prata em solução após a formação de nanopartículas, nos extratos de *Nicotiana benthamiana*

Quando os extratos de nicotiana obtidos a partir das diversas fontes, plantas inoculadas com pTRV2-2B, plantas inoculadas com o vírus CMV, plantas inoculadas com o vírus CMV e pTRV2-2B e plantas controlo, foram adicionados à solução de prata, evidenciou-se de imediato a formação de um precipitado.

Após a recolha do material precipitado por centrifugação a 12.000 x g durante 30 minutos, o sobrenadante foi avaliado para quantificar a presença de prata livre em solução. Para a quantificação foram utilizadas soluções padrão a partir das quais o equipamento calculava a reta de calibração (Figura 5.19)



**Figura 5.19** - Retas de calibração do Nitrato de prata obtido por Espectrofotometria de Absorção Atômica

As 4 modalidades apresentaram taxas de remoção de prata superior a 97% (Tabela 5.2). Não existindo diferenças significativas entre elas, sendo no entanto o valor mais elevado atribuído aos extratos provenientes de plantas infetadas com CMV.

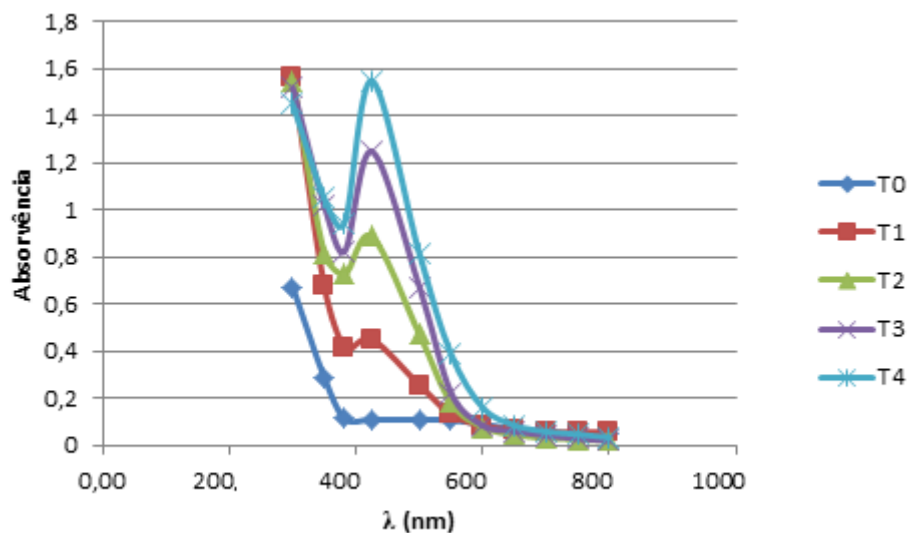
**Tabela 5.1-** Concentração de prata livre em solução obtida por Absorção Atômica  
 Percentagem de remoção de íões prata medida 24 horas após a adição dos extratos

Amostras	mg/L	% de Ag em solução	Percentagem de remoção
<b>Solução de Ag</b>	10,4500	100,00	0
<b>CMV 2B – 1</b>	0,2303	2,20	97,80
<b>CMV 2B – 2</b>	0,2210	2,11	97,89
<b>CMV 2B – 3</b>	0,2225	2,13	97,87
<b>Planta não inoculada.1</b>	0,2404	2,30	97,70
<b>Planta não inoculada- 2</b>	0,2694	2,58	97,42
<b>Planta não inoculada -3</b>	0,2821	2,70	97,30

CMV – 1	0,1523	1,46	98,54
CMV – 2	0,1938	1,85	98,15
CMV – 3	0,1533	1,47	98,53
2B – 1	0,3666	3,51	96,49
2B – 2	0,2315	2,22	97,78
2B – 3	0,2347	2,25	97,75

### 5.3.4 Monitorização da síntese por UV-Vis

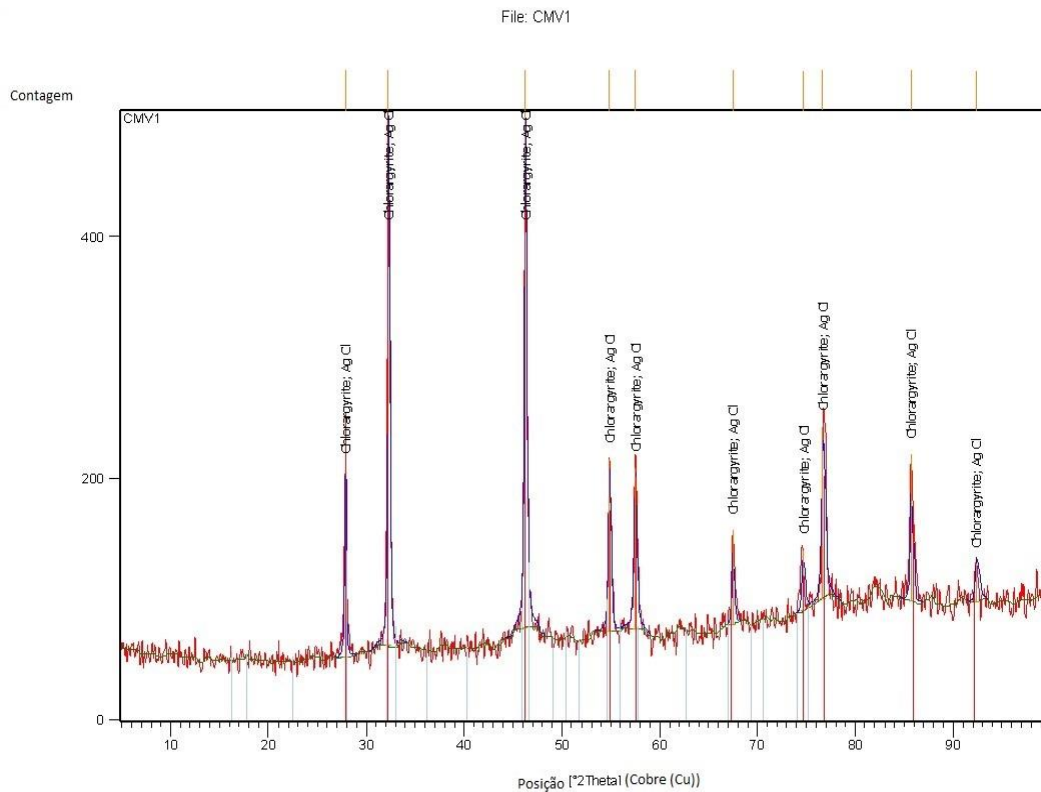
A progressão da síntese de nanopartículas por espectroscopia UV-Vis, no intervalo 350-750 nm, revelou um pico de absorvância aos 420 nm, que aumentava em intensidade com o tempo. O perfil foi semelhante para as diferentes amostras, pelo que se apresenta só uma delas (Fig. 5.20).



**Fig. 5.20** Espectro característico para uma reação de síntese de NPs de prata utilizando extrato de *Nicotiana benthamiana* wt. T1, T2, T3 e T4 correspondem respectivamente a 4, 8, 16 e 24 horas do início da reação de síntese. A absorvância foi monitorizada entre os 300 e 800 nm. As reações de síntese utilizando os diversos extratos apresentaram todas um espectro semelhante ao das NPs obtidas de plantas wt (Fig 5.4), evidenciando-



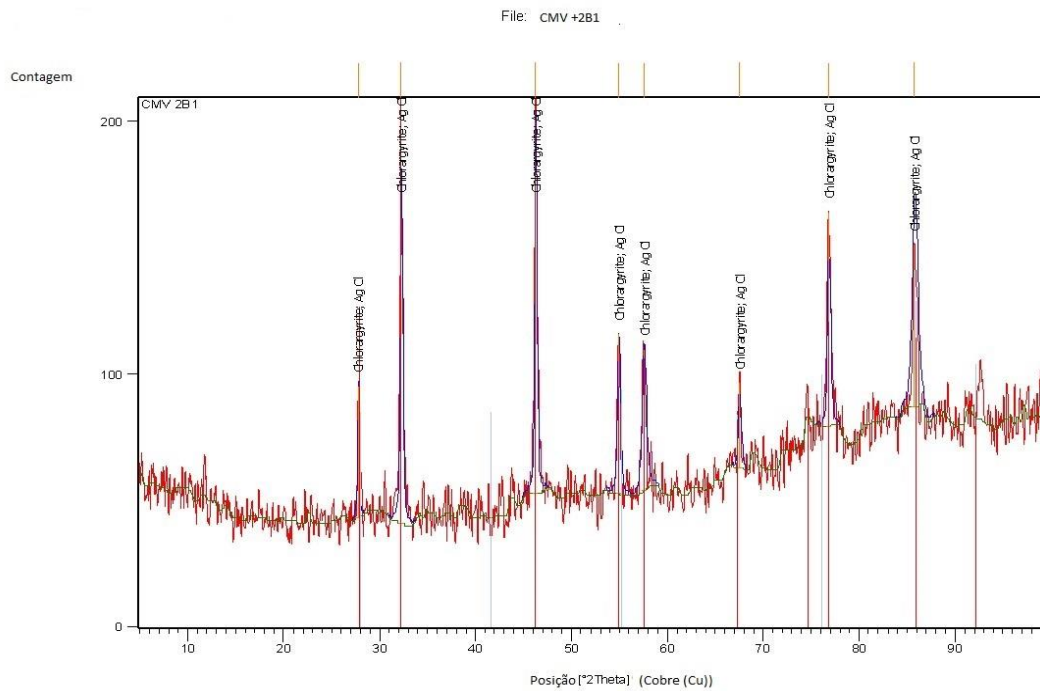




**Fig. 5.23** Difractograma das NPs provenientes de extratos de plantas de *N. benthamiana* infetadas com CMV.

#### 5.3.5.1.d Amostra de NPs provenientes de *N. benthamiana* infetadas com CMV e inoculadas com pTRV-2B

A fig. 5.24 mostra a identificação das NPs provenientes de extratos de plantas de *N. benthamiana* expressando a proteína 2B e inoculadas com CMV. As NPs foram identificadas como clorargirita (ICDDPDF2# 00-001-1013), fórmula química Ag Cl.



**Fig. 5.24 Difratograma** das NPs provenientes de extratos de plantas de *N. benthamiana* expressando a proteína 2B e infetadas com CMV

A caracterização das NPs foi realizada por comparação dos Difratograma obtidos para as diferentes amostras com os Difratogramas de padrões existentes na base de dados ICDD (International Centre for Diffraction Data). Todas as NPs revelaram ser clorargirita.

## 5.4 Discussão

A síntese de nanopartículas de prata é de grande interesse para a comunidade científica devido à sua ampla gama de aplicações. Diferentes agentes redutores orgânicos e inorgânicos, tais como boro-hidreto de sódio, citrato de sódio, ascorbato, hidrogênio elementar, *N,N*-dimetilformamida (DMF) e polietileno-glicol são utilizados para a redução de íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ), em soluções aquosas ou não aquosas (Tran et al., 2013). No processo de síntese verde a redução e estabilização de íons prata é levada a cabo por combinação de biomoléculas tais como proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, alcaloides, taninos, saponinas, terpenoides e vitaminas, presentes nos extratos de plantas.

No presente estudo foram obtidas NPs de clorargirita de elevada pureza, a partir de utilização de um sal de prata e de diferentes extratos de *N. benthamiana*. As alterações visuais observadas nas amostras quando adicionado o extrato vegetal, foram um indicio da formação de NPs de prata cujas superfícies plasmônicas excitadas por efeito da luz, absorvem a luz visível e alteram a cor (Rodrigues Leon et al., 2013). A solução inicial de cor amarelo claro tornou-se castanha após 48 horas. Posteriormente, foi possível confirmar a síntese de NPs por monitorização da reação utilizando análise espectrométrica UV-Vis (Fig. 5.20). As NPs contendo prata têm um pico de absorvância característico a 420 nm (Vigneshwaram et al, 2006), o que foi corroborado no presente estudo, assim como o aumento progressivo da absorvância ao longo do tempo.

Tanto nos extratos de *N. benthamiana* sem inoculação, como naqueles obtidos a partir de plantas infetadas com CMV ou de plantas inoculadas com o vetor pTRV2B, o processo de sínteses de NPs conduziu à remoção de mais do 97% da prata em solução (Tabela 5.1).

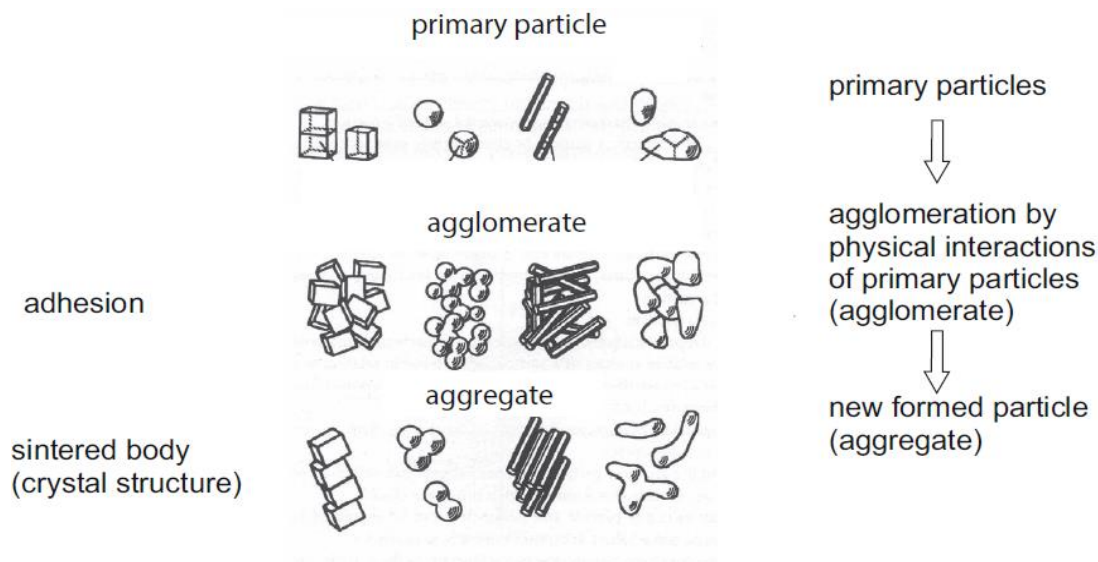
Existe uma vasta bibliografia que reporta a produção de NPs a partir de extratos vegetais. Os diversos autores ( Paz Elia et al., 2013; Nadagouda et al.,2009 ; Hoag et al., 2009 ) atribuem aos compostos bioativos e polifenóis presentes nos extratos, uma participação como agentes redutores e como agentes estabilizantes de NPs. Estes autores sugerem que os mecanismos moleculares envolvidos nas propriedades antioxidantes devem promover a redução de íons metálicos presentes.

O aumento registado em alguns metabolitos secundários em plantas de *N. benthamiana* infetadas por CMV ou a expressar a proteína supressora viral 2B, faria prever uma melhor performance na formação de NPs originadas por estes extratos, dada a maior concentração em alcaloides e flavonoides detetados neles. Contudo não se encontraram

diferenças significativas na percentagem de remoção de prata em solução entre as diferentes amostras.

A partir das imagens TEM foi evidente a existência de duas classes de Nps, maiores e menores, para todos os casos estudados. O tamanho das NPs obtidas a partir dos diferentes extratos, oscilou entre 46,9 e 13,7 nm confirmando a sua classificação como nanopartículas (Figs. 5.17 e 5.18). Todas as Nps apresentaram tamanhos significativamente diferentes, as Nps com maior dispersão de tamanho correspondem às obtidas a partir de extratos preparados utilizando plantas infetadas com CMV. Em tanto que, as Nps com uma menor dispersão nas suas dimensões, foram as obtidas a partir de extratos inoculados com pTRV-2B.

Na bibliografia faz-se referência à procura de processos de obtenção de NPs (partículas primárias), conducentes à redução da formação de agregados e aglomerados, sendo que muitas das vezes estes termos não estão bem esclarecidos ou são utilizados de maneira incorreta. As partículas primárias, são estruturas cristalinas que adquirem distintas formas geométricas (Walter, 2013). Os aglomerados são um conjunto de partículas primárias e / ou agregados cuja área total não difere apreciavelmente da soma das áreas das partículas primárias (Walter, 2013). Os aglomerados não são unidades fixas, podem mudar seu tamanho e forma quando se alteram as condições do meio circundante, e se originam devido à adesão das partículas pela interação de forças físicas débeis (Walter, 2013). Os agregados são um conjunto de partículas primárias que têm crescido em conjunto e estão alinhadas lado a lado; a área total é menor do que a soma das áreas das partículas primárias (Walter, 2013). Se bem que a geometria original das partículas primárias é ainda visível no agregado, elas se encontram firmemente fusionadas (Walter, 2013). Na Figura 5.25 mostra-se a diferença entre estes conceitos.



**Fig. 5.25** Relação entre partículas primárias, agregados e aglomerados (Extraído de Walter, 2013)

Uma das principais dificuldades na realização de síntese de nanopartículas metálicas é a obtenção de suspensões coloidais estáveis, já que as nanopartículas metálicas possuem uma alta energia superficial, favorecendo termodinamicamente a imediata agregação destas para a formação de ligações metal-metal (Klabunde, 2001).

De modo a evitar a agregação, as nanopartículas devem ser estabilizadas. Na estabilização esteérica, as NPs são revestidas superficialmente com uma camada de polímero, proteína ou dendrímero, criando-se uma barreira mecânica que impede a aproximação entre elas (Epamino, 2012). Na estabilização eletrostática utiliza-se um composto com carga (positiva ou negativa) que geralmente fica adsorvido sobre a superfície das nanopartículas, conferindo-lhes, portanto, potencial eletrostático (Epamino, 2012). Essa carga impede que as nanopartículas se aproximem o suficiente para que o processo de agregação se inicie (Epamino, 2012).

As imagens da TEM revelaram que as NPs sintetizadas a partir do extrato de *N. benthamiana* sem inoculação (Figs. 5.4 e 5.5) apresentavam uma maior aglomeração quando comparadas com as NPs provenientes de extratos obtidos de plantas infetadas com CMV (Figs. 5.6 e 5.7) ou inoculadas com o vector pTRV-2B (Figs. 5.8 e 5.9 ) ou com pTRV-2B e CMV (5.10 e 5.11).

Parece também existir um maior grau de agregação nas Nps obtidas a partir de extratos de *N. benthamiana* sem inoculação (Fig.5.12), quando comparadas com as obtidas de plantas infetadas com CMV (Fig.5.13) ou inoculadas com o vector pTRV-2b (5.14). No

entanto, estas diferenças não são tão evidentes como no caso da aglomeração, sendo possível encontrar agregados nas imagens de todas as Nps. A presença de CMV, de TRV e da proteína supressora 2B aparentemente exerce alguma influência no estado de aglomeração e agregação das NPs. Na patente WO 2014045055 A1 (Love et al., 2014) os autores assumem que as estruturas virais atuam como armação estrutural na síntese, sendo assim obtidas partículas mais regulares, simétricas e com agregação reduzida. A agregação é um fenómeno ainda complexo mas comum na produção de nanopartículas, que torna especialmente difícil explorar as propriedades e aplicações dos materiais nano-estruturados ( Li e Kaner, 2005). A agregação é atribuída à atracção mútua entre partículas através de forças de Van der Waals ou ligação química ( Li e Kaner, 2005).

Alem dos virus, existem também evidencias de outras moléculas biológicas com estrutura e composição bem definidas, como por exemplo proteínas (Reches et al., 2003; Scheibel et al., 2003) e DNA (Braun et al., 1998), que são utilizadas como moldes para a nucleação de estruturas de nanoescala. É bem conhecido que as proteínas se ligam as NPs de prata através dos grupos amina livres nelas existentes ou resíduos de cisteínas (Gole et al., 2001) e, portanto, a estabilização das NPs de prata por proteínas ligadas à superfície é uma possibilidade.

A análise cristalográfica por DRX confirmou que a caracterização das NPs presentes em todas as amostras corresponde a cristais de clorargirita (Figs. 5.21 a 5.24). A clorargirita ou cloreto de prata, de fórmula  $\text{AgCl}$ , é uma das principais fontes desse elemento (75,3%). Cristaliza no sistema cúbico na Classe Hexoctaédrica (com 48 fases). Trata-se de um sólido cristalino conhecido pela sua baixa solubilidade em água, que quando sujeito à luz ou calor, se separa em prata e cloreto. A clorargirita forma-se no topo das veias do minério de prata que tenham sido submetidas a intempérie, devido ao fenómeno que se dá quando certos metais são lixiviados para fora de minerais levemente solúveis por fluidos hidrotermais. Estes metais são então depositados como um mineral diferente em bolsas concentradas. Estas bolsas são geralmente mais rica em metais de minério de que o material original, assim, o processo é adequadamente denominado um enriquecimento (<http://www.geol-amu.org/notes/b3-3-7.htm>; <http://www.galleries.com/Chlorargyrite>).

Para esclarecer a possível origem dos iões cloreto, foi feita a quantificação de cloretos nos extratos. A quantificação de cloretos em todos os extratos utilizados deu valores máximos de 32 mg/L. Os iões  $\text{Cl}^-$  disponíveis nos 5 ml de extrato aplicados nas reacções de síntese, correspondiam a 0,16 mg e os iões  $\text{Ag}^+$  presentes, correspondiam a 4,32 mg.

Estes valores indicam um excesso de iões  $\text{Ag}^+$  em relação aos iões  $\text{Cl}^-$ , pelo que presumivelmente a fonte de cloretos esteja em alguma reação que envolva a libertação de cloretos a partir de compostos que façam parte dos extratos vegetais.

As descargas de prata para o ambiente são uma realidade preocupante provocada pela elevada utilização deste metal em diversas indústrias, pelo que a presença de prata em cursos de água, sedimentos e organismos aquáticos tem originado diversos problemas de contaminação (Nakamoto et al., 1992).

Os métodos de remoção são de interesse para reduzir a presença deste metal no meio ambiente. A precipitação de mais de 97 % da prata em solução utilizando extratos vegetais, como provado no presente estudo, mostra um possível caminho para remoção por precipitação da prata existente em meios líquidos provenientes de diversas atividades industriais.

Se bem em todos os casos as NPs revelaram remover mais de 97 % da prata em solução, as Nps obtidas de extratos provenientes de plantas inoculadas com pTRV-2B ou infetadas com CMV, parecem produzir menos aglomerados e possuir um estado de agregação menor, que é uma característica muito importante para a preservação da funcionalidade das mesmas.

Uma vez que se tenta encontrar uma aplicação para pTRV2-2B está é uma outra possibilidade que pode ser explorada e melhorada. A metodologia de obtenção destas NPs não envolve processos custosos para a sua obtenção. Esta capacidade dos extratos, será um fator de índole económico a considerar, quando se tentar implementar este sistema para a remoção de prata e de estudar a viabilidade da sua utilização.

## Capítulo 6 – Conclusões

Os supressores virais são proteínas que têm evoluído no sentido de reverter a maquinaria de silenciamento em plantas. O supressor 2B de CMV inibe o silenciamento principalmente pelo sequestro de pequenos dsRNAs (Goto et al., 2007; Gonzalez et al., 2010) e atua também interagindo e inibindo com as proteínas argonauta AGO1 e AGO4 (Zhang et al., 2006). Recentemente demonstrou-se que a proteína 2B induz alterações nas interações hospedeiro-afídeo, que não estão unicamente relacionadas pelo silenciamento, mas estão também condicionadas pela interação direta e indireta de mais do que um produto de gene viral com o hospedeiro.

O principal objetivo deste trabalho era conseguir alterações no perfil dos metabolitos secundários em *N. benthamiana*, *T. vulgaris*, *T.x citriodorus* e *C. sativum*, recorrendo ao supressor viral de silenciamento do CMV.

No capítulo 2 abordou-se a infecção por CMV-Fny de *N. benthamiana*, *T. vulgaris* e *C. sativum*. A taxa de infecção encontrada em *N. benthamiana* inoculadas com os transcritos CMV-Fny rondou os 75%, no entanto na inoculação mecânica atingiu valores que rondavam os 85-90 %, tal como aconteceu em *C. sativum*. A infecção por inoculação mecânica de *T. vulgaris* foi de só 12,5 %. Para as espécies *N. benthamiana* e *C. sativum* a inoculação mecânica com CMV-Fny é um método de infecção adequado, destacando-se pela simplicidade e eficiência.

O crescimento verificado nas plantas de *N. benthamiana* infetadas com CMV-Fny foi menor do que nas plantas controlo, produzindo um fenótipo com plantas mais pequenas. No entanto não se verificaram alterações importantes no desenvolvimento em *C. sativum*.

A infecção com CMV-Fny produziu alterações nos metabolitos secundários em todas as plantas hospedeiras alvo de estudo. Assim, o conteúdo de nicotina em *N. benthamiana* infetada pelo CMV-Fny aumentou nas três repetições do ensaio, registando-se também diferenças significativas para diversos princípios ativos nos óleos essenciais de *T. vulgaris*.

Do mesmo modo, em *C. sativum* os componentes do óleo essencial maioritariamente aldeídos, registaram alterações no seu perfil cromatográfico, comprovando-se um aumento significativo na concentração de dodecano.

Se bem que a infecção por CMV pareça ser um caminho possível para elaborar uma estratégia de aumento da produção de metabolitos de interesse em algumas espécies, a morosidade na produção de biomassa poderá revelar-se limitante. É preciso também considerar que visto tratar-se de um vírus com grande capacidade de infecção e capaz de abranger uma diversidade de hospedeiros, não seria possível a sua aplicação em campo. No capítulo três pretendeu-se avaliar se a proteína supressora 2B do CMV-Fny, conseguia alterar os voláteis em *T. x citriodorus*. Para tal fim, foi preparado o vector de expressão pK7-2B, cuja capacidade supressora foi ensaiada em plantas de *N. benthamiana*. A ação supressora do pK7-2B foi demonstrada em ensaios de coinoculação com um vector que expressava a GFP. O silenciamento da GFP, promovido por indutores fortes (lh-GFP e ami-GFP), foi suprimido quando inoculados conjuntamente com pK7-2B. Pode-se assim afirmar que o vector pK7-2B suprime eficazmente o silenciamento por RNA. Quando o vector pK7-2B foi inoculado em plantas de *T.x citriodorus*, aconteceram alterações no perfil do óleo essencial, registando-se aumento significativo de citral 5 dpi, e posteriormente um novo aumento, aos 10 dpi. No caso do linalol o aumento foi também significativo para a análise efetuada 5 dpi. A inoculação de plantas com o vector pK7-2B produziu alterações nos voláteis mas sem afectar o ritmo de crescimento das plantas, contrariamente ao efeito negativo sobre o crescimento exercido pelo vírus nas plantas hospedeiras. Assim, é possível concluir que a estratégia de utilizar o supressor 2B em substituição do CMV, para conseguir um aumento nos voláteis, foi bem-sucedida.

A utilização do vector transiente pK7-2B para promover a alteração dos voláteis foi alvo de um pedido provisório de patente, que se encontra em análise no INPI.

No capítulo 4 foi construído um vector viral, a partir de virus atenuado (TRV), para permitir a expressão sistémica do supressor 2B. A atividade supressora foi confirmada em plantas de *N. benthamiana* 16C que expressam GFP constitutivamente.

Infelizmente não foi possível confirmar a expressão de proteína 2B nas plantas de *T.x citriodorus* e *T. vulgaris*, mas sim em plantas de *N. benthamiana*. Provavelmente por estas espécies não serem hospedeiras do virus, facto *a priori* desconhecido.

Nas plantas de *N. benthamiana* onde foi possível confirmar a presença de RNA correspondente à proteína 2B, verificaram-se alterações significativas na concentração de nicotina, do flavonoide rutina e do ácido clorogénico. Conclui-se que o vector sistémico pTRV-2B promove alterações nos metabolitos secundários em *N. benthamiana* 20 dpi, pelo que este vector poderá ser utilizado para o fim proposto.

No capítulo 5 foi ensaiada a *green synthesis* para produção de nanopartículas de prata, utilizando extratos obtidos de plantas inoculadas com CMV, com o vector pTRV-2B e com ambos. Confirmou-se que todas as partículas obtidas eram nanopartículas, possuíam tamanhos inferiores a 100 nm, e que a caracterização correspondia a clorargirita. Foi também demonstrado que as Nps obtidas a partir dos diferentes extratos, promoveram a remoção de pelo menos 97 % da prata em solução.

As imagens obtidas por microscopia eletrónica de transmissão, revelaram um maior grau de aglomeração, e presumivelmente também de agregação, nas NPs obtidas a partir de extratos de plantas não inoculadas, do que aquelas obtidas de extratos com incorporação de partículas virais. Ao que parece a presença de virus e proteínas nos extratos, diminui a aglomeração e agregação, tornando-se numa alternativa interessante para a produção de NPs utilizando a *green synthesis*.

## Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

Ahmad A, van Vuuren S, Viljoen A (2014) Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils—the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). *Molecules*, 19(3), 2896-2910.

Anand A, Mukherjee SK, Sanan-Mishra N (2013) Tools for pathogenicity: virus encoded RNA silencing suppressors. In “Recent Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education” Microbiology Book Series, number 4. Ed A. Mendez-Vilas, Formatex Research Center, Spain, 751-763.

Baulcombe DC (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 109 – 113.

Basavegowda N, Sobczak-Kupiec A, Malina D, Yathirajan HS, Keerthi VR, Chandrashekar, N, Liny P (2013) Plant mediated synthesis of gold nanoparticles using fruit extracts of *Ananas comosus* (L.) (Pineapple) and evaluation of biological activities. *Advanced Materials Letters*, 4(5), 332-337.

Baxter NJ, Lilley TH, Haslam E, Williamson MP (1997) Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36 (18), 5566-5577.

Belakhdar G, Benjouad A, Kessabi M, Abdennebi EH (2014) Identification of the pyrrolizidine alkaloid 1-hydroxymethylpyrrolizidine from *Thesium humile* Vahl. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(3), 811-814.

Bellardi MG, Benni A, Bruni R, Bianchi A, Parrella G e Biffi S (2006) Cromatography (GC-MS) and virological evaluations of *Lavandula hybrida* alardi infected by Alfalfa mosaic virus. In International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation, 387-392.

Blanchard CL, Boyce PM, Anderson BJ (1996) Cucumber mosaic virus RNA 5 is a mixed population derived from the conserved 3'-terminal regions of genomic RNAs 2 and 3. *Virology* 217(2), 598–601.

Boccard F, Baulcombe D (1993) Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology*,193(2), 563-578.

Braun E, Eichen Y, Sivan U, Ben-Yoseph G (1998) DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. *Nature*, 391 (6669), 775-778.

Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO Journal* 17(22), 6739-6746.

Bronstein LM, Chernyshov DM, Volkov IO, Ezernitskaya MG, Valetsky PM, Matveeva VG, Sulman EM (2000) Structure and properties of bimetallic colloids formed in polystyrene-block-Poly-4-vinylpyridine micelles: catalytic behavior in selective hydrogenation of dehydrolinalool. *Journal of Catalysis*, 196 (2), 302-314.

Bruneton J (1999) Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Medicinales. 3rd Edn., Technique et documentation Lavoisier, Paris.

Bruni R, Bellardi MG, Parrella G, Bianchi A (2006) Impact of alfalfa mosaic virus subgroup I and II isolates on terpene secondary metabolism of *Lavandula vera* DC, *Lavandula × alardii* and eight cultivars of *L. hybrida* Rev. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(4), 189-197.

Bruni R, Bianchi A, Bellardi MG. (2007) Essential oil composition of *Agastache anethiodora* Britton (Lamiaceae) infected by Cucumber mosaic virus (CMV). *Flavour and Fragrance Journal*, 22(1), 67–70.

Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.

Cantore PL, Iacobellis NS, De Marco A, Capasso F, Senatore F (2004) Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (Miller) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7862–7866

Carr CM, Rizo J (2010) At the Junction of SNARE and SM Protein Function. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(4), 488 – 495.

Chalker-Scott L (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*, 70(1), 1-9.

Conti G, Rodriguez MC, Manacorda CA, Asurmendi S (2012). Transgenic expression of Tobacco mosaic virus capsid and movement proteins modulate plant basal defense and biotic stress responses in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(10), 1370-1384.

Costa, A (2014) Caracterização dos supressores p20 e p23 do *Citrus tristeza virus* e avaliação da possibilidade da sua inibição. Universidade do Algarve. *Tese de Doutoramento*.

Cullen BR, (2004) Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus research*, 102 (1), 3-9.

Dai J e Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15 (10), 7313-7352.

Danielson DC e Pezacki JP (2013). Studying the RNA silencing pathway with the p19 protein. *FEBS letters*, 587 (8), 1198-1205.

Davino S, Panno S, Rangel EA, Davino M, Bellardi MG, Rubio L (2012) Population genetics of cucumber mosaic virus infecting medicinal, aromatic and ornamental plants from northern Italy. *Arch Virol*. 157(4):739-45

Deluc L, Bogs, J, Walker AR, Ferrier T, Decendit A, Merillon JM, Barrieu F (2008). The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and

proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiology*, 147(4), 2041-2053.

Dewick PM (2002) *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.

Diaz-Pendon JA e Ding SW (2008) Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 46, 303–326.

Dikova B, Pushkarov (2013) *Cucumber mosaic virus* on essential oil-bearing and medicinal plant in Bulgaria. <http://agris.fao.org/aos/records/BG2013000549>.

Ding SW, Anderson BJ, Haase HR e Symons RH (1994). New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology*, 198 (2), 593-601.

Ding SW, Rathjen JP, Li WX, Swanson R, Healy H e Symons RH (1995) Efficient infection from cDNA clones of *Cucumber mosaic cucumovirus* RNAs in a new plasmid vector. *J. Gen. Virol.* 76, 459–464.

Dixon RA e Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085-1097.

Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M Biedermann D e Sarek J (2006) Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural product reports*, 23 (3), 394-411.

Elia P, Zach R, Hazan S, Kulushev S, Porat ZE, Zeiri Y (2014) Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *International journal of nanomedicine*, 9 (1), 4007-4021.

Epamino UC, (2012) Desenvolvimento de método magnetoeletróquímico para sensoriamento e remediação ambiental e nanohidrometalurgia magnética. Tese de Doutorado em Qca. Universidade de São Paulo.

Eyres G, Dufour JP, Hallifax G, Sotheeswaran S e Marriott PJ (2005) Identification of character-impact odorants in coriander and wild coriander leaves using gas chromatography-olfactometry (GCO) and comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (GC×GC–TOFMS). *Journal of Separation Science*, 28(9-10), 1061-1074.

Foxe MJ (1991) Role of viruses in plant biotechnology, *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 12, 87-94

Fraile A, Alonso-Prados JL, Aranda MA, Bernal JJ, Malpica MJ, Garcia-Arenal F (1997). Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. *J Virol* 71, 934–940.

García-Arenal, Escriu F, Aranda MA, Alonso-Prados JL, Malpica JM, Fraile A (2000) Molecular epidemiology of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA. *Virus Research* 71 (1-2), 1–8.

García-Arenal F e MacDonald BA (2003) An analysis of the durability of the resistance to plant viruses. *Phytopathology* 93, 432-952.

García-Arenal F e Palukaitis P (1999) Structure and functional relationships of satellite RNAs of Cucumber mosaic virus. In: P.K. Vogt e A.O. Jackson, eds *Satellites and Defective Viral RNAs*, (Berlin: Springer-Verlag), 37–63.

Gershenson J e Dudareva N (2007) The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology*, 3(7), 408-414.

Gole A, Dash C, Ramakrishnan V, Sainkar SR, Mandale AB, Rao M e Sastry M (2001) Pepsin-gold colloid conjugates: preparation, characterization, and enzymatic activity. *Langmuir*, 17 (5), 1674-1679.

González I, Martínez L, Rakitina DV, Lewsey MG, Atienzo FA, Llave C, Kalinina NO, Carr JP, Palukaitis P, Canto T (2010) Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular

targets and interactions: Their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 294–303.

Gouveia P, Nolasco G (2012). The p19.7 RNA silencing suppressor from Grapevine leafroll-associated virus 3 shows different levels of activity across phylogenetic groups. *Virus Genes*, 45, 333–339.

Guo HS, Ding SW (2002) A viral protein inhibits the long range signalling activity of the gene silencing signal. *EMBO J*, 21, 398–407.

Gutha LR, Casassa, LH, Harbertson JF e Naidu RA (2010) Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *BMC plant biology*, 10 (1), 187.

Harris AT, Bali R, (2008) On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. *J. Nanopart. Res.*, 10, 691-695.

Hedde JG (2013) Gold Nanoparticle-Biological Molecule Interactions and Catalysis. *Catalysts* 3, 683-708.

Herlekar M, Barve S e Kumar R (2014) Plant-Mediated Green Synthesis of Iron Nanoparticles. *Journal of Nanoparticles*, 1-9.

Hoag GE, Collins J, Holcomb JL, Hoag JR, Nadagouda MN, Varma RS (2009) Degradation of bromothymol blue by 'greener' nano-scale zero-valent iron synthesized using tea polyphenols. *Journal of Materials Chemistry*, 19(45), 8671-8677.

Hutchison JE (2008) Greener nanoscience: a proactive approach to advancing applications and reducing implications of nanotechnology. *ACS Nano*, 2 (3), 395–402.

Jana NR, Sau TK, Pal T (1999) Growing small silver particle as redox catalyst. *J. Phys. Chem. B* 103, 115–121.

Javed H, Erum S, Tabassum S e Ameen F (2013) An Overview on Medicinal Importance of *Thymus Vulgaris*. *Journal of Asian Scientific Research*, 3 (10), 974-982.

Ji LH e Ding SW (2001) The suppressor of transgene RNA silencing encoded by *Cucumber mosaic virus* interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14, 715–724.

Jones JD e Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature*, 444 (7117), 323-9.

Kabera JN, Semana E, Mussa AR e He X (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377-392.

Kampa M, Nifli AP, Notas G e Castanas E (2007) Polyphenols and cancer cell growth. *In: Reviews of physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 79-113. Springer Berlin. Heidelberg.

Kaper JM, Waterworth HE (1981) *Cucumoviruses*. *In: Handbook of Plant Virus Infections: Comparative Diagnosis*, 257-332. (ed .E. Kurstak). Amsterdam: Elsevier/North-Holland.

Klabunde KJ (2001) Introduction to Nanotechnology. *In: Nanoscale Materials in Chemistry* (ed K. J. Klabunde), John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.

Kumair S, Pundhir S, Priya P, Jeena G, Punetha A, Chawla K, Firdos JZ, Mondal S, Yadav G (2014) EssOilDB: a database of essential oils reflecting terpene composition and variability in the plant kingdom. *Database* 2014: bau120.

Larsen JS, Curtis WR (2012) RNA viral vectors for improved Agrobacterium-mediated transient expression of heterologous proteins in *Nicotiana benthamiana* cell suspensions and hairy roots. *BMC biotechnology* 12.1: 21.

Lewsey M, Robertson FC, Canto T, Palukaitis P, Carr JP (2007) Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant J* 50: 240–252.

Lewsey MG, Murphy AM, MacLean D, Dalchau N, Westwood JH, Macaulay K, Bennett MH, Moulin M, Hanke DE, Powell G, Smith AG, Carr JP (2010) Disruption of Two Defensive Signaling Pathways by a Viral RNA Silencing Suppressor. *MPMI* 23 (7): 835–845.

Li B, Nierras CR, Warner JR (1999) Transcriptional elements involved in the repression of ribosomal protein synthesis. *Mol Cell Biol* 19(8):5393-404.

Li D e Kaner RB (2005). Processable stabilizer-free polyaniline nanofiber aqueous colloids. *Chem. Commun.*, (26), 3286-3288.

Lichtenthaler HK (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual review of Plant Biology*, 50 (1), 47-65.

Lico C, Chen Q e Santi L (2008) Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *Journal of Cellular Physiology* 216.2: 366-377.

Lindbo JÁ, Silva-Rosales L, Proebsting WM e Dougherty WG (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *The Plant Cell*, 5 (12), 1749-1759.

Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP (2002) Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J*, 31, 777-86.

Love AJ, Talianski ME, Chapman SN and Shaw J (2014) Nanoparticles synthesis using plant extracts and virus. GB, James Hutton Inst. WO2014045055 (A1) (C12N7/00). 27/03/2014. Google patentes.

Lu AH, Salabas EL, Schüth F (2007) Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. (ed Angewandte Chemie International) 46(8), 1222-1244. WILEY-VCH Verlag.

Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe, DC (2003) Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30, 296-303.

Lu S, Cullen BR (2004) Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol*, 78, 12868–12876.

McDougall GJ e Stewart D (2005) The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, 23 (4), 189-95.

MacFarlane SA E Popovich AH (2000) Efficient Expression of Foreign Proteins in Roots from *Tobravirus* Vectors. *Virology* 267: 29–35.

Makarov VV, Love AJ, Sinitsyna OV, Makarova SS, Yaminsky IV, Taliany ME, Kalinina NO (2014) “Green” Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Acta Naturae* 6(1), 35–44.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C e Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

Mandadi KK, Scholthof K-BG.(2013) Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? *The Plant Cell*, 25 (5), 1489-1505.

Mallory AC, Bartel DP, Bartel B (2005) MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *The Plant Cell* ,17, 1360–1375.

Msaada K, Hosni K, Taarit MB, Chahed T, Kchouk ME e Marzouk B . (2007) Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. *Food Chemistry*, 102 (4), 1131-1134.

Matasyoh JC, Maiyo ZC, Ngure RM e Chepkorir R (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry*, 113 (2), 526-529.

Mauck KE, De Moraes CM e Mescher MC (2010) Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (8), 3600-3605.

Mazier M, Flamain F, Nicolai M, Sarnette V, Caranta C (2011) Knock-down of both eIF4E1 and eIF4E2 genes confers broad-spectrum resistance against potyviruses in tomato. *PLoS One*, 6 (12), 29595.

Miguel MG (2010) Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15, 9252-9287.

Miladi H, Slama RB, Mili D, Zouari S, Bakhrouf A e Ammar E (2013) Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*, 5 , 729-739. doi:10.4236/ns.2013.56090.

Mittal KL, ed. (2013). *Polyimides: synthesis, characterization, and applications*. Springer Science & Business Media.

Moffett P (2009) Mechanisms of recognition in dominant R gene mediate resistance. *Advances in Virus Research*. , 75, 1-33.

Molnar A, Melnyk C e Baulcombe D (2011) Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. *Genome Biol* 12 (1), 1465-6906.

Morales R (2002) *The history, botany and taxonomy of the genus Thymus*. In: Stahl-Biskup E, Sáez F, (Eds). *Thyme. The genus Thymus*. London: Taylor & Francis, 1-43.

Mur L, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* 140(1), 249-62.

Nadagouda MN, Polshettiwar V, Varma RS (2009) Self-assembly of palladium nanoparticles: synthesis of nanobelts, nanoplates and nanotrees using vitamin B1, and their application in carbon-carbon coupling reactions. *Journal of Materials Chemistry*, 19(14), 2026-2031.

Nakamoto S, Machida N (1992) Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives. *Water Research*, 26(1), 49-54.

Narayanan K, Sakthivel N (2011) Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Adv. Colloid Interface Sci* 169(2), 59-79.

Nolasco G, Sequeira O (1993) A pesquisa de RNA bicatenário (ds-RNA) aplicada ao diagnóstico viral. *Mol. Cell. Biol.* 18 (1/2), 23-26

Okitsu K, Yue A, Tanabe S, Matsumoto H, Yobiko Y (2007). Formation of colloidal gold nanoparticles in an ultrasonic field: control of rate of gold(III) reduction and size of formed gold particles. *Langmuir*, 23, 13244–13244.

Omidbaigi R (2005) *Production and processing of medicinal plants*. Astan Godesa Razavei Publication, 1, 346.

Onkokesung N, Gális I, von Dahl C, Matsuoka K, Saluz HP e Baldwin IT (2010). Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding and simulated herbivory in *Nicotiana attenuata* leaves. *Plant physiology*, 153(2), 785-798.

Padmanabhan MS, Dinesh-Kumar SP (2008) Virus-Induced Gene Silencing (VIGS), In: Mahy B.W.J., Van Regenmortel M.H.V. (ed.). *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*, 38-43.

Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM and Vaucheret H (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *The EMBO Journal* 16 (15), 4738–4745.

Palukaitis P e García-Arenal F (2003) *Cucumoviruses*. *Advances in virus research* 62 , 241-323.

Pandey SP, Shahi P, Gase K and Baldwin IT (2008) Herbivory-induced changes in the small-RNA transcriptome and phytohormone signaling in *Nicotiana attenuate*. *PNAS*, 105 (12), 4559-4564.

Patra JK and Baek KH (2014) “Green Nanobiotechnology: Factors Affecting Synthesis and Characterization Techniques,” *Journal of Nanomaterials*, 219.

Pelletier SW (Ed.) (1983). *Alkaloids: chemical and biological perspectives*, 1-6. New York: Wiley.

Pereira OR, Macias RJ, Perez MJ, Marin JJ e Cardoso SM (2013) Protective effects of phenolic constituents from *Cytisus multiflorus*, *Lamium album L.* and *Thymus citriodorus* on liver cells. *Journal of Functional Foods* 5(3), 1170-1179.

Pontier D, Balague C, Roby D (1998) The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *C R Acad Sci Ser III Sci Vie* 321, 721–734.

Primo Yúfera E (1995) *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Barcelona: Reverté.

Qi Y, Zhong X, Itaya A, Ding B (2004) Dissecting RNA silencing in protoplasts uncovers novel effects of viral suppressors on the silencing pathway at the cellular level. *Nucleic Acids Res.* 32, e179.

Rao ALN, Francki RIB (1982) Distribution of determinants for symptom production and host range on the three RNA components of *Cucumber mosaic virus*. *J. Gen. Virol*, 61: 197-205.

Ravi R, Prakash M e Bhat KK (2007) Aroma characterization of coriander (*Coriandrum sativum L.*) oil samples. *European Food research and technology*, 225(3-4), 367-374.

Reches M, Gazit E (2003). Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. *Science*, 300(5619), 625-627.

Reddy MB, Angers P, Gosselin A e Arul J (1998) Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 47(8), 1515-1520.

Rice-evans CA, Miller NJ Bolwell PG, Bramley PM e Pridham JB. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383.

Rizos H, Gunn LV, Pares RD, Gillings MR (1992) Differentiation of *Cucumber mosaic virus* isolates using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 73: 2099-2103.

Rizzo TM e Palukaitis P (1989). Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 1. *J Gen Virol*, 70(1), 1-11.

Roberts MF (Ed.) (2013) *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media.

Roby MHH, Sarhan MA, Selim KHA, Khalel KI (2013) Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.

Rodríguez-León E, Iñiguez-Palomares R., Navarro RE, Herrera-Urbina R, Tánori J, Iñiguez-Palomares C e Maldonado A (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). *Nanoscale Research Letters*, 8(1): 1-9.

Roossinck MJ, Zhang L, Hellwald K (1999) Rearrangements in the 5' Nontranslated Region and Phylogenetic Analyses of *Cucumber Mosaic Virus* RNA 3 Indicate Radial Evolution of Three Subgroups. *J. Virol.* 23(8): 6752–6758.

Roth BM, Pruss GJ, Vance VB (2004) Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res* 102: 97–108.

Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10, 937–946.

Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M e Bruni R (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food chemistry*, 91(4), 621-632.

Salgueiro LR (1994) Os tomilhos portugueses e seus óleos essenciais. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra. Coimbra.

Scheibel Parthasarathy R, Sawicki G, Lin XM, Jaeger H e Lindquist SL (2003). Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4527-4532.

Scholthof HB (2007) Heterologous Expression of Viral RNA Interference Suppressors: RISC Management. *Plant Physiology*, 145(4):1110-1117.

Seidman CE, Struhl K, Sheen J e Jessen T (1997) Introduction of Plasmid DNA into Cells. *Current Protocols in Molecular Biology*: 1.8.1-1.8.10.

Senthil-Kumar M e Mysore KS (2014) Tobacco rattle virus–based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Nature protocols* 9 (7): 1549.

Shankar SS, Ahmad A e Sastry M (2003) Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnol.Prog*, 19 (6) , 1627-1931.

Shankar SS, Ahmad AA, Sastry M (2004) Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *J. Colloid. Interface. Sci.* ; 275(2), 496-502.

Shimura H, Pantaleo V, Ishihara T, Myojo N, Inaba Ji (2011) A Viral Satellite RNA Induces Yellow Symptoms on Tobacco by Targeting a Gene Involved in Chlorophyll Biosynthesis using the RNA Silencing Machinery. *PLoS Pathog* 7(5), 1002021.

Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendonça DI e Domingues FC (2011) Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 19(1), 42-47.

Singaravelu G, Arockiamary JS, Arockiamary VX, Govindaraju K (2007) A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 57: 97–101.

Singh D, Moore C, Gilland A, and Caar JP (2004) Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid. *Molecular Plant Pathology* 5( 1 ) , 57–63.

Singh N, Jenkins GJS, Asadi R and Doak SH (2010) Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews* 1: 5358.

Singh R, Nalwa HS (2011) Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs. *J Biomed Nanotechnol*, 7 (4), 489-503.

Smith NA, Singh SP, Wang M-B, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319–320.

Steinmetz NF, Cho CF, Ablack A, Lewis JD e Manchester M (2011) Cowpea mosaic virus nanoparticles target surface vimentin on cancer cells. *Nanomedicine*, 6(2), 351-364.

Stoessl A, Stothers JB e Ward EW (1976) Sesquiterpenoid stress compounds of the Solanaceae. *Phytochemistry*, 15(6), 855-872.

Susi P, Hohkuri M, Wahlroos T, Kilby NJ (2004) Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol Biol.*, 54(2):157-74.

Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB e Ehlers B (2003) Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 29(4), 859-880.

Tran ST, Le Ngoc Than NQB, Phuong DB (2013). Introduction to information technology. Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, MA, US: *Proceedings of the 9th International CDIO Conference*: June.

Vance V, Vaucheret H (2001) RNA silencing in plants—Defense and counterdefense. *Science* 292, 2277–2280.

Vankar PS, Shukla D (2012) Biosynthesis of silver nanoparticles using lemon leaves extract and its application for antimicrobial finish on fabric. *Applied Nanoscience*, 2(2), 163-168.

Vigneshwaran N, , Kumar S, Kathe AA, Varadarajan PV, Prasad V (2006) Function finishing of cotton fabrics using ZnO- soluble starch nanocomposites, *Nanotechnology*, 17, 5087-5095.

Visser PB, Bol JF (1999), Nonstructural proteins of Tobacco rattle virus which have a role in nematode-transmission: expression pattern and interaction with viral coat protein. *J Gen Virol* 80: 3273-3280.

Vlot AC, Klessig DF, Park SW (2008) Systemic acquired resistance, the elusive signal(s). *Curr. Opin. Pl. Biol.*, 11: 436–442.

Voinnet O (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* 6:206–220.

Voinnet O e Baulcombe DC (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389 553.

Voinnet O, Rivas S, Mestre P e Baulcombe D (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, 33(5), 949-956.

- Walter, D (2012) Primary Particles – Agglomerates –Aggregates. *Nanomaterials*, 9-24.
- Wladimir I, Tameling L, Takken FLW (2008) Resistance proteins: scout of the plant innate immune system. *Eur J Plant Pathol.*;121:243–255.
- Waterhouse PM, WangMB, Lough, T (2001) Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature* 411: 834–842.
- Whitham SA, Yang C, Goodin MM (2006) Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1207–1215.
- Wong K, Park HT, Wu JY, Rao Y (2002) Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. *Genetics & Development* 12:583–591.
- Yen GC e Chen HY (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,43(1), 27-32.
- Yu H, Kumar P P (2003) Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA, *Plant Cell* 22:167-174.
- Zhang X, Yuan Y-R, Pei Y, Lin S-S, Tuschl T, Patel DJ, Chua N-H. 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 20: 3255–3268.
- Ziebell HM, Groen AM, Tungadi SC, Westwood T, Lewsey HJ, Moulin M, Kleczkowski A, Smith AG, Stevens M, Powell G e Caar J (2011). *Cucumber mosaic virus* and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco. *Scientific Reports* 1, 187. <http://doi.org/10.1038/srep00187>.