



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Botucatu

**RECEPTOR TIPO QUINASE DE TOMATE: CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E IMPLICAÇÕES NAS INFECÇÕES VIRAIS**

BOTUCATU - SP

FEVEREIRO – 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu

ALESSANDRA TENÓRIO COSTA

**RECEPTOR TIPO QUINASE DE TOMATE: CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E IMPLICAÇÕES NAS INFECÇÕES VIRAIS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Doutor em Ciências Biológicas – Genética.

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

BOTUCATU - SP
FEVEREIRO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Costa, Alessandra Tenório.

Receptor tipo quinase de tomate : caracterização molecular e implicações nas infecções virais / Alessandra Tenório Costa. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Capes: 20203004

1. Tomate - Genética. 2. Viroses das plantas. 3. Expressão gênica. 4. Fumo - Engenharia genética.

Palavras-chave: Interação vírus-planta; Mecanismos de defesa; Receptor quinase; Tomateiro; Viroses.

Dedico

Aos meus amados pais, Jurandir e Dalva

Aos meus irmãos, Alex e Aline

Aos meus cunhados, Simoni e Daniel

À minha encantadora sobrinha, Júlia

À minha querida avó, Maria Áurea

Aos meus familiares

Carinhosamente.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam
reais. Sonhe, trace metas, estabeleça
prioridades e corra riscos para executar seus
sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar
por omitir!”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por estarem sempre ao meu lado me dando força, coragem e perseverança para superar todas as dificuldades desta caminhada, servindo sempre como fonte de muita fé.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia, pela orientação e oportunidade da realização do trabalho.

À Prof^a. Dra. Renate Krause Sakate pela preciosa colaboração nos experimentos, paciência, ensinamentos e prestatividade.

Ao Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega pelo auxílio e atenção na análise de microscopia confocal.

À Prof^a. Dra. Martha Maria Mischan pelo ajuda e atenção na análise estatística de alguns dados do trabalho.

A grande amiga Dra. Juliana Pereira Bravo pelo apoio, colaboração, por toda a ajuda nas diversas etapas deste trabalho e por compartilhar das alegrias e tristezas durante esse período.

Ao Dr. Flávio Tetsuo Sasaki (Bonsai) pela paciência e orientação nas etapas iniciais do trabalho.

Ao Dr. Fábio Eduardo Severino pela amizade, colaboração e tolerância.

Aos demais amigos de todos os dias, membros do laboratório BIOGEM: Rodrigo Makiyama (Japa), Alessandra V. Nunes, Fabíola Ocampo, Marcela I. Rodrigues, Márcio de Carvalho e a todos que passaram pelo laboratório.

Aos amigos membros dos laboratórios CAGEM em especial a Helena, Vanusa, Júlio e Maria Cecília.

Aos amigos do laboratório GMDV em especial ao Éder e a Cristiane.

A todos os amigos do Laboratório de Virologia Vegetal, do Departamento de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP – Botucatu.

Ao Doutorando Daniel Baron pela ajuda na análise estatística SAS.

Aos professores, funcionários (José, Adriana e Betina) e colegas da pós-graduação do Departamento de Genética, pela harmoniosa convivência de todos os dias.

Aos professores e funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP – Botucatu.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu, pela oportunidade concedida para a efetivação deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

A minha família e em especial a minha avó, pelo incentivo, apoio em todos os momentos e as muitas orações.

Ao meu tio Ivair pelo apoio e orientação durante parte da minha vida acadêmica, da graduação até o meu doutorado e nas futuras oportunidades que viram.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

COSTA, Alessandra Tenório, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, Fevereiro de 2014.
RECEPTOR TIPO QUINASE DE TOMATE: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMPLICAÇÕES NAS INFECÇÕES VIRAIS. Professor Orientador: Dr. Ivan de Godoy Maia.

A exposição das plantas a diferentes estresses bióticos e abióticos interferem com os padrões de expressão de diversos genes. Estudos sobre a expressão diferencial de genes em plantas de tomate infectadas com *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV gênero *Potyvirus*) revelaram a repressão de um gene que codifica um receptor do tipo LRR-RLK (*leucine-rich repeat receptor-like kinase*). Este mesmo receptor, porém, não figura no rol de receptores induzidos pela infecção do tomateiro por um *Tospovirus*, sugerindo um comportamento diferencial deste gene frente à infecção por outras espécies virais. Os LRR-RLKs constituem um grupo diverso de proteínas ancoradas na membrana plasmática que permitem à célula reconhecer e responder ao ambiente extracelular, sendo um componente da via de transdução de sinal. Este estudo teve como objetivos caracterizar molecular e funcionalmente o gene que codifica um LRR-RLK (recentemente denominado SOBIR1) em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) infectadas pelos vírus PepYMV e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), gênero *Tospovirus*, com o intuito de desvendar uma possível participação desse receptor no desencadeamento da resposta de defesa durante a infecção por essas duas espécies virais. A caracterização molecular do gene *SISOBIR1* foi obtida através da análise do perfil de expressão do receptor frente às infecções pelos vírus PepYMV e TCSV e em resposta ao estresse mecânico por meio da técnica de PCR em tempo real. Em paralelo, os níveis de expressão de *SISOBIR1* em diferentes órgãos/ tecidos da planta, bem como a localização subcelular de seu produto foi investigada e uma árvore filogenética foi construída. Nos estudos funcionais foi verificado o efeito da superexpressão do gene *SISOBIR1* em plantas de tabaco infectadas com cada uma das espécies virais. Além disso, investigou-se a expressão de genes de defesa previamente selecionados e espécies reativas de oxigênio foi detectada nas plantas com superexpressão. Os resultados revelaram que a expressão de *SISOBIR1* é modulada de forma diferente nas plantas de tomateiro infectadas pelo PepYMV (repressão) e pelo TCSV (indução), sendo

SISOBIR1 também responsivo ao estresse mecânico. *SISOBIR1* é expresso preferencialmente nas folhas de tomate e seu produto encontra-se localizado na membrana plasmática da célula vegetal. A análise filogenética mostrou que o receptor *SISOBIR1* agrupou-se com os receptores *SOBIR1* de arábida, uva e de tabaco, porém apresentando maior identidade com o receptor de tabaco cuja função está relacionada com a resposta de hipersensibilidade e ao estresse mecânico. Os resultados da caracterização funcional não revelaram diferenças significativas na acumulação viral entre plantas de tabaco transgênicas superexpressando o receptor *SISOBIR1* e plantas selvagens não transformadas. Para os genes de defesa *PR1* e *PR6*, um aumento na expressão gênica foi evidenciado nas plantas superexpressando o receptor *SISOBIR1* logo após o ferimento, porém de modo similar ao observado em plantas de tabaco selvagem. Quanto à detecção de espécies reativas de oxigênio, os resultados sugerem um maior acúmulo do ânion superóxido nas plantas de tabaco transgênicas em relação à planta selvagem na fase inicial da resposta ao ferimento. Os dados obtidos no presente estudo forneceram informações importantes sobre o gene *SISOBIR1* e seu produto, porém não evidenciaram uma participação direta de *SISOBIR1* na resposta às infecções virais.

Palavras chave: interação vírus-planta, receptor quinase, viroses, mecanismos de defesa, tomateiro.

ABSTRACT

COSTA, Alessandra Tenório, Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu Campus, February 2014. **RECEPTOR-LIKE KINASE OF TOMATO: MOLECULAR CHARACTERIZATION AND IMPLICATIONS IN VIRAL INFECTIONS.** Advisor: Dr. Ivan de Godoy Maia.

The exposure of plants to various biotic and abiotic stresses interferes with the expression patterns of different host genes. Studies on differential gene expression in tomato plants infected with *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) revealed the repression of a gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK). However, this receptor didn't figure among the receptors induced in tomato during the infection of a viral species belonging to the *Tospovirus* genus, suggesting a differential behavior of this gene in response to other virus species. LRR-RLKs constitute a diverse group of proteins anchored in the plasma membrane allowing the cell to recognize and respond to the extracellular environment, being a component of the signal transduction pathway. This study aimed to perform a molecular and functional characterization of the gene encoding such a LRR-RLK from tomato (*Solanum lycopersicum*) (recently nominated *SISOBIR1*) infected by PepYMV and *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Tospovirus* genus, in order to reveal a possible implication of this receptor in triggering defense responses during infection by these two viral species. Molecular characterization of *SISOBIR1* was acquired through the determination of its expression profile in response to PepYMV and TCSV infection, respectively, and to mechanical wounding employing real-time PCR. In parallel, *SISOBIR1* expression levels on different tomato organs/tissues were determined and protein subcellular localization investigated, and a phylogenetic tree was constructed. In functional studies, the effect of *SISOBIR1* overexpression in tobacco plants infected with each virus species was observed. Furthermore, we investigated the expression of previously selected defense genes and determined reactive oxygen species accumulation in *SISOBIR1*-overexpressors. The results revealed that the expression of *SISOBIR1* is modulated differently in tomato plants infected PepYMV (repression) and the TCSV (induction), and that the gene is responsive to mechanical wounding. *SISOBIR1* is preferably expressed in tomato leaves and was found to be localized in the cell plasma membrane. Phylogenetic analysis indicated that *SISOBIR1* was grouped with SOBIR1 receptors of

arabidopsis, grape and tobacco but showed greater identity with a tobacco receptor whose function is related to hypersensitive response and mechanical stress. The results of the functional analysis did not show any difference between the viral accumulation observed in transgenic tobacco plants overexpressing *SISOBIR1* and untransformed wild-type plants. For the defense genes *PR1* and *PR6*, an increase in gene expression was evident in plants overexpressing *SISOBIR1* immediately after the injury but in a similar way to the one observed in wild-type plants. The detection of superoxide revealed a larger accumulation of this reactive species in transgenic tobacco plants compared to wild-type plants in the initial step of the response to injury. The data obtained in this study provided us with important information about the *SISOBIR1* gene and its product, but didn't evidenced a direct involvement of *SISOBIR1* in response to viral infections.

Keywords: plant-virus interactions, receptor kinase, viruses, defense mechanisms, tomato.

LISTA DE FIGURAS

➤ REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Representação esquemática do genoma do potyvírus *Turnip mosaic virus* conforme Wei *et al.*, (2010). Na extremidade 5` encontra-se a proteína VPg e na extremidade 3` a cauda poli (A) que é representada como (A)_n. As duas curtas linhas na horizontal presentes nas extremidades representam as regiões não codificadoras. A caixa toda representa a ORF única que codifica uma poliproteína. As proteínas maduras resultantes do processamento da poliproteína são indicadas como caixas pequenas. A ORF *pipo* (a partir dos nucleotídeos 3079-3258) derivada de um *frameshift* na região codificadora da P3 é indicada como uma barra cinza, e a proteína P3N-PIPO é mostrada em verde 27

Figura 2. Ilustração esquemática da partícula de um tospovírus (TSWV) e sua organização genômica. Quatro são as proteínas estruturais virais: as glicoproteínas Gn e Gc (em amarelo e laranja) formando o dímero e inseridas no envelope da partícula; a proteína N (em verde) ancorada nos RNAs virais e a proteína L (em cinza), também associada aos RNAs virais. Essas duas últimas formam os complexos ribonucleoprotéicos também conhecidos como ribonucleocapsídeos (RNP). Os RNAs virais, de acordo com o seu tamanho são classificados em S (*small* – pequeno), M (*medium* – médio) e L (*large* – grande). Fonte da ilustração: expasy.com/ViralZone2010 Swiss Institute of Bioinformatics 33

Figura 3. Esquema de classificação para receptores de proteínas quinase (RPK) envolvidos no desenvolvimento da planta e resistência a doenças modificado de Afzal *et al.*, 2008. RPKs podem ser divididos em três subclasses principais de acordo com diferentes especificidades de substrato do domínio quinase. Os receptores tirosina-quinase (RTK) que fosforilam resíduos de tirosina, serina / treonina quinases (STKS) fosforilam serina e treoninas e histidina quinases fosforilam resíduos de histidina (RHKS). Receptores STKs caem em uma ampla família conhecida como o receptor quinase (RLK) / família *Pelle*. Os RLKs podem ser subdivididos em RLCKs (receptores quinase citoplasmáticos) e RLP (receptores de proteínas) 43

➤ CAPÍTULO 1

Figura 1. Representação esquemática do vetor pK7WGF2,0 com a indicação dos sítios *attR*, local de inserção do clone de entrada 61

Figura 2. Diagrama esquemático da construção pEGFP:*SISOBIR1* contendo a região codificadora de *SISOBIR1* fusionada a *Egfp* sob controle do promotor e terminador 35S do CaMV (*Cauliflower mosaic virus*). Can denota o gene *nptII* que confere resistência a canamicina; *attR2* e *attR1* são as regiões de recombinação homólogas; *Egfp* (proteína fluorescente verde com *enhancer*) e bordas (LB e RB) 62

Figura 3: Amplificação por RT-PCR da parte da região codificadora da proteína capsidial do PepYMV (seta) em amostras de plantas de tomateiro inoculadas com o vírus. Amostras: Pep-1 – Pep-6 de plantas 21 dpi; L (marcador molecular de 1Kb); (+) controle positivo – planta que serviu como fonte de pré-inóculo e (-) controle negativo – água. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 67

Figura 4: Amplificação por RT-PCR da região não traduzida do terminal 3' do S RNA e de parte do gene que codifica para a proteína N (senso viral) do TCSV em amostras de plantas de tomateiro inoculadas com o vírus. Amostras: TCSV-1 – TCSV-6 de plantas 21 dpi; L (marcador molecular de 1Kb); (+) controle positivo – planta que serviu como fonte de pré-inóculo, e (-) controle negativo – água. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 67

Figura 5. Expressão relativa do gene *SISOBIR1* em plantas infectadas pelo PepYMV. Amostra NT (não tratada); M (controle mock - mistura de tampão com abrasivo). Análises realizadas a 72 h e 7, 14 e 21 dpi. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação ao controle NT com $P < 0,05$ 68

Figura 6. Expressão relativa do gene *SISOBIR1* onde os níveis de acúmulos dos transcritos foram obtidos a partir dos valores de expressão das plantas infectadas pelo PepYMV deduzidos dos valores de expressão das plantas controle mock. Amostra NT (não tratada); Análises realizadas a 72 h e 7, 14 e 21 dpi 69

Figura 7. Expressão relativa do gene *SISOBIR1* em plantas infectadas pelo TCSV. Amostra NT (não tratada); M (controle mock - mistura de tampão com abrasivo). Análises realizadas a 72 h e 7, 14 e 21 dpi. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação ao controle NT com $P < 0,05$ 70

Figura 8. Expressão relativa do gene *SISOBIR1* em plantas de tomate submetidas ao tratamento com tampão e abrasivo (mock). Amostra NT (não tratada). Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação ao controle NT com $P < 0,05$. 71

Figura 9. Expressão relativa do gene *SISOBIR1* em diferentes órgãos/tecidos de tomateiro. Um pool de cDNAs provenientes de todos os órgãos analisados foi usado como calibrador 72

Figura 10. Representação esquemática do receptor *SISOBIR1* mostrando os diferentes domínios/motivos presentes em sua sequência primária de aminoácidos. S- peptídeo sinal; LRR – repetições ricas em leucina; TM – domínio transmembrana 72

Figura 11 - Localização subcelular do receptor *SISOBIR1* em células da epiderme foliar de *N. benthamiana*. (A) Sinal fluorescente verde da fusão EGFP:*SISOBIR1*; (B) Sinal fluorescente vermelho da fusão AtPIP2A-mCherry (controle); (C) Sobreposição das fluorescências emitidas. Escala da barra = 30,0 μm 74

Figura 12. Árvore filogenética mostrando a relação da sequência deduzida de aminoácidos do domínio catalítico PKc (quinase) do receptor *SISOBIR1* de tomate com mais de 39 outras sequências de receptores. A árvore foi construída usando Neighbor-Joining com bootstrap de 1000 repetições. O ramo que contém o receptor

de tomate investigado está realçado de vermelho	75
---	----

➤ CAPÍTULO 2

Figura 1. Representação esquemática do vetor binário pK7WG2,0 com a indicação dos sítios <i>attR</i>	83
---	----

Figura 2. Diagrama esquemático da construção inserida no vetor pK7WG2,0 contendo a região codificadora do gene <i>SISOBIR1</i> sob controle do promotor (p35S) e sinais de terminação da transcrição (T35S) do CaMV. Can denota o gene <i>nptII</i> que confere resistência a canamicina, <i>attR2</i> e <i>attR1</i> são as regiões de recombinação homólogas	84
---	----

Figura 3. Amplificação por PCR do cassete de expressão nas diferentes linhagens transgênicas de tabaco selecionadas (numeradas 1 a 26). Controle negativo - tabaco selvagem não transformado (WT); Controle positivo - vetor com a região codificadora do gene <i>SISOBIR1</i> de tomate (+); Controle negativo - água (-); L (Marcador molecular de 1Kb)	93
--	----

Figura 4. Expressão relativa do gene que codifica o receptor <i>SISOBIR1</i> em plantas de tabaco transgênicas. Os valores de expressão gênica relativa são mostrados como porcentagem do nível mais elevado de expressão detectado em planta transgênica individual (100%). Os resultados de expressão relativa foram normalizados contra o gene da Actina	94
--	----

Figura 5. Sintomas observados aos 14 dpi em folhas de tabacos transgênicos capazes de superexpressar o gene <i>SISOBIR1</i> de tomate e tabaco selvagem (WT) inoculadas com o PepYMV . NT (não tratadas) e M (inoculação mock)	95
---	----

Figura 6. Detecção do PepYMV em plantas transgênicas de tabaco capazes de superexpressar o receptor <i>SISOBIR1</i> . Eventos de transformação independentes foram analisados (T-1, T-2 e T-6); (WT) plantas selvagens não transformadas. Letras diferentes indicam variação significativa segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade	96
--	----

Figura 7. Plot da amplificação obtido usando amostras de plantas não inoculadas (NT)	97
---	----

Figura 8. Amplificação do vírus TCSV nas plantas não inoculadas (NT). Amostras provenientes de plantas selvagens (WT) ou de diferentes eventos de transformação (T-1, T-2 e T-6); Controle positivo – planta selvagem infectada pelo TCSV; L (Marcador molecular de 50 pb)	97
---	----

Figura 9. Carga viral relativa de TCSV presente nas plantas transgênicas de tabaco capazes de superexpressar o receptor <i>SISOBIR1</i> . Eventos de transformação independentes foram analisados (T-1, T-2 e T-6); (WT) plantas selvagens não transformadas. Os valores das amostras encontram-se relacionadas à amostra calibrador que recebeu o valor relativo de 0,1	98
---	----

Figura 10. Sintomas observados aos 14 dpi em folhas de tabacos transgênicos capazes de superexpressar o gene *SISOBIR1* e de tabaco selvagem (WT), respectivamente, inoculadas com TCSV. NT (plantas não tratadas) 99

Figura 11. A: Valores de ΔC_t obtidos na amplificação do gene *PR-1* em plantas não estressadas de tabaco selvagem e transgênicas. **B:** Expressão relativa do gene *PR-1* de tabaco em *pools* de 6 plantas submetidas a ferimento e abrasivo. Amostra NT (amostras de tabaco não tratadas); WT – tabaco selvagem tratado; T-1, T-2 e T-6 – eventos de transformação tratados. Coletas 1, 3 e 6 horas. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação aos controles não tratado, com $P < 0,05$ 101

Figura 12. A: Valores de ΔC_t obtidos na amplificação do gene *PR-6* em plantas não estressadas de tabaco selvagem e transgênicas. **B:** Expressão relativa do gene *PR-6* de tabaco em *pools* de 6 plantas submetidas a ferimento e abrasivo. Amostra NT (amostras de tabaco não tratadas); WT – tabaco selvagem tratado; T-1, T-2 e T-6 – eventos de transformação tratados. Coletas 1, 3 e 6 horas. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação aos controles não tratados com $P < 0,05$ 103

Figura 13. Expressão relativa do gene que codifica o receptor *WRK* de tabaco em *pools* de 6 plantas submetidas a ferimento com abrasivo. Amostra NT (amostras de tabaco não tratadas); WT – tabaco selvagem tratado; T-1, T-2 e T-6 – eventos de transformação tratados. Coletas 1, 3 e 6 horas. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação aos controles não tratados com $P < 0,05$ 104

Figura 14. Visualização do radical superóxido detectado por coloração NBT em folhas de plantas selvagem (WT) e transgênica 1 hora após o ferimento. **A-** folha de planta selvagem; **B-** folha de planta transgênica (evento de transformação T-6) e respectivos aumentos 105

LISTA DE TABELAS

➤ **CAPÍTULO 1**

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos vírus PepYMV e TCSV e amplificação do gene da TCTP empregados para reações de PCR convencional	53
Tabela 2. Descrição dos oligonucleotídeos desenhados para a validação da expressão gênica do gene <i>SISOBIR1</i> por PCR em tempo real	54
Tabela 3. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene normalizador UBI usado durante a validação do nível de expressão gênica do gene <i>SISOBIR1</i> em diferentes órgãos/tecidos de plantas de tomateiro por PCR em tempo real	56
Tabela 4. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar a região codificadora do gene <i>SISOBIR1</i>	57
Tabela 5. Descrição dos oligonucleotídeos usados para sequenciar a região codificadora do gene <i>SISOBIR1</i>	59

➤ **CAPÍTULO 2**

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para confirmação da inserção do cassete nas plantas de tabaco transformadas	86
Tabela 2. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para a quantificação relativa do número de cópias do vírus TCSV bem como para amplificação do normalizador empregado nas reações de PCR em tempo real	90
Tabela 3. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para verificação da expressão relativa dos genes <i>PR-1</i> , <i>PR-6</i> e <i>WRK</i> nas plantas de tabaco transgênicas submetidas a fermento. O gene que codifica uma Actina foi utilizado como normalizador das reações	92

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
 1- INTRODUÇÃO GERAL	 20
 2- REVISÃO DE LITERATURA	
2.1- A cultura do tomateiro	23
2.2- Família <i>Potyviridae</i>	25
2.2.1- <i>Pepper yellow mosaic virus</i> (PepYMV)	28
2.3- Família <i>Bunyaviridae</i>	30
2.3.1- <i>Tomato chlorotic spot virus</i> (TCSV)	34
2.4- Respostas das plantas aos patógenos	35
2.4.1- Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)	37
2.4.2- Proteínas relacionadas à patogenicidade (PRs)	39
2.4.3- Receptores de proteínas quinase em plantas	42
 3- CAPÍTULO 1:	
Caracterização molecular do receptor quinase (SOBIR1) em plantas de	
tomateiro infectadas com os vírus <i>Pepper yellow mosaic virus</i> (PepYMV) e	
<i>Tomato chlorotic spot virus</i> (TCSV).	
 1- INTRODUÇÃO.....	 47
 2- MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1- Obtenção e manutenção dos isolados dos vírus	49
2.2- Inoculação das plantas e coleta das amostras	49
2.3- Extração de RNA total para detecção do PepYMV e TCSV	50
2.4- Extrações de RNA total dos tecidos foliares para análise de PCR em	
tempo real	50
2.5- Quantificação dos RNAs totais	51
2.6- Análise da integridade das amostras de RNA total	51
2.7- Tratamento com DNase e Reação da Transcriptase Reversa (RT)	51
2.8- PCR convencional para detecção do PepYMV e TCSV	52

2.9- Desenho dos iniciadores (<i>oligonucleotídeos</i>) para PCR em Tempo Real (qPCR)	53
2.10- PCR em Tempo Real para Validação da Expressão Gênica	54
2.11- Indução de estresse mecânico empregando tampão e abrasivo	55
2.12- Análise de expressão gênica do receptor <i>SISOBIR1</i> em diversos órgãos/tecidos de tomateiro	56
2.13- Região codificadora do gene <i>SISOBIR1</i> e seus sítios de restrição	56
2.14- Desenho dos oligonucleotídeos para amplificação e clonagem da região codificadora de <i>SISOBIR1</i>	56
2.15- Transformação de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	57
2.16- Análise dos clones transformantes	57
2.17- Sequenciamento	58
2.18- Reação de PCR convencional utilizando a enzima <i>Pfu</i> para clonagem no vetor pENTR/D- TOPO®	59
2.19- Construção baseada em vetor TOPO	60
2.20- Clonagem no vetor binário Gateway contendo GFP	60
2.21- Transformação de <i>E. coli</i> eletrocompetentes com pEGFP: <i>SISOBIR1</i> e seleção dos transformantes	62
2.22- Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	62
2.23- Germinação das sementes de <i>Nicotiana benthamiana</i>	63
2.24- Ensaios de agroinfiltração e observação da localização subcelular	63
2.25- Análise filogenética	64
 3- RESULTADOS	
3.1- Análise da expressão do receptor <i>SISOBIR1</i> em plantas de tomate infectadas pelos vírus PepYMV e TCSV	66
3.2- Análise da expressão em plantas de tomateiro tratadas com tampão e abrasivo	70
3.3- Análise da expressão gênica em diferentes órgãos/tecidos de tomateiro ...	71
3.4- EST correspondente à região codificadora de <i>SISOBIR1</i> – análises <i>in silico</i>	72
3.5- Clonagem da região codificadora de <i>SISOBIR1</i> no vetor binário Gateway contendo GFP	73
3.6- Localização subcelular do receptor <i>SISOBIR1</i>	73
3.7- Relações filogenéticas do receptor <i>SISOBIR1</i>	74
 4- DISCUSSÃO	76
 5- CONCLUSÕES	81

4- CAPÍTULO 2:

Estudo funcional do gene que codifica o receptor SOBIR1 de tomate (*SISOBIR1*) empregando superexpressão em plantas de tabaco.

1- INTRODUÇÃO	82
2- MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1- Clonagem no vetor binário Gateway pK7WG2,0	83
2.2- Esterilização e germinação das sementes de <i>Nicotiana tabacum</i>	84
2.3- Obtenção de plantas transgênicas de tabaco	84
2.4- Extração de DNA genômico	85
2.5- Confirmação da inserção via PCR de DNA genômico	86
2.6- Extração do RNA total das plantas transgênicas	87
2.7- Quantificação da expressão relativa do gene <i>SISOBIR1</i> nas plantas de tabaco transgênicas	87
2.8- Seleção de eventos de transformação para experimentos posteriores	87
2.9- Inoculação das plantas transgênicas com PepYMV e análise da acumulação viral	87
2.10- Teste de ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) indireto	88
2.11- Análise do acúmulo viral de TCSV por qPCR em plantas de tabaco transgênicas	89
2.12- PCR em tempo real para verificação do nível de expressão de proteínas relacionadas à patogenicidade (<i>pathogenesis related proteins</i> – PRs) em plantas de tabaco transgênicas	91
2.13- Detecção de íons superóxido em folhas de tabaco	92
3- RESULTADOS	
3.1- Confirmação da inserção do cassete de expressão	93
3.2- Expressão do transgene nas plantas de tabaco transformadas	94
3.3- Acumulação de PepYMV nas plantas transgênicas e selvagens de tabaco	94
3.4- Acumulação do TCSV nas plantas de tabaco transgênicas	97
3.5- Análise da expressão gênica de proteínas relacionadas à patogenicidade (PRs)	98
3.6- Detecção de superóxido em folhas de tabaco	104
4- DISCUSSÃO	106
5- CONCLUSÕES	110
5- REFERÊNCIAS	111
APÊNDICE - ELABORAÇÃO DE UM CAPÍTULO DE LIVRO	126

1- INTRODUÇÃO GERAL

As plantas estão empenhadas em uma luta contínua na busca de combater seus agentes patogênicos dos quais os vírus destacam-se nesse processo. Os estudos sobre a interação vírus-planta são de particular importância, em especial pelos efeitos drásticos que os vírus podem causar na agricultura. As análises dessa interação são úteis para o conhecimento das respostas de defesa das plantas frente à infecção viral, visando entender quais são os fatores limitantes dessa infecção, e consequentemente, compreender as estratégias adotadas pelos vírus, ao longo da evolução, para sobrepor tais respostas. Na maioria das vezes, os mecanismos virais mimetizam as próprias estratégias de defesa desenvolvidas pelas plantas.

A capacidade dos vírus em viabilizar a infecção ocorre por meio de inúmeras mudanças importantes na fisiologia da planta hospedeira, incluindo alterações estruturais na célula hospedeira (Francki *et al.*, 1987; Hull, 2002; El-Hoseny *et al.*, 2010), modificações no seu ciclo celular (Oakenfull *et al.*, 2002; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004; Afrren *et al.*, 2011; Chapa-Oliver *et al.*, 2011) e a supressão do silenciamento gênico pós-transcricional (Voinnet, 2005; Mérai *et al.*, 2006; Burguán & Havelda, 2011).

Por outro lado, as plantas desenvolveram eficientes e diferenciadas estratégias de defesa que são acionadas logo após o reconhecimento do agente invasor. Dentre essas estratégias encontra-se a ativação de respostas específicas como a hipersensibilidade (HR) e a resistência sistêmica adquirida (SAR) (Vallad & Goodman, 2004; Palukaitis & Carr, 2008), que juntas são acompanhadas por alterações na expressão de genes incluindo a produção de proteínas relacionadas à patogenicidade (PRs) e várias outras proteínas envolvidas na via de sinalização da hospedeira (Cooper, 2001; Soosaar *et al.*, 2005). As plantas também desenvolveram o silenciamento por RNA como estratégia de defesa antiviral, este é capaz de reconhecer e degradar moléculas de RNA (Stange, 2006; Ding & Voinnet, 2007), bem como o sistema ubiquitina/ proteassoma 26S (UPS), descrito recentemente, o qual desempenha um papel central na degradação de proteínas (Dielen *et al.*, 2010).

A resposta de defesa inata da hospedeira é desencadeada a partir do reconhecimento do patógeno por meio dos chamados “padrões moleculares associados ao patógeno” (PAMPs). Os PAMPs são percebidos por “receptores de reconhecimento padrões (RRP)” presentes na superfície da célula vegetal. Através deles, o sinal primário é transmitido para o interior da célula ativando diversas vias de sinalização pela ação de mensageiros secundários que amplificam o referido sinal, culminando em diferentes tipos de respostas, incluindo a regulação da expressão de genes específicos (Leite *et al.*, 1997).

Dentre os RRP's presentes em plantas, os receptores de proteína tipo quinase conhecidos como RLKs (receptor-like kinase) constituem um grupo diverso de proteínas ancoradas na membrana plasmática que permitem à célula reconhecer e responder ao ambiente extracelular. Estes apresentam um domínio proteína quinase citoplasmático do tipo serina/treonina que é ativado pela ligação de um elicitor ao domínio receptor extracelular. Os RLKs são componentes importantes da via de transdução de sinais, controlando uma ampla gama de processos, incluindo respostas de defesa, já que são capazes de monitorar a presença de patógenos no apoplasto (Becraft, 2002; Goff & Ramonell, 2007).

Os RLKs de plantas podem pertencer a duas categorias funcionais diferentes. A primeira categoria inclui aqueles envolvidos no controle do crescimento e desenvolvimento da planta, e a segunda inclui os RLKs envolvidos nas interações planta-patógeno e resposta ao estresse (Becraft, 2002; Afzal *et al.*, 2008; Apfata, 2010). Pelo menos 21 domínios protéicos diferentes são encontrados nesses receptores, sendo que a maior subfamília é representada pelos RLKs dotados de um domínio de repetições ricas em leucina (LRR-RLKs) (Sun & Wang, 2011). O domínio LRR tem sido relacionado à capacidade de interação com proteínas derivadas de patógenos (Innes, 2004).

Apesar da importância dos RRP's, em especial dos LRR-RLKs, no desencadeamento da resposta inata, até o momento, nenhum receptor capaz de detectar a presença de vírus invasores foi descrito em plantas, especialmente porque os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que normalmente se propagam pelo simplasto (Tadamura *et al.*, 2012).

Alterações no padrão de expressão gênica em plantas de tomateiro infectadas por diversas viroses já foram relatadas. Em um estudo onde essas plantas foram infectadas pelo PepYMV (*Pepper yellow mosaic virus*, gênero *Potyvirus*) observou-se que um gene que codifica um LRR-RLK foi reprimido 72 horas após o processo de infecção (Alfenas-Zerbini *et al.*, 2009), sugerindo um possível envolvimento deste receptor na resposta de defesa do tomateiro. Em infecções causadas por TSWV (*Tomato spotted wilt virus*, gênero *Tospovirus*), genes relacionados à defesa e à transdução de sinal, como os envolvidos na cascata de sinalização pela proteína quinase ativada por mitógenos (MAPKKK), tiveram sua expressão aumentada (Catoni *et al.*, 2009). Em contrapartida, o padrão de expressão do gene que codifica o receptor LRR-RLK, identificado inicialmente na interação potyvírus-tomate, em resposta à infecção por um tospovírus é desconhecido. Acredita-se que uma modulação na expressão desse receptor venha a ocorrer, reafirmando assim o provável envolvimento deste receptor na resposta de defesa do tomateiro frente a essas duas infecções virais.

Em virtude da importância dos potyvírus e tospovírus, bem como a crescente necessidade de se estabelecer estratégias de combate a tais viroses, vislumbrou-se que o estudo do papel de tal receptor poderia representar um passo particularmente interessante para se entender o funcionamento da complexa rede de interação e ativação das respostas de defesa da planta hospedeira. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar molecular e funcionalmente o gene que codifica um LRR-RLK (recentemente denominado SOBIR1) em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) infectadas pelos vírus PepYMV e TCSV, com o intuito de investigar um possível papel desse receptor no desencadeamento da resposta de defesa durante a infecção por essas duas espécies virais. Para tal, visando o melhor entendimento sobre as análises realizadas, o presente trabalho foi subdividido em dois capítulos intitulados:

Capítulo 1: Caracterização molecular do receptor quinase (SOBIR1) em plantas de tomateiro infectadas com os vírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV).

Capítulo 2: Estudo funcional do gene que codifica o receptor SOBIR1 de tomate (*SISOBIR1*) empregando superexpressão em plantas de tabaco.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., anteriormente, *Lycopersicon esculentum*) pertence à família Solanaceae, sendo uma das hortaliças mais cultivadas mundialmente. Tem como centro de origem a região Andina que abrange parte do Chile, Colômbia, Equador, Bolívia e Peru, porém sua ampla domesticação ocorreu no México, conhecido como o seu centro de origem secundário (Filgueira, 2008).

O tomate foi introduzido na Europa pelos espanhóis no início do século XVI, contudo foram os italianos, por volta de 1550, os primeiros a cultivá-lo. O mesmo foi enviado pelos europeus no século XVII para a China e países do sul e sudeste asiático, chegando ao Japão e Estados Unidos por volta do século XVIII (Filgueira, 2008). No Brasil, o cultivo do tomateiro ocorreu no final do século XIX, tendo sido introduzido por imigrantes europeus. Todavia, o incremento no seu uso e na sua produção ocorreu somente após a Primeira Guerra Mundial (Alvarenga, 2004).

Segundo Filgueira (2008) o tomate é o segundo produto olerícola mais importante do mundo, tanto para o consumo *in natura*, como para a indústria de processamento, ficando atrás apenas da produção de batata. Estima-se que cerca de 4,6 milhões de hectares de tomate são cultivados anualmente no mundo gerando uma produção de mais de 126 milhões de toneladas dessa hortaliça (Panthee & Chen, 2010).

Os maiores produtores de tomate são a China, Índia e os Estados Unidos, com o Brasil ocupando o oitavo lugar no ranking de produção (FAOSTAT, 2011). Até novembro de 2013 foram plantados no país cerca de 60 mil hectares de tomate, com produção média anual estimada em aproximadamente 3,935 milhões de toneladas e rendimento médio de 65,827 kg/ha (LSPA-IBGE, 2013). A região Centro-Oeste destaca-se como a maior produtora de tomate para indústria, sendo o estado de Goiás responsável pela maior parte da produção nacional. No caso da produção para consumo *in natura*, o domínio é da região Sudeste, sendo os estados de São Paulo e Minas Gerais os maiores produtores (LSPA-IBGE, 2013).

O consumo *in natura* dos frutos do tomate frescos, em saladas ou cozidos em molhos, contribui para a obtenção de uma dieta saudável e bem equilibrada. Os frutos são ricos em minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares e fibras dietéticas. Contêm grandes quantidades de vitaminas B e C, ferro e fósforo (Naika *et al.*, 2006), possui também licopeno (antioxidante), compostos fenólicos *ligans* (precursores de fitohormônios),

betacaroteno, dentre outras substâncias, que tornam a sua ingestão regular um grande aliado na prevenção de diversos tipos de cânceres (Fontes & Silva, 2002). No caso da industrialização, estes podem ser processados em purês, molhos de tomate, 'catchup' e os frutos também podem ser enlatados e secos (Naika *et al.*, 2006). Além de apresentar grande importância econômica e nutricional, a cultura do tomate tem uma considerável influência social, devido à geração de empregos diretos no campo e nas diversas etapas da cadeia produtiva (Fontes & Silva, 2002).

Por ser uma cultura de importância mundial, bem adaptado a uma variedade de climas e principalmente contribuir economicamente para a indústria agrícola, o tomate é também utilizado como uma espécie modelo para os estudos genéticos relacionados com a qualidade dos frutos, tolerância a estresses (bióticos e abióticos) e outras características fisiológicas, existindo um abundante interesse na utilização de ferramentas genômicas para o seu melhoramento e desenvolvimento de novas variedades (Panthee & Chen, 2010).

As pesquisas genéticas com o tomate são favorecidas pelo fato dessa planta possuir o genoma diplóide com poucas duplicações, cromossomos diferenciados e fáceis de distinguir, estrutura da flor que favorece a hibridação manual, fácil micropropagação, entre outras características (Rick, 1991). Novas espécies selvagens têm sido identificadas, sendo considerada atualmente a existência de treze espécies componentes do gênero *Solanum* (Peralta *et al.*, 2005). Todas as espécies do gênero apresentam um número básico de cromossomos $n = 12$ (Aoki *et al.*, 2013)

O sequenciamento dos 12 cromossomos que compõe o genoma do tomate foi iniciado em 2003 pelo consórcio *International Solanaceae Project* (SOL, <http://solgenomics.net/solanaceae-project/index.pl>) composto por 14 países, com o objetivo de proporcionar uma base de informação possível de ser utilizada para ligar características de plantas da família *Solanaceae* a sequência de DNA. O sequenciamento foi finalizado em maio de 2012 com a publicação de todos os seus resultados (The Tomato Genome Consortium, 2012).

Neste projeto, a sequência genômica de referência do tomate cultivar 'Heinz 1706', apresentou 91 *scaffolds* (matriz para organizar a informação) que cobriram 760 megabases (Mb) do genoma e que por sua vez foram alinhados com os 12 cromossomos, com a maioria dos 'gaps' restrita a regiões pericentroméricas. Foi predita a ocorrência de 34.727 genes no genoma, dos quais, baseado nos dados de sequenciamento de RNA (RNA-Seq), 30.855 deles correspondem a genes transcritos (The Tomato Genome Consortium, 2012; Aoki *et al.*, 2013).

O sequenciamento total do genoma do tomate também revelou que o mesmo é altamente sintênico (contêm genes semelhantes e no mesmo ordenamento) com outras plantas da família *Solanaceae* de importância comercial, tais como: batata, berinjela, pimenta e tabaco (Aoki *et al.*, 2013). Além disso, 31.741 genes do tomate apresentaram alta similaridade com genes de *arabidopsis*, com a organização cromossômica, transcritos, repetições e pequenos RNAs muito similares nas duas espécies (The Tomato Genome Consortium, 2012).

Toda a gama de informações disponibilizada com o fechamento do genoma do tomate irá contribuir muito com os inúmeros estudos genéticos que utilizam essa planta como modelo. Nesse contexto, os estudos voltados para desvendar a atuação de genes nas mais variadas etapas do ciclo de vida do tomateiro, bem como nas vias de resposta de defesa da planta contra patógenos, uma vez que a cultura do tomateiro está sujeita à ocorrência de vários problemas fitossanitários em decorrência da sua alta suscetibilidade a diversos patógenos, serão largamente beneficiados.

A grande área foliar e o microclima favorável criado pela planta de tomate propiciam um ambiente ideal para o bom desenvolvimento de pragas e doenças (Naika *et al.*, 2006). Dentre as inúmeras doenças que causam problemas à cultura do tomateiro destacam-se as viroses, que são um importante fator limitante em muitos sistemas de produção, especialmente devido à falta de produtos antivirais o que tornam o seu controle dependente da resistência genética da planta, de medidas de higiene no campo e ou da erradicação da cultura doente (Hanssen *et al.*, 2010).

Dentre as principais doenças viróticas que atacam o tomateiro encontram-se as provocadas pelos begomovírus, cucumovírus, tobamovírus, com especial destaque para uma nova espécie do gênero *Potyvirus* (família *Potyviridae*) conhecida como *Pepper yellow mosaic virus* (Inoue-Nagata *et al.*, 2002) e por espécies do gênero *Tospovirus* (família *Bunyaviridae*) em especial o *Tomato chlorotic spot virus* (Pozzer *et al.*, 1996).

2.2- Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* é a maior e mais importante economicamente entre as famílias de vírus que infectam plantas (Fauquet *et al.*, 2005). Distribuída mundialmente, essa família é constituída por seis gêneros (*Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus* e *Potyvirus*) (ICTV, 2012), que diferem quanto ao tipo de vetor e organização do genoma (Berger *et al.*, 2005). Uma característica importante para a identificação de espécies pertencentes a essa família é a formação de corpos de inclusões cilíndricas no citoplasma de

células infectadas denominadas “cata-vento” (Berger *et al.*, 2005). Dentre estes gêneros, o mais numeroso é o gênero *Potyvirus* contendo 146 espécies de vírus descritas (ICTV, 2012). Devido a essa grande diversidade, os potyvírus são responsáveis por perdas significantes na agricultura (Juhász *et al.*, 2008).

Os potyvírus são transmitidos de uma planta para a outra através de inúmeras espécies de afídeos. Os afídeos adquirem o vírus ao se alimentarem em uma planta infectada, no momento da picada de prova (consiste em uma rápida inserção e retirada do estilete no tecido vegetal com o objetivo de verificar se o hospedeiro é adequado à sua alimentação). A transmissão ocorre de maneira não-circulativa, onde o vírus fica restrito ao aparelho bucal do inseto (Berger *et al.*, 2005; Juhász *et al.*, 2006). O controle químico dos afídeos vetores não é uma medida eficiente para controlar a transmissão, já que sob a ação de diversos inseticidas os insetos praticam inúmeras picadas de prova, dessa forma inoculando o vírus com maior eficiência. Além disso, existe pouca especificidade entre o vírus e o inseto vetor, dificultando a seleção de inseticidas (Berger *et al.*, 2005; Juhász *et al.*, 2006).

Estes vírus possuem partículas alongadas e flexuosas, com 680 – 900 nm de comprimento e 11 – 13 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído por uma única molécula de RNA de fita simples, senso positivo, com cerca de 10 kilobases (Kb), a qual é envolta por um capsídeo viral (Riechmann *et al.*, 1992; Shukla *et al.*, 1994), composto por cerca de 2000 cópias (Koonin *et al.*, 2008). Este RNA é poliadenilado na extremidade 3' e apresenta uma pequena proteína viral de 24 kDa, denominada VPg (viral protein genome-linked) ligada covalentemente a sua extremidade 5' (Murphy *et al.*, 1991; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). O genoma viral contém uma única ORF (open reading frame ou fase aberta de leitura) que codifica para uma poliproteína que é clivada por três proteinases virais (P1, HC-Pro e NIa) em 10 proteínas maduras (Riechmann *et al.*, 1992; Shukla *et al.*, 1994; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Essas proteínas são a partir do N-terminal da poliproteína: P1, HC-Pro (*Helper Component-Proteinase*), P3, 6K1, CI (*Cylindrical Inclusion*), 6K2, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb (*Nuclear Inclusion b*) e CP (*Capsid Protein*) (Chung *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2010) (Figura 1).

Além disso, uma pequena ORF denominada *pipo* (*pretty interesting potyvirus*), localizada dentro da região codificadora da proteína P3, foi recentemente identificada. Essa ORF é traduzida por uma mudança na fase de leitura ribossomal (frameshift) e codifica uma proteína de 25 kDa denominada P3N-PIPO. Esta proteína é traduzida como uma fusão traducional entre a porção N-terminal da proteína P3 e a suposta proteína PIPO (Chung *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2010; Rantalainen *et al.*, 2011; Vijayapalani *et al.*, 2012) (Figura 1). O material genético viral tem como local de replicação o citoplasma da célula hospedeira em

compartimentos formados a partir de membranas derivadas da própria planta (Wei & Wang, 2008).

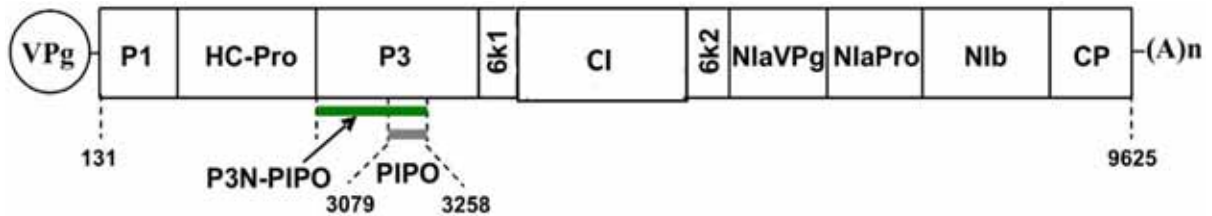


Figura 1. Representação esquemática do genoma do potyvírus *Turnip mosaic virus* conforme Wei *et al.*, (2010). Na extremidade 5' encontra-se a proteína VPg e na extremidade 3' a cauda poli (A) que é representada como (A)_n. As duas curtas linhas na horizontal presentes nas extremidades representam as regiões não codificadoras. A caixa toda representa a ORF única que codifica uma poliproteína. As proteínas maduras resultantes do processamento da poliproteína são indicadas como caixas pequenas. A ORF *pipo* (a partir dos nucleotídeos 3079-3258) derivada de um *frameshift* na região codificadora da P3 é indicada como uma barra cinza, e a proteína P3N-PIPO é mostrada em verde.

Como consequência do processamento da poliproteína derivada da tradução da única ORF, todas as proteínas virais maduras são produzidas em quantidades estequiometricamente idênticas, independente da necessidade do vírus por cada proteína em particular. As proteínas produzidas em excesso se acumulam na célula infectada na forma de inclusões. Esse modo de replicação e expressão gênica é bastante danoso para a célula infectada, implicando em um grande dreno de metabólitos, refletindo em sintomas severos na planta infectada (Zerbini & Zambolim, 1999).

As proteínas sintetizadas pelos potyvírus são multifuncionais, desempenhando várias funções durante o ciclo de infecção, que envolve a expressão do genoma, replicação, movimento célula a célula, movimento sistêmico e transmissão pelo vetor (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Uma dessas proteínas, a HC-Pro (Helper Component-Proteinase) é extremamente importante por atuar em diferentes etapas do ciclo de vida dos potyvírus (Maia *et al.*, 1996; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Ao penetrar na hospedeira (através de ferimentos ou inseto vetor) o RNA viral dissocia-se do capsídeo e é traduzido pela maquinaria celular gerando a poliproteína. Concomitantemente a esse processo ocorre a replicação do genoma viral que dará origem a novas partículas virais (vírions), as quais podem ser transportadas para outras células. Neste

caso, o vírus faz dois tipos de movimento no interior da planta, o movimento célula-a-célula (curta distância) e o movimento sistêmico (via floema). O movimento célula-a-célula é realizado através dos plasmodesmas cujo limite de exclusão é alterado, processo que envolve a interação da CI com a P3N-PIPO e o virion (Wei *et al.*, 2010; Vijayapalani *et al.*, 2012). Já no movimento sistêmico, o vírus penetra no sistema vascular da planta (floema) e segue o fluxo da rota de translocação de fotoassimilados no sentido fonte-dreno infectando toda a planta (Lucas, 2006).

No gênero *Potyvirus* o nível de identidade entre as sequências do genoma é considerado relativamente baixo nas espécies. Um estudo por meio de comparações entre as sequências da ORF completa de 187 genomas de espécies da família revelou que a maioria das espécies em um mesmo gênero possui entre 50 e 55% de identidade, podendo existir alguns grupos de espécies mais relacionadas (Adams *et al.*, 2005). O nível de identidade para a determinação de espécies no gênero *Potyvirus* foi proposto em 76% para a sequência de nucleotídeos, e 82% para a sequência de aminoácidos. A avaliação de cada gene separadamente indicou níveis de determinação de espécies (nucleotídeos) de 58% (P1) ou de 74-78% (demais genes) e o genoma completo foi mais bem representado por comparações utilizando o gene CI. No caso da proteína capsidial (CP) a análise baseada em 1.220 sequências dessa proteína indicou um valor de 76-77% de identidade de nucleotídeos para a determinação de espécies (Adams *et al.*, 2005).

2.2.1- *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV)

O *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) pertence ao gênero *Potyvirus* é o responsável pela doença conhecida como o mosaico amarelo. Foi relatado pela primeira vez no Brasil em 1980, no Estado de São Paulo e no Distrito Federal, infectando plantas de pimentão (*Capsicum annum*). O PepYMV foi inicialmente denominado de PVY^M, pois acreditava-se tratar de uma estirpe severa do PVY (*Potato virus Y*) que era capaz de quebrar a resistência de algumas cultivares a esse vírus (Boiteux *et al.*, 1996). Posteriormente, Inoue-Nagata *et al.*, (2002) caracterizaram alguns isolados de PVY^M através de técnicas moleculares e confirmaram tratar-se de uma nova espécie de potyvírus.

O mosaico amarelo causado pelo PepYMV ocorre de forma natural em campos de pimenta (Truta *et al.*, 2004), sendo altamente disseminado nas culturas de pimentão (Inoue-Nagata *et al.*, 2001), tomate (Cunha *et al.*, 2004), além de batata e fumo. A princípio, as grandes perdas econômicas foram verificadas nas regiões Centro-Oeste e Sudeste,

predominantemente na cultura do pimentão (Maciel-Zambolim *et al.*, 2004), sendo o vírus posteriormente detectado na cultura do tomateiro. Nessas culturas, a transmissão do PepYMV ocorreu por duas espécies de afídeos: *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* (Gioria *et al.*, 2009).

O primeiro surto epidemiológico desse vírus em tomateiro foi registrado em 2002 em alguns plantios comerciais do híbrido 'Alambra', no Município de Venda Nova do Imigrante, Estado do Espírito Santo. Os levantamentos realizados em campos de cultivo demonstraram uma disseminação muito rápida desse vírus, causando perdas de 40 a 100% na cultura. A ocorrência desses fatores foi atribuída à elevada quantidade de afídeos vetores presentes em plantas daninhas não controladas durante o manejo da cultura; a realização de plantios escalonados de tomate em áreas de cultivo vizinhas e concentradas em uma mesma época; e ao plantio de híbridos suscetíveis (Maciel-Zambolim *et al.*, 2004; Ávila *et al.*, 2004).

Outros surtos epidemiológicos do PepYMV foram detectados em diversos estados brasileiros com destaque para o estado de São Paulo, nos municípios de Guapiara e Apiaí, onde se verificou a incidência de 50% de plantas com sintomas (Palazzo *et al.*, 2004); e no Distrito Federal onde um levantamento realizado em campos de produção revelou que 82,5% de 54 amostras coletadas estavam infectadas (Dianese *et al.*, 2008).

No tomateiro, os sintomas provocados pelo PepYMV incluem: mosaico amarelo, clareamento de nervuras, pontuações, distorção foliar, definhamento das plantas e redução da produção de frutos (Cunha *et al.*, 2004; Maciel-Zambolim *et al.*, 2004; Kurozawa *et al.*, 2005; Lourenção *et al.*, 2005).

Cabe ressaltar que os nichos que antigamente eram ocupados por isolados de PVY agora estão sendo ocupados por isolados de PepYMV (Lourenção *et al.*, 2005). A alta incidência desse vírus em tomateiro revela que os materiais comerciais de tomate utilizados são aparentemente todos suscetíveis ao vírus (Dianese *et al.*, 2008). Dessa forma, para impedir que essa doença se instale nas lavouras causando grandes prejuízos aos produtores, a resistência genética é considerada o único meio seguro de controle.

Os programas de melhoramento têm buscado fontes de resistência dentro de bancos de germoplasma de *Capsicum spp.* A resistência ao PepYMV em *Capsicum spp.* tem sido eficaz e duradoura sob inoculação artificial no campo. Cultivares de pimentão (*Capsicum annuum*) consideradas padrão de resistência ao vírus já estão disponíveis no mercado tais como o 'Magali R', 'Acuario', 'Nathalie', 'Myr-10', 'Myr-29', 'Bruna R', 'Dahra R', 'Rubia R' e o acesso mexicano CM-334 (resistência ao alelo *Pvr4*) (Echer & Costa, 2002). No caso do tomateiro, os genes de resistência a vírus empregados no melhoramento genético têm, em sua maioria, sido transferidos via cruzamentos com espécies silvestres, sendo as fontes de

resistência identificadas no gênero *Solanum* spp, principalmente em *S. peruvianum*, *S. pimpinellifolium*, *S. chilense* e *S. habrochaites* f. *glabratum* (anterior *L. hirsutum*) (Leite, 2004).

Recentemente, o genoma completo do PepYMV foi sequenciado a partir do isolado Poty2 coletado de plantas de pimentão cultivar 'Magali' no Distrito Federal. A análise do genoma mostrou uma organização típica de um potyvírus, com a codificação de uma poliproteína contendo a sequência de 10 peptídeos maduros e a ORF PIPO. A análise filogenética agrupou o PepYMV no subgrupo do PVY contendo maior identidade 63,84% com o PepMoV (*Pepper mottle virus*) e 62,11% com o VVY (*Verbena virus* Y), de acordo como a maioria dos potyvírus isolados em solanáceas na América do Sul (Lucinda *et al.*, 2012).

2.3- Família *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae* é constituída por cinco gêneros (*Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus* e *Tospovirus*) incluindo alguns dos mais importantes patógenos de seres humanos, outros mamíferos e vegetais. Os membros desta família são classificados de acordo com uma combinação de características, tais como: hospedeiros (vertebrados, artrópodes ou plantas), reações sorológicas cruzadas com outros membros, e identidade das sequências das proteínas virais, principalmente da proteína do nucleocapsídeo (N) (Fauquet *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2011).

O gênero *Tospovirus* é composto por viroses que infectam somente plantas (Griot *et al.*, 1993; Zeller & Bouloy, 2000) sendo responsável por causar perdas significativas em diferentes culturas (Adkins *et al.*, 2005). No Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, 2012) o gênero é composto por oito espécies.

A denominação do gênero *Tospovirus* surgiu a partir do nome de seu primeiro membro o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). A doença associada, denominada de vira-cabeça do tomateiro, foi observada inicialmente na Austrália em 1915. O agente causal, designado TSWV, foi considerado o único membro desse grupo de virose de plantas até o início de 1990. Após esse período deu-se a identificação e caracterização de diversos outros membros do gênero (Adkins *et al.*, 2005).

Os sintomas causados pela infecção por tospovírus variam. Na hospedeira não sistêmica, os sintomas se restringem a lesões locais, clorose e necrose. No caso de hospedeira sistêmica são observados sintomas de paralisação do crescimento, arroxamento ou

bronzamento das folhas, manchas em forma de anéis concêntricos, deformação foliar severa, clorose, mosqueado e necrose intensa. Plantas com sintomas típicos podem produzir frutos aparentemente sadios, contudo de menor tamanho. Os frutos não maduros atacados desenvolvem sintomas de estrias e anéis necróticos irregulares. Já os maduros apresentam anéis concêntricos (Lopes & De Ávila, 2005).

Estes sintomas variam de acordo com o vírus, o número de isolados infectando a hospedeira, a idade da planta, cultivar, época do ano, meio ambiente e principalmente temperatura (German *et al.*, 1992; Lopes & De Ávila, 2005).

Dentre as hospedeiras dos tospovírus encontram-se tomate, batata, tabaco, amendoim, pimenta, alface, mamão, e as plantas ornamentais crisântemo, begônia, ageratum e impatiens. Em várias regiões mundiais de plantio do tomateiro, os tospovírus são considerados importantes agentes fitopatogênicos nas épocas mais quentes do ano (German *et al.*, 1992).

Os tospovírus são transmitidos de planta para planta por insetos da ordem Thysanoptera (tripes) (Mound, 1996) pertencentes aos gêneros *Frankliniella*, *Thrips* e *Scirtothrips*. Estes têm sido relacionados como vetores de dez espécies virais (Mound, 1996; Lourenção *et al.*, 2005). A transmissão ocorre de maneira circulativa e propagativa (Mound, 1996). A associação de insetos vetores com o vírus, como é o caso do tripses / tospovírus é muito específica, com apenas algumas das muitas espécies de tripses conhecidos sendo capazes de adquirir e transmitir o vírus. No caso de TSWV, por exemplo, o inseto só pode transmitir o vírus se for adquirido durante a fase larval. Os tospovírus também podem ser transmitidos mecanicamente (German *et al.*, 1992), não existindo relatos de transmissão pelas sementes (Adkins *et al.*, 2005).

O controle dos tospovírus é difícil, em parte pela sua ampla gama de hospedeiras, mas também pela resistência dos tripses aos inseticidas e pela falta de resistência das culturas hospedeiras. Como medidas de controle fitossanitárias adotadas destacam-se a resistência cultural, medidas químicas e de controle biológico que precisam ser baseadas em princípios epidemiológico tais como, fontes internas e externas de inóculo, as fases precoces ou tardias de disseminação do vírus e as fases vulneráveis do vírus, vetor e ciclo da cultura (Jones, 2005; Mandal *et al.*, 2012).

Os tospovírus apresentam partículas virais pleomórficas com 80-120 nm de tamanho que possuem projeções de superfície composta por duas glicoproteínas virais. Seu genoma é constituído por RNA fita simples (ssRNA) polaridade negativa ou ambisenso envelopado, sendo caracterizado pela presença de três RNAs genômicos denominados de

pequeno (S), médio (M) e grande (L) (Adkins *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2011) (Figura 2). O componente L é senso negativo e contém uma grande matriz aberta de leitura (ORF) que codifica uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP). Os componentes M e S são ambisenso. O componente M abriga os genes das proteínas NSm (proteína de movimento responsável pelo transporte célula-a-célula) e precursores das glicoproteínas Gc e Gn. Já o componente S codifica a proteína NSs (supressora do silenciamento gênico) e a proteína N que forma o nucleocapsídeo viral e está envolvida na regulação da transcrição e replicação (Li *et al.*, 2009; Pappu *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2011; Briesse *et al.*, 2013) (Figura 2).

As moléculas de RNA genômico têm terminais 5' e 3' complementares (AGAGCAAU na extremidade 5' e UCUCGUUA na extremidade 3') e podem assumir uma estrutura pseudocircular ou “*panhandle*”. Ambos os RNAs S e M possuem uma região intergênica com um elevado conteúdo de adenina (A) e uracila (U) que são capazes de formar uma estrutura em forma de grampo (hairpin) estável (Dong *et al.*, 2008).

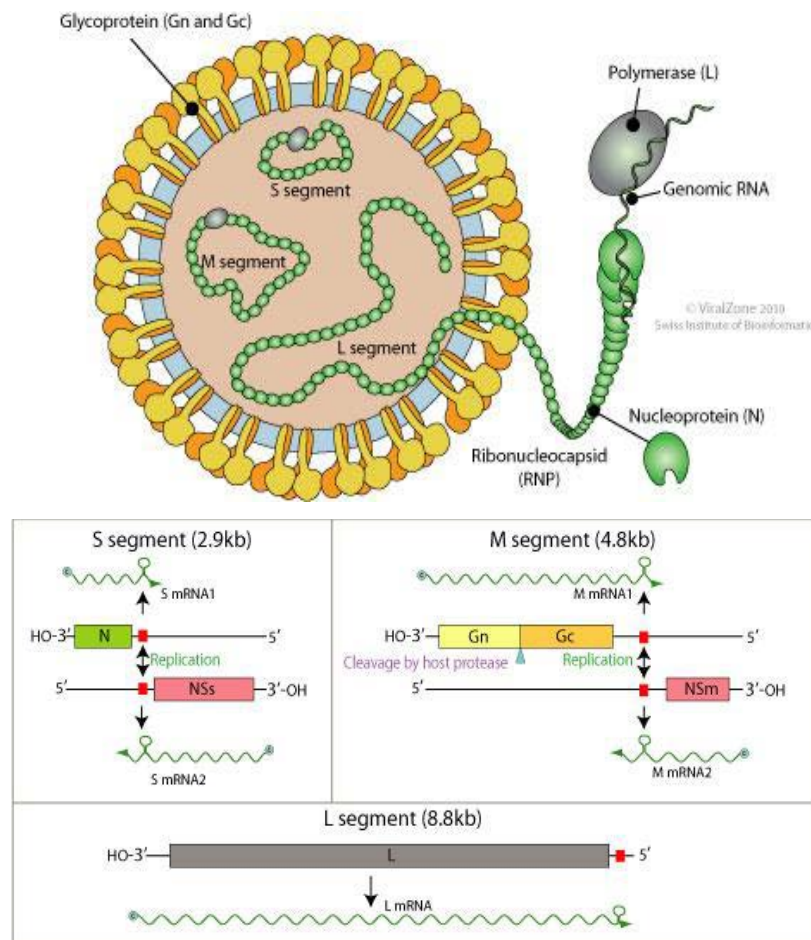


Figura 2. Ilustração esquemática da partícula de um tospovírus (TSWV) e sua organização genômica. Quatro são as proteínas estruturais virais: as glicoproteínas Gn e Gc (em amarelo e laranja) formando o dímero e inseridas no envelope da partícula; a proteína N (em verde) ancorada nos RNAs virais e a proteína L (em cinza), também associada aos RNAs virais. Essas duas últimas formam os complexos ribonucleotprotéicos também conhecidos como ribonucleocapsídeos (RNP). Os RNAs virais, de acordo com o seu tamanho são classificados em S (*small* – pequeno), M (*medium* – médio) e L (*large* – grande). Fonte da ilustração: expasy.com/ViralZone2010 Swiss Institute of Bioinformatics.

Ao entrar na célula, o vírus é liberado da sua membrana, provavelmente pela fusão de vesículas membranosas, com os nucleocapsídeos infecciosos sendo liberados no citoplasma. Nesta fase o RNA viral será transcrito ou replicado. A mudança da transcrição para o processo de replicação viral é controlada pela concentração da proteína N livre no citoplasma como já observado no ciclo infeccioso de outras viroses de RNA de fita negativa. No início da infecção, devido às baixas concentrações da proteína N, a enzima replicase produz RNAs mensageiros que serão traduzidos e acumularam diversas proteínas virais. À

medida que a concentração da proteína N aumenta, a polimerase muda o foco para o processo replicativo, passando a replicar os RNAs genômicos virais (Prins & Goldbach, 1998).

Quando comparada com outras proteínas dos tospovírus, a proteína do nucleocapsídeo N é muito conservada apresentando funções quase idênticas em todos os membros do gênero, fato que sugere a existência de pressões seletivas semelhantes. Trata-se de uma proteína multifuncional requerida em vários processos tais como a encapsidação do RNA viral, na regulação da mudança da maquinaria replicativa da transcrição para a replicação do genoma viral e RNA antigenômico (Dewey *et al.*, 1997). Múltiplos domínios de ligação ao RNA, que se encontram dentro da proteína, têm sido caracterizados (Richmond *et al.*, 1998). Ribeiro e colaboradores (2008) mostraram que a proteína N interage com as proteínas Gn e Gc, facilitando a formação de partículas virais maduras e envelopadas demonstrando assim o papel primário dessa proteína na encapsidação.

O genoma dos tospovírus está sujeito a mutações pelo fato de ser constituído por três segmentos de RNA que não estão sujeitos a um mecanismo de reparo (*proof-reading*) durante a replicação viral, o que pode aumentar as taxas de mutação (Roossinck, 1997). Assim, o surgimento de novos isolados capazes de sobrepujar genes de resistência estabelecidos é relativamente comum dentro de uma dada espécie (Herrero *et al.*, 2000).

As perdas econômicas provocadas pelos tospovírus em diversas áreas de produção agrícola mundial levaram a pesquisas sobre resistência genética relacionadas com o manejo dessa doença. Dessas as realizadas com o único gene dominante de resistência Sw-5 de *Solanum peruvianum* é uma das mais promissoras. O gene Sw-5 introgridido na cultivar de tomate Stevens mostrou fornecer resistência não somente ao TSWV mas também a dois outros tospovírus GRSV e TCSV que infectam tomateiro (Folkertsma *et al.*, 1999).

Com uma distribuição mundial ampla, algumas espécies de tospovírus como TSWV, *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) e *Iris yellow spot virus* (IYSV) são encontradas nos cinco continentes (Pappu *et al.*, 2009).

2.3.1- *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV)

As tospoviroses constituem doenças de grande relevância econômica no Brasil, especialmente nas culturas da pimenta, pimentão e tomate. Em 1940 a presença de TSWV, espécie tipo do gênero, foi relatada em diversas culturas brasileiras. Após algumas décadas, entretanto, novas espécies foram identificadas, destacando-se: *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ring spot virus* (GRSV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Iris*

yellow spot virus (IYSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) (Bezerra *et al.*, 1999).

O TCSV foi descrito na América do Sul infectando diferentes espécies vegetais (De Ávila *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 1995) tendo sido recentemente encontrado em campos de cultivo de tomate na Flórida, como um isolado natural formado por rearranjos de TCSV com GRSV (S e L RNA pertencentes ao GRSV, e M RNA pertencente ao TCSV (Webster *et al.*, 2011, Londoño *et al.*, 2012).

As principais espécies que infectam tomateiro na América do Sul são o TSWV, TCSV, GRSV e CSNV, estando elas disseminadas por todas as regiões produtoras do Brasil (Giordano *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001). De modo geral, as regiões neotropicais são consideradas um provável centro de origem dessas quatro espécies virais (Fauquet *et al.*, 2005).

Apesar de GRSV, TCSV e TSWV serem três espécies geneticamente distintas com base nas sequências do gene N (De Ávila *et al.*, 1993), estes vírus produzem sintomas semelhantes e muitas vezes visualmente indistinguíveis em plantas de tomateiro na América do Sul (Williams *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2011).

Nas condições brasileiras, um levantamento da ocorrência de isolados de tospovírus em diferentes estados revelou a predominância da espécie TCSV, bem como de GRSV, nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Nagata *et al.*, 1995). O TCSV é considerado o principal tospovírus no estado de São Paulo prejudicando a produção de diversas culturas (Colariccio *et al.*, 2001). Colariccio e colaboradores em 2004, utilizando identificação sorológica e caracterização molecular de dois isolados de TCSV, relataram a infecção de plantas de alface (cv. Verônica) cultivadas em sistema hidropônico nos municípios de Campinas e Sumaré. Por outro lado, um isolado do TCSV de jiló, oriundo do Vale do Paraíba, uma das principais regiões produtoras desta hortaliça no estado de São Paulo, foi detectado, identificado e caracterizado (Eiras *et al.*, 2002).

2.4- Respostas das plantas aos patógenos

Por serem atacadas por diversos inimigos potenciais (vírus, bactérias, fungos, insetos) ou por agentes não biológicos (radiação, temperaturas extremas, poluição, dentre outros), as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de resposta a tais danos, que são acionados assim que a agressão é reconhecida.

O sistema de defesa vegetal é multicomponente e age de maneira dinâmica e coordenada, no momento e local apropriados, e com a magnitude adequada (Pascholati & Leite, 1995). Toda a complexidade funcional, espacial e temporal tem início com o reconhecimento pela planta hospedeira de sinais exógenos derivados do patógeno (os mencionados PAMPs), prosseguindo com os mecanismos de transdução desses sinais e resultando em uma extensa reprogramação do metabolismo celular vegetal, envolvendo mudanças na atividade gênica (Walters *et al.*, 2007).

Para restringir a infecção ou colonização pelos patógenos, as plantas desenvolveram diferentes barreiras, de natureza estrutural e bioquímica, que são parte integrante dos mecanismos de defesa pré e pós-formados. Os mecanismos estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno, enquanto que os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos da hospedeira. Os últimos devem estar presentes em concentrações adequadas nas partes invadidas e em forma acessível ao patógeno, de tal maneira que mudanças na concentração da(s) substância(s) impliquem em mudanças na expressão da doença (Schwan-Estrada *et al.*, 2008).

A resistência da hospedeira a um fitopatógeno, sob o aspecto fisiológico, pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (Goodman *et al.*, 1986).

Nos mecanismos de resistência bioquímicos pré-formados (devido à ausência de um precursor remoto) as substâncias estão presentes em altas concentrações nos tecidos sadios da planta, antes do contato com o fitopatógeno, ou convertem-se em substâncias altamente tóxicas com o início da infecção. No caso dos mecanismos pós-formados, as substâncias encontram-se ausentes ou em níveis muito baixos antes da infecção, sendo ativadas em resposta à presença do agente patogênico ou produzidas a partir de um precursor remoto (Garcion *et al.*, 2007).

Os mecanismos de resistência conhecidos como pré-formados, passivos ou constitutivos, são barreiras estruturais/físicas já existentes antes do contato com o fitopatógeno, que visam conter a agressão. Estas são normalmente representadas por ceras, cutícula, tricomas, parede celular espessa, bem como substâncias químicas pré-formadas como fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênico, fototoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (Agrios, 2005; Schwan-Estrada *et al.*, 2008; Stangarlin *et al.*, 2011).

Por outro lado, os mecanismos pós-formados, ativos ou induzíveis, isto é, que são ativados ou aumentam o nível de compostos pré-existentes após a infecção, estão envolvidos na formação de barreiras estruturais como papila, halo, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses e deposição de goma, e acumulação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGP) e glicina (GRP). Já os compostos constituintes dos mecanismos bioquímicos pós-formados são fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e as proteínas relacionadas à patogenicidade (PRs) (Agrios, 2005; Schwan-Estrada *et al.*, 2008; Stangarlin *et al.*, 2011).

Para penetrar nas plantas hospedeiras, os vírus precisam inicialmente superar essa série de barreiras físicas e químicas pré-existentes. Um exemplo disso é a calose, uma [1,3]- β -D- glucana que é depositada entre a membrana plasmática e a parede celular como parte da resposta HR que regula o tamanho do limite de exclusão do plasmodesma, interferindo com a movimentação viral (Iglesias & Meins Jr., 2000). Em um estudo realizado com a combinação de várias plantas hospedeiras e viroses (*Nicotiana glutinosa* - *Tobacco mosaic virus*; tabaco cultivar 'Samsun NN' e feijão 'Pinto' - *Tobacco mosaic virus* e *Tobacco necrosis virus* e feijão 'Pinto' - *Cowpea mosaic virus*) observou-se que a deposição de calose pode ser detectada antes mesmo da formação da lesão local (Shimomura & Dijkstra, 1975).

A lignina e seus precursores também funcionam como barreira, impedindo a penetração viral não somente no local primário da infecção, mas também na proteção sistêmica. Isso ocorre através da inibição da translocação do vírus nas células vizinhas, o que restringe assim o aumento da lesão (Ouchi, 1983).

2.4.1- Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

A infecção por patógenos induz uma série de respostas de defesa dentre as quais um colapso localizado das células vegetais conhecido como reação de HR. Nessa reação há a produção de intermediários reativos de oxigênio, conhecidos como 'Espécies Reativas de Oxigênio' (EROS), incluindo o O_2^- , H_2O_2 e OH (Resende *et al.*, 2003), que posteriormente irão promover o estabelecimento gradual da resistência sistêmica adquirida (SAR)(Alvarez *et al.*, 1998).

O termo espécies reativas de oxigênio (EROS) ou *reactive oxygen species* (ROS) são expressões utilizadas para descrever uma variedade de moléculas e radicais livres, derivadas do oxigênio molecular (O_2), que embora não possuam elétrons desemparelhados são muito reativas, devido a sua instabilidade (Ribeiro *et al.*, 2005).

Nas plantas, várias perturbações ambientais, como por exemplo, alta intensidade de luz, salinidade, seca, calor, frio, ferimentos, ozônio (O_3), herbicidas, metais pesados, infecção por patógenos, poluentes atmosféricos e toxinas fotossensibilizantes induzem os eventos oxidativos também conhecidos como explosão oxidativa que culminam na produção excessiva de diferentes EROS tais como: superóxidos, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, radicais peróxidos, radicais alcoxi e oxigênio singlet (Mittler, 2002; Bhattacharjee, 2005; Vellosillo *et al.*, 2010).

As EROS são subprodutos normais de diversas vias metabólicas nas plantas, sendo produzidas sob condições de estresse em vários compartimentos celulares, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas, retículo endoplasmático (ER) e membranas plasmáticas (Mittler, 2002; Navrot *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2010; Karuppanapandian *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012). Estima-se que cerca de 1-2% de O_2 consumido pelas plantas é desviado para a produção de EROS (Karuppanapandian *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012).

As EROS desempenham um papel importante na sinalização em vários processos adaptativos. As plantas podem perceber, transduzir e traduzir sinais de EROS em respostas celulares apropriadas com a ajuda de algumas proteínas sensíveis a redox. Neste contexto, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode agir como uma molécula de sinalização e mensageiro secundário frente a estresses bióticos e abióticos. O H_2O_2 é apontado como um fator chave mediador da morte celular programada (Bhattacharjee, 2005, Wang *et al.*, 2013). Além disso, H_2O_2 pode induzir a expressão gênica e modular proteínas de sinalização, tais como proteínas fosfatases (PP), proteínas quinases (PK), fatores de transcrição e de canais de cálcio que estão localizados na membrana plasmática ou em outros compartimentos celulares (Lin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

Geralmente os níveis de EROS são baixos nas células vegetais, mas sua produção é aumentada em resposta a estresses bióticos, em infecções por organismos vivos ou em processos fotooxidativos decorrentes de estresses não biológicos (Barros *et al.*, 2010). As EROS possuem um papel duplo nas plantas, podendo beneficiá-las ou prejudicá-las dependendo da sua concentração. Em alta concentração, as EROS causam danos a biomoléculas, enquanto que em concentração baixa e ou moderada, elas atuam como mensageiros secundários nas cascatas de sinalização intracelular que medeiam várias respostas celulares das plantas (Sharma *et al.*, 2012).

As EROS podem atuar de diferentes maneiras durante a resposta de resistência das plantas tais como: a) diretamente sobre o patógeno, inibindo seu desenvolvimento; b) fortalecendo a parede celular por favorecer a formação de ligações cruzadas com proteínas

estruturais; c) promovendo a peroxidação de lipídeos da membrana plasmática, fortalecendo assim a sua integridade devido à redução da sua fluidez; d) quando transportado através da membrana, o peróxido de hidrogênio pode regular a expressão de genes requeridos para a ativação da resistência ou pode induzir a formação de ácido jasmônico, um mensageiro secundário, a partir da atividade da enzima lipídio hidroperoxidase presente na membrana plasmática (Stangarlin *et al.*, 2011).

Em sistemas biológicos, devido a sua rápida destruição e detoxificação (“scavenging”) por mecanismos antioxidantes celulares, a detecção e quantificação das espécies reativas de oxigênio é bastante complicada. Por serem moléculas altamente reativas e extremamente instáveis, a detecção das EROS baseia-se na medição dos produtos finais formados quando da reação das mesmas com substâncias específicas. O superóxido e o peróxido de hidrogênio têm sido tradicionalmente detectados por técnicas de coloração. Ânion superóxido pode ser detectado empregando tetrazólio nitroblue (NBT) e o peróxido de hidrogênio por coloração de diaminobenzidina (DAB) (Lee *et al.*, 2002; Jambunathan, 2010).

O apurado equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROS é garantido por uma grande rede de genes que inclui mais de 152 genes em arabisopsis, e cujos produtos regulam firmemente a produção, destruição e detoxificação (“scavenging”) das EROS (Mittler *et al.*, 2004; Karuppanapandian *et al.*, 2011). Esse aspecto permite a mencionada dualidade funcional das espécies reativas em plantas.

No mecanismo de detoxificação celular, a ação combinada dos sistemas enzimáticos e não enzimáticos é de suma importância para evitar danos oxidativos celulares prejudiciais aos organismos vivos submetidos a variadas condições de estresses. No interior das células, o sistema enzimático é formado por enzimas capazes de remover, neutralizar ou limpar as espécies reativas de oxigênio (Scandalios, 1993). As principais enzimas de remoção de EROS incluem a superóxido dismutase (SOD), a peroxidase de ascorbato (APX), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPX) e a peroxiredoxina (PrxR), em conjunto com os antioxidantes ácido ascórbico e glutathione (Mittler *et al.*, 2004).

2.4.2- Proteínas relacionadas à patogenicidade (PRs)

As proteínas relacionadas à patogenicidade (*pathogenesis related proteins* – PRs) são proteínas de defesa da planta que são induzidas em resposta à infecção por um patógeno ou por estímulos abióticos, podendo estar correlacionadas com a resistência não específica do hospedeiro ao patógeno (Van Loon, 1997; Stangarlin *et al.*, 2011).

As PRs foram descritas pela primeira vez no início da década de 70 por Van Loon em folhas de fumo. Este autor observou o acúmulo de proteínas incomuns após a infecção de plantas com o *Tobacco mosaic virus* (TMV), as quais exibiram reação de hipersensibilidade (Durrant & Dong, 2004; Pinto *et al.*, 2011; Stangarlin *et al.*, 2011).

Em infecções por vírus, durante a defesa ativa, são expressas informações para contra-atacar a multiplicação e/ou dispersão do vírus. Com frequência, a resposta ativa toma a forma de uma reação hipersensível, onde o vírus é contido em uma mancha circular no tecido ao redor da lesão necrótica no sítio no qual ele penetrou. Essa reação não é específica, de maneira que as lesões necróticas similares são formadas após a infecção por fungos e também bactérias (Scherer, 2002).

As PRs não só se acumulam localmente na folha infectada, mas também podem se acumular em locais distantes desse local, sendo induzidas sistemicamente e associadas com o desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida (SAR) (Van Loon & Van Strien, 1999). A SAR é igualmente um fenômeno que gera um aumento da capacidade de defesa das plantas, após a infecção inicial podendo proporcionar resistência à infecção secundária, a uma vasta gama de patógenos por dias (Palukaitis *et al.*, 2008).

A princípio, as PRs foram definidas como proteínas ácidas, resistentes a proteases e posteriormente também foram identificadas proteínas básicas. Em fumo, as proteínas intracelulares (localizadas nos vacúolos) são principalmente básicas e são constitutivamente expressas em altos níveis nas raízes, enquanto as formas ácidas são geralmente extracelulares. As PRs encontradas no espaço extracelular estão diretamente em contato com o patógeno penetrando o tecido, enquanto que aquelas presentes nos vacúolos exercem provavelmente um efeito na reação de defesa após a descompartimentalização das células (Sticher *et al.*, 1997). Nas plantas elas são encontradas na epiderme das folhas, mesófilos, células-guarda de estômatos, vasos condutores e em zonas de abscisão (Van Loon *et al.*, 2006).

As PRs possuem propriedades físico-químicas típicas que as distinguem das demais proteínas encontradas nas plantas, tais como: são estáveis em pH baixos, em torno de 2,8; mostram-se resistentes a ação de enzimas proteolíticas; normalmente apresentam-se como monômeros com massa molecular variando entre 5 e 8 kDa; são estáveis sob altas temperaturas (em torno de 60 -70 °C); dentre outras (Stangarlin *et al.*, 2011).

Na plantas, as PRs parecem integrar a primeira linha de defesa devido a sua rápida indução e acumulação após a infecção (Whalen, 2005). Atualmente essas proteínas são classificadas em 17 famílias. De acordo Van Loon e colaboradores (1994) essa classificação

deve ser feita com base na similaridade das sequências de aminoácidos, relação sorológica e atividade enzimática ou biológica.

Na resistência de plantas contra agentes patogênicos, o papel das PRs pode ser direto ou indireto. Na ação direta, a inibição do crescimento do patógeno ou da germinação de esporos, representa uma condição simplificada da defesa das plantas contra a entrada de agentes patogênicos. Consequentemente, muitas PRs apresentam atividade antimicrobiana *in vitro*. Isoformas básicas geralmente exercem maior atividade antifúngica e apresentam uma reduzida ação contra bactérias, insetos, nematóides ou vírus. Por outro lado, a maioria das PRs de ação indireta desempenha papel importante no processo de indução de resistência. Dentre as funções relacionadas destaca-se: ação preventiva contra a penetração de patógenos, modulação oxidativa de componentes da parede celular (peroxidases PR-9), ou envolvimento na transdução de sinais durante a interação do patógeno com a planta hospedeira, como é o caso da ação das oxalato oxidases (PR-15) e de proteínas não específicas relacionadas com o transporte de lipídeos (PR-14) (Van Loon *et al.*, 1994; Van Loon *et al.*, 2006; Stangarlin *et al.*, 2011).

A atividade enzimática como mecanismos de ação está associada a um pequeno número de famílias de PRs tais como glucanases (PR-2), quitinases (PR-3, PR-8 e PR-11), peroxidases (PR-9), ribonucleases (PR-10 e PR-4), endoproteínase (PR-7) e a ação inibitória pela atividade de inibidores enzimáticos (PR-6). A atividade inibitória de proteases e α -amilases é atribuída às famílias PR-5, PR-12 e PR-14 (Van Loon *et al.*, 1994; Van Loon *et al.*, 2006; Stangarlin *et al.*, 2011).

Os mecanismos de ação das PRs são baseados em atividades hidrolíticas sobre a parede celular, toxicidade direta, permeabilização da membrana plasmática, sinalização no processo de defesa ou inibição, como por exemplo, de enzimas do trato digestório de insetos. Nesse contexto, quitinases (PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11) e glucanases (PR-2) têm ação direta sobre os componentes 1,3- β -glucano e quitina da parede celular de fungos, enquanto que PR-5, PR-12, PR-13 e PR-14 interferem com a membrana plasmática. A ação antimicrobiana direta por meio da permeabilização da membrana parece estar relacionada a PRs de natureza básica com α -hélice anfipática, permitindo a ligação destas a membrana e posterior inclusão na bicamada lipídica (Van Loon *et al.*, 1994; Van Loon *et al.*, 2006; Stangarlin *et al.*, 2011).

Proteínas e glicoproteínas associadas a matriz extracelular envolvidas em diversos processos que incluem a germinação, o desenvolvimento da planta e as respostas a agentes agressores de origem biótica e abiótica fazem parte das famílias de PR-15 e PR-16. Por outro lado, a família PR-17 apresenta membros que são induzidos por patógenos, e na sua maioria

relacionados com a resistência da planta hospedeira. Estes é o caso, por exemplo, das proteínas de cevada HvPR-17a e HvPR-17b, que se acumulam somente em tecidos infectados pelo fungo *Brumeria graminis* (Christensen *et al.*, 2002). Por sua vez, a HvPR-17a foi detectada em plantas resistentes e suscetíveis infectadas com afídeos (Stangarlin *et al.*, 2011).

A única família de PRs cuja atividade biológica permanece desconhecida compreende as proteínas PR-1. Membros específicos dessa família presentes em tabaco e tomate apresentaram atividade antifúngica, porém não se conhece seu mecanismo de ação (Van Loon & Van Strien, 1999). Muitas vezes as proteínas PR-1 são utilizadas como marcadores do aumentado estado de defesa conferido pela SAR induzida por patógeno (Van Loon *et al.*, 2006).

2.4.3- Receptores de proteínas quinase em plantas

Os receptores de proteína quinase, também conhecidos como receptores quinases (RPK) constituem-se de diversos grupos de proteína que atravessam a membrana plasmática e permitem que as células reconheçam e respondam a diversos estímulos do ambiente extracelular (Becraft, 1998; Becraft, 2002).

Os RPKs podem ser divididos em três classes de acordo com as diferentes especificidades de substratos protéicos dos seus domínios quinase. A primeira classe corresponde aos receptores tirosina-quinase (RTK) que estão implicados na fosforilação de resíduos de tirosina. Na segunda classe são encontrados os receptores serina/treonina quinases (STK) que fosforilam os aminoácidos serina e treonina, enquanto que na terceira subclasse estão agrupados os chamados receptores histidina-quinase (RHK) que fosforilam resíduos de histidina (Becraft, 2002). Nas plantas são encontrados receptores do tipo RHK, e em maior quantidade, receptores serina/treonina quinases (RSTK) (Afzal *et al.*, 2008) (Figura 3).

Entre os receptores serina/treonina quinases presentes em plantas encontram-se os RLKs (*receptor-like kinases*) que compõe a família RLK/*Pelle* (Figura 3). Essa família apresenta cerca de 600 representantes em *arabidopsis* e mais de 1000 em arroz (Krupa *et al.*, 2006) e tem como protótipo uma proteína de membrana dotada de um domínio extracelular altamente divergente, com uma única passagem transmembrana em forma de hélice e um domínio quinase citoplasmático do tipo serina/treonina (Walker, 1994; Shiu & Bleecher, 2001; Afzal *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). Estes receptores participam de uma ampla gama de processos, incluindo regulação do desenvolvimento, resistência a doenças, percepção de hormônios e autoincompatibilidade (Shiu & Bleecher, 2001).

A família RLK/*Pelle* pode ser subdividida em pelo menos 50 subfamílias, dado que revela a sua alta diversidade e complexidade. Dois terços dos membros dessa família são receptores quinases transmembrana (Shiu & Bleecker 2003), sendo os demais divididos entre receptores não quinases, receptores quinases citoplasmáticos e as proteínas tipo receptores (RLP) (Figura 3). As RLPs são estruturalmente semelhantes aos RLKs quanto aos domínios extracelulares, porém são desprovidas do domínio quinase interno e devido a isso, proteínas que contêm tal domínio devem ser recrutadas antecipadamente para ativar a sinalização *downstream* (Afzal *et al.*, 2008; Chaparro-Garcia *et al.*, 2011; Liebrand *et al.*, 2013a). As RLPs estão geralmente envolvidas em respostas de defesa, tais como as proteínas Cf e Ve1, bem como no desenvolvimento (Shiu & Bleecker, 2001; Wang *et al.*, 2010).

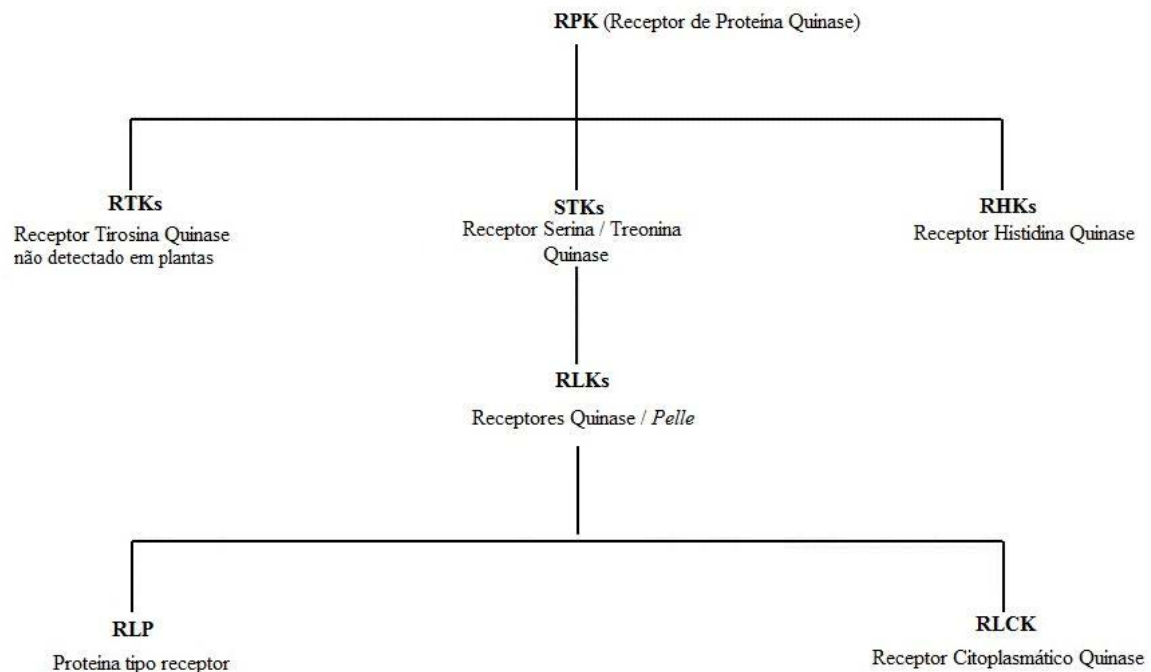


Figura 3. Esquema de classificação para receptores de proteínas quinase (RPK) envolvidos no desenvolvimento da planta e resistência a doenças modificado de Afzal *et al.*, 2008. RPKs podem ser divididos em três subclasses principais de acordo com diferentes especificidades de substrato do domínio quinase. Os receptores tirosina-quinase (RTK) que fosforilam resíduos de tirosina, serina / treonina quinases (STKS) fosforilam serina e treoninas e histidina quinases fosforilam resíduos de histidina (RHKS). Receptores STKS caem em uma ampla família conhecida como o receptor quinase (RLK) / família *Pelle*. Os RLKs podem ser subdivididos em RLCKs (receptores quinase citoplasmáticos) e RLP (proteína tipo receptor).

Conhecimentos adquiridos sobre o funcionamento de tais receptores sustentam que o receptor percebe sinais mediante seu domínio extracelular e o propaga através do

domínio quinase intracelular (Shiu & Bleeker, 2001). Os receptores RLKs encontram-se na membrana como monômeros inativos. A interação com o ligante induz uma mudança na conformação do domínio extracelular que resulta na sua dimerização, o que faz os domínios quinases intracelulares se aproximarem, permitindo-lhes a autofosforilação e fosforilação subsequente de outros alvos. No entanto, existem exceções a esse modelo geral, como por exemplo, o fato de vários RLKs serem multiméricos em sua forma inativa (Becraft, 2002).

Entre os membros da família RLK/*Pelle*, os RLKs dotados de domínios LRR (LRR-RLK) são altamente numerosos e podem ser incluídos em duas categorias funcionais principais. A primeira consiste em LRR-RLKs envolvidas no crescimento e desenvolvimento vegetal, tendo com exemplos em *A. thaliana*: o receptor HAESA envolvido na abscisão de órgãos florais, o BRI1 (*Brassinosteroid insensitive*) implicado na regulação do crescimento celular e o CLAVATA1 implicado no controle do desenvolvimento do meristema apical. A segunda categoria inclui LRR-RLKs envolvidos na interação planta-patógeno e nas respostas de defesa e imunidade inata, tais como o produto do gene *OsXa21* que confere resistência a mancha bacteriana em arroz e do gene *FLS2* (*Flagelin sensing 2*) responsável pelo reconhecimento da flagenina um elicitor bacteriano. Além disso, proteínas adicionais que não se enquadram nessas duas classes funcionais podem ser relacionadas. Estas estão implicadas na simbiose (NORK/SYMRK e HAR1), em fenômenos de auto-incompatibilidade (receptores quinases S; SRK), ou ainda no controle da fixação do nitrogênio atmosférico (SRH5) (Afzal *et al.*, 2008; Apfata, 2010). Cabe ressaltar que o domínio LRR nestes receptores varia em número e apresenta distribuição variável ao longo da região extracelular.

A maior parte dos RLKs caracterizados até o momento provém de plantas modelo tais como *Arabidopsis* e *Medicago truncatula*, porém esforços estão sendo realizados para expandir esses estudos para espécies de interesse econômico. Os cerca de 200 LRR-RLKs presentes em *Arabidopsis* estão agrupados, com base na organização, número de cópias e arranjo das repetições LRR presentes na região extracelular, em 15 subfamílias (LRR I a LRR XV) (Shiu & Bleeker, 2001; Liu *et al.*, 2009; Sakamoto *et al.*, 2012). Análises comparativas de grande escala empregando LRR-RLKs de *Arabidopsis*, arroz e soja identificaram cerca de 600 representantes em soja (Liu *et al.*, 2009). Evidências experimentais demonstram que as subfamílias com função no desenvolvimento apresentam tamanho conservado, enquanto aquelas envolvidas na resposta de defesa tem expandido seus membros, principalmente por duplicação em tandem (Sakamoto *et al.*, 2012).

Os perfis de expressão de alguns dos genes codificadores de LRR-RLKs já foram determinados. Verificou-se que a maioria é expressa em órgãos/tecidos ou em estágios de

desenvolvimento específicos, tais como os genes *PRK1* e *PRK2* de tomate que são expressos nos tubos polínicos, o gene *SERK* (*somatic embryogenesis receptor-like kinase*) de *Daucus carota* é expresso no embrião durante o início da fase globular, e o *RKF1* (*receptor-like kinase in flowers 1*) expresso no primórdio floral e durante o início do desenvolvimento do estame. Todavia, poucos genes codificadores de RLKs são expressos de forma ubíqua. Como exemplos é possível citar o gene *TMK1* (*Arabidopsis* receptor-like transmembrane kinase 1) que é expresso em altos níveis em diversos órgãos/tecidos, e o gene *RPK1* de *arabidopsis* que é encontrado em todos os principais órgãos/tecidos e tem a sua expressão aumentada pelo tratamento com ácido abscísico (ABA) e sob várias condições de estresse abiótico (Shiu & Bleecher, 2001).

De maneira geral, o domínio catalítico das proteínas quinases apresentam um tamanho que varia entre 250 – 300 resíduos de aminoácidos. Estes não são conservados uniformemente, consistindo de regiões alternadas de alta e baixa conservação. Segundo Castells & Casacuberta (2007), doze grandes subdomínios conservados são evidentes, dos quais os subdomínios VI e VII são de interesse pois contêm os resíduos conservados normalmente presente nos sítios catalíticos das serina/treonina (S/T) ou tirosina quinases, e podem desempenhar um papel no reconhecimento da hidroxila correta do aminoácido a ser fosforilado (Rudrabhatla *et al.*, 2006).

Com relação ao domínio extracelular, diversos motivos estão presentes, sendo vários deles encontrados em proteínas de plantas e animais, enquanto outros são exclusivos de plantas. Alguns desses motivos estão implicados em interações proteína-proteína, na ligação a vários carboidratos, incluindo componentes da parede celular microbiana ou glicoproteínas de várias origens (Shiu & Bleecker 2001; Morris & Walker, 2003). As plantas desenvolveram um complexo diversificado de domínios extracelulares, sendo a maioria representada pelo já mencionado domínio LRR.

Em plantas, os LRR-RLKs que estão envolvidos nos eventos iniciais da imunidade inata são denominados “receptores de reconhecimento padrões” (RRPs) e são capazes de detectar eleitores específicos denominados “padrões moleculares associados ao patógeno/microorganismo” (PAMPs/MAMPs). Neste caso, após a ligação dos PAMPs ao seu receptor cognato, inicia-se um bem caracterizado conjunto de respostas de defesa denominado “imunidade desencadeada por PAMP” (PTI). Dentre os processos desencadeados pela PTI encontram-se a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a deposição de calose, a geração de mensageiros secundários e a expressão de genes de defesa. A elicitação de RPKs

leva também a ativação de várias proteínas quinases ativadas por mitógenos conhecidas como MAPs (Greeff *et al.*, 2012).

3- Capítulo 1:

Caracterização molecular do receptor quinase (SOBIR1) em plantas de tomateiro infectadas com os vírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV).

1-INTRODUÇÃO

Diversos relatos sobre o perfil de expressão gênica diferencial em plantas de tomateiro infectadas por viroses já foram descritos. Um dentre eles revelou que em plantas de tomate infectadas pelo PepYMV, gênero *Potyvirus*, o gene que codifica um LRR-RLK foi reprimido 72 horas após o processo de infecção (Alfenas-Zerbini *et al.*, 2009). Por outro lado, pesquisa realizada com tomateiros infectados por TSWV revelou uma elevada expressão de genes relacionados à defesa e transdução de sinal (Catoni *et al.*, 2009). Entretanto, o receptor LRR-RLK identificado como sendo reprimido na interação do tomateiro com PepYMV não figura entre os genes modulados pelo TSWV no trabalho de Catoni e colaboradores. Assim, a modulação deste gene pela infecção do tomateiro com outras espécies virais permanece desconhecida.

Mesmo que nenhum receptor capaz de detectar a presença de viroses invasoras tenha sido descrito até o momento, o presente trabalho levantou a hipótese do possível envolvimento do gene que codifica um receptor LRR-RLK de tomate na resposta de defesa da planta frente à infecção pelas mencionadas espécies virais.

Devido à ausência de estudos relacionados a um receptor RLK em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), em contradição aos vários já relatados em plantas modelo como tabaco e arabidopsis, o presente capítulo buscou realizar a caracterização molecular deste receptor de tomate na tentativa de entender o funcionamento da complexa rede de interação e ativação das respostas de defesa da planta hospedeira. Para isso, o perfil de expressão deste receptor frente às infecções pelos vírus PepYMV e TCSV, e em resposta ao estresse mecânico, foi determinado. Em seguida investigou-se a sua localização subcelular e uma árvore filogenética foi construída.

Cabe ressaltar que no decorrer da realização dos nossos experimentos, um estudo publicado em 28 de maio de 2013a por Liebrand e colaboradores mostrou que o receptor LRR-RLK de tomate alvo do presente estudo é um ortólogo de SOBIR1 (Suppressor of BIR1-

1) de *Arabidopsis thaliana*. Os autores mostraram que SOBIR1 é um LRR-RLK que atua como um regulador positivo da resposta de defesa do tomate a infecção por fungos. Por esta razão, adotou-se a sigla *SlSOBIR1* para designar o gene em questão.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1-Obtenção e manutenção dos isolados dos vírus

O isolado 304 do PepYMV (*Pepper yellow mosaic virus*) (Moura *et al.*, 2011) e o isolado de TCSV (*Tomato chlorotic spot virus*) utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Laboratório de Virologia Vegetal, do Departamento de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP – Botucatu. Esses se encontravam mantidos em *Nicotiana tabacum* L. ‘TNN’, por meio de sucessivas inoculações via extrato vegetal tamponado (EVT; tampão fosfato 0,05 M, pH 7,2, contendo sulfito de sódio 1 g/L) utilizando carborundum (600 mesh) como abrasivo. As plantas de tabaco infectadas estavam sendo mantidas em casa de vegetação.

2.2-Inoculação das plantas e coleta das amostras

Plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) foram semeadas em solo autoclavado com substrato e mantidas em casa de vegetação. Após 12 dias de semeio, as plantas foram transferidas para vasos e individualizadas, totalizando 18 plantas. Após 10 dias, estas foram separadas em 3 parcelas com 6 plantas cada. O segundo par de folhas completamente expandidas das plantas de uma das parcelas foi inoculado mecanicamente (via EVT) com extrato de planta infectada com o isolado 304 do PepYMV; para tal foi usado tampão de inoculação (fosfato de potássio 0,05 M pH 7,2, contendo sulfito de sódio 1 g/L) e carborundum (600 mesh) como abrasivo. O segundo par de folhas das 6 plantas da outra parcela foi inoculado apenas com uma mistura de tampão com abrasivo (controle mock), enquanto que as plantas da última parcela foram mantidas sem nenhum tipo de inoculação nas folhas (plantas NT) para constituir o controle negativo. As plantas foram mantidas dentro de gaiolas antiafídicas (medindo 1 metro de largura e 80 centímetros de altura) em casa de vegetação sobre condições controladas.

As folhas das plantas inoculadas com os tratamentos “PepYMV, mock e NT” foram coletadas a 72 horas, 7, 14 e 21 dias após a inoculação (dpi). Essas foram imediatamente colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Estes mesmos procedimentos foram adotados para a obtenção de plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) para posterior inoculação com o vírus TCSV.

2.3-Extração de RNA total para detecção do PepYMV e TCSV

Para a extração de RNA total visando confirmar a presença dos vírus em cada uma das 6 plantas inoculadas foram utilizadas amostras de folhas coletadas aos 21 dias após a inoculação. Os RNAs totais foram extraídos empregando o kit de extração *Total RNA Purification* (Norgen) de acordo com as instruções do fabricante.

2.4- Extrações de RNA total dos tecidos foliares para análise de PCR em tempo real

Para a extração de RNA total foram realizados *pools* de amostras de folhas (cada *pool* contendo folhas provenientes das 6 plantas) para cada tempo de coleta e tratamento com PepYMV e TCSV, respectivamente. No caso das plantas sem nenhum tipo de inoculação nas folhas (plantas NT), o RNA total foi extraído apenas do *pool* de amostras do tempo de 72 horas. As folhas foram maceradas com pistilo e grau contendo nitrogênio líquido. A extração ocorreu conforme protocolo descrito por Korimbocus *et al.*, (2002), com modificações. Para a extração foram utilizados 100 mg de cada *pool* de amostra. Ao macerado adicionou-se 500 µL de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4 M; 20 mM de EDTA; 100 mM de Tris-HCl pH8,0; PVP 1%, completado com água ultrapura autoclavada para um volume final de 100 mL) previamente aquecido a 65°C. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em agitador e incubadas por 10 minutos a 65°C. Passado este período foram adicionados 500 µL de clorofórmio acrescido de álcool isoamílico (24:1) e agitadas. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para novos microtubos. Os procedimentos de adição da mistura clorofórmio: álcool isoamílico e centrifugação foram repetidos. Após a transferência do sobrenadante para novos tubos, adicionou a este 1 volume de LiCl (5 M), verteu-se os tubos sendo os mesmos mantidos a -20°C durante a noite.

Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado. Ao precipitado foram adicionados 200 µL de TE (Tris + EDTA) contendo SDS 1%; 100 µL de NaCl 5M e 300 µL de isopropanol, seguido por uma incubação de 30 minutos a -20°C. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm por 20 min a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se ao precipitado 1 mL de etanol 70% gelado (preparado com água DEPC-dietilpirocarbonato) e centrifugou-se por mais 5 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O etanol foi retirado e o precipitado seco por aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente e ressuspendido em 30 µL de água tratada com DEPC.

2.5-Quantificação dos RNAs totais

O RNA total extraído de cada *pool* de amostras provenientes das plantas inoculadas com PepYMV ou TCSV foi quantificado e avaliado quanto ao grau de pureza através do espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-Vis *Spectrophotometer*, *NanoDrop Technologies*) usando 1 µL de cada amostra. As medidas de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, e a relação 260/280 determinada.

2.6-Análise da integridade das amostras de RNA total

A integridade das amostras de RNA total foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose 1% (p/v) contendo formaldeído. Antes da eletroforese, as amostras foram desnaturadas a 65°C por 5 minutos sendo transferidas imediatamente para gelo. As corridas eletroforéticas ocorreram com tampão de corrida 1X MOPS (10X - MOPS 20 mM pH 7,0, acetato de sódio 100 mM e EDTA 500 mM), por aproximadamente 1 hora a 80 volts. Os géis foram corados com brometo de etídio, expostos a luz ultravioleta em transiluminador e fotografados.

2.7-Tratamento com DNase e Reação da Transcriptase Reversa (RT)

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Promega) para evitar contaminação com DNA nas análises posteriores. Para tal, ao RNA total (2 µg) foram adicionados 2 µL de tampão de reação de DNase I (10x com MgCl₂); 2 µL de DNase I (1U/µL) e água tratada com DEPC para completar um volume final de 20 µL. Incubou-se a mistura por 30 minutos a 37°C, e a enzima DNase I foi inativada pela adição de 2 µL de EDTA (25 mM) seguida de aquecimento por 10 minutos a 65°C.

Após o tratamento com DNase procedeu-se a síntese do DNA complementar (cDNA) com o uso do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas em termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf) a 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas e 85°C por 5 minutos. Os cDNAs obtidos foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-Vis *Spectrophotometer*, *NanoDrop Technologies*) e armazenados a -20°C.

2.8-PCR convencional para detecção do PepYMV e TCSV

A presença dos vírus PepYMV e TCSV nas plantas infectadas foi confirmada empregando os cDNAs produzidos na etapa anterior por PCR convencional (Reação em Cadeia da Polimerase). Os oligonucleotídeos específicos utilizados (Tabela 1) foram: um par que amplifica parte da região codificadora da proteína capsidial do PepYMV (descrito por Moura *et al.*, 2011); um par cujo primeiro oligo (senso complementar) se anela na região não traduzida do terminal 3' do S RNA (do nucleotídeo 1 a 15) e o segundo no gene que codifica para a proteína N (nucleotídeo 433 a 453) (senso viral) do TCSV (Eiras *et al.*, 2001). Além desses, um par que amplifica um gene endógeno que codifica a proteína TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) de tomate (Carvalho, 2010) foi empregado para verificar a qualidade dos cDNAs produzidos.

As reações foram preparadas em um volume de 25 µL contendo: 12,5 µL do reagente GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega), 1 µL de cDNA (100 ng/ µL), 10,5 µL de água livre de nuclease e 0,5 µL dos oligonucleotídeos acima (10 mM). Como controles positivos das reações utilizou-se o cDNA de plantas sabidamente infectadas pelo PepMYV e TCSV, respectivamente. Como controle negativo foram usadas alíquotas das amostras de RNA total tratadas com DNaseI.

As amplificações foram realizadas em termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf) utilizando 35 ciclos. Os parâmetros utilizados foram: desnaturação inicial (5 minutos/ 95°C) seguida de um ciclo básico de desnaturação (30 segundos/ 94°C), e de uma etapa de *annealing* que diferiu conforme o par de oligonucleotídeos específicos utilizado. No caso dos oligonucleotídeos para o PepYMV empregou-se 45 segundos a 53°C; para o TCSV empregou-se 2 minutos a 48°C e para os oligonucleotídeos usados para amplificação da TCTP empregou-se 45 segundos a 54,6°C. Em todos os casos, as etapas seguintes consistiram de polimerização por 1 minuto a 72°C, seguida de um período de extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram verificados em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio, observados em transiluminador ultravioleta e fotografados.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos vírus PepYMV e TCSV e amplificação do gene da TCTP empregados para reações de PCR convencional.

Alvo	Sequências dos Oligonucleotídeos
<i>PepYMV</i>	<i>PepNib-F.</i> 5' GWTSGYYGMMTTGGATGATG 3' <i>PepUTR-R.</i> 5' AGTAGTACAGGAAAAGCC 3'
<i>TCSV</i>	<i>BR60</i> 5' AGAGCAATCGTGTCA 3' <i>BR65</i> 5' ATCAAGCCTTCTGAAAGTCAT 3'
<i>TCTP</i>	<i>Forward</i> 5' ATGTTGGTTTATCAGGATCTC 3' <i>Reverse</i> 5' GCACTTGATCTCCTTCAAAC 3'

2.9-Desenho dos iniciadores (*oligonucleotídeos*) para PCR em Tempo Real (qPCR)

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação do receptor *SISOBIR1* foram desenhados utilizando como *query* a sequência de nucleotídeos da região codificadora de um receptor de proteína quinase de *Nicotiana tabacum* (GenBank: AB073628) como descrito no estudo de Alfenas-Zerbini *et al.* (2009). A referida sequência de nucleotídeos foi comparada com as sequências depositadas no banco de dados de sequências expressas (EST) de solanáceas (*SOL Genomics Network Solgenes*, <http://www.sgn.cornell.edu>) utilizando-se o algoritmo BLAST. Dois contigs de tomate (SGN-U565512 e SGN-U568730) foram identificados, sendo que o primeiro (SGN-U565512) apresentava maior similaridade (melhor hit) à sequência usada como *query*. Assim, a sequência do EST representativo do contig SGN-U565512 foi alinhada com a do tabaco empregando CLUSTAL (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) e oligonucleotídeos foram desenhados empregando o software *Primer Express* 2.0 (Applied Biosystems). As sequências destes oligonucleotídeos estão disponíveis na Tabela 2.

O normalizador empregado como gene de referência nas reações de PCR em tempo real foi o gene *APT1* (Tabela 2) que codifica uma *Adenosil-Fosforibosil Transferase* e cuja expressão já havia sido validada por Alfenas-Zerbini *et al.*, (2009) para infecção com PepYMV. O mesmo também foi empregado nas reações de qPCR das amostras infectadas com o TCSV, pois dentre os genes de referência testados, o *APT1* foi o que apresentou menor variação de expressão.

Tabela 2. Descrição dos oligonucleotídeos desenhados para a validação da expressão gênica do gene *SISOBIR1* por PCR em tempo real.

Gene	Sequências de Oligonucleotídeos
<i>SISOBIR1</i>	RLK-F. 5' ACT GAT CAA GAA AGC CGA GGA C 3' RLK-R. 5' TCA AGC GAT GCC ACT CCA T 3'
<i>APT1</i>	F. 5' GAA CAG ACA AGA TTG AGA TGC ATG TA 3' R. 5' CCA CGA GGG CAC GTT CA 3'

2.10-PCR em Tempo Real para Validação da Expressão Gênica

Para as reações de PCR em tempo real utilizou-se o kit *GoTaq® qPCR Master Mix 2X* (Promega). As reações foram preparadas para um volume total de 10 µL, em triplicatas, em uma placa de 96 poços, utilizando os seguintes reagentes: 5 µL de *GoTaq® qPCR Master Mix 2X*, 0,3 µL (10 mM) de oligonucleotídeos para o gene alvo (Tabela 2), 2 µL de cDNA (70 ng/µL) e 2,4 µL de água livre de nuclease. No caso do gene de referência foram empregados 0,15 µL (10 mM) dos oligonucleotídeos (Tabela 2). O controle negativo foi realizado adicionando-se água à reação, visando à certificação da ausência de qualquer tipo de contaminação.

A amplificação dos fragmentos alvos foi realizada em termociclador ótico (*Step One Plus Real-Time PCR System* - Applied Biosystems), com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto. No final do processo, para a quantificação dos dados, foi realizado um ciclo suplementar de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 15 segundos a 95°C. Posteriormente os dados ópticos foram analisados no programa *Step One System Software v2.1* (Applied Biosystems).

Ao término das reações obteve-se a representação gráfica (Amp Plot) e numérica (Ct, Threshold Cycle) do aumento da fluorescência ocorrida durante os ciclos das reações. A expressão gênica relativa foi calculada pelo método do $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001), o qual se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal, a expressão QR (Quantificação Relativa) = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde QR representa o nível de expressão gênica, Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial; ΔC_t se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene referência, e $\Delta\Delta C_t$ representa a diferença entre o ΔC_t da amostra de

interesse em determinado tempo e o ΔCt da amostra de referência. A eficiência das reações (amplificação de cada um dos oligonucleotídeos utilizados) foi determinada por meio de diluições seriadas (1:1, 1:5, 1:25 e 1:125). A partir do valor de Ct de cada alíquota, as curvas padrões foram elaboradas e o *slope* das retas foi determinado. Estes valores foram então inseridos na fórmula: $E = (10^{-1/\text{slope}}) \times 100$ para calcular a eficiência (E). Analisou-se também a presença de amplificação inespecífica por meio da curva de dissociação.

Os testes estatísticos foram realizados empregando o *software* REST 2009 (*Relative Expression Software Tool*). Este programa compara dois grupos, o grupo de amostras tratadas com o grupo controle, sendo a comparação sempre realizada a partir de um gene normalizador. A significância das diferenças de expressão relativa entre as referidas amostras é então verificada por um teste de randomização (Pfaffl *et al.*, 2002).

2.11-Indução de estresse mecânico empregando tampão e abrasivo

Plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) foram semeadas e em seguida transferidas para vasos individualizados, totalizando 12 plantas. Seis plantas foram separadas e tiveram o segundo e terceiro par de folhas estressadas mecanicamente com abrasivo. Para tal foi utilizado extrato vegetal tamponado (EVT) e abrasivo; as outras 6 plantas foram mantidas sem tratamento (NT) para constituir o controle negativo da análise. Essas plantas foram mantidas dentro de gaiolas antiafídicas em casa de vegetação sobre condições controladas.

As coletas das folhas estressadas e não estressadas foram realizadas conforme descrito no item 2.2 nos tempos de 1, 3 e 6 horas pós-tratamento. A extração de RNA total foi realizada a partir de um *pool* de folhas (obtido de 6 plantas) para cada tempo de coleta, sendo empregado o protocolo de extração de RNA por CTAB como descrito no item 2.4.

O RNA total foi quantificado e passou pelas etapas de análise da integridade, tratamento com DNaseI e produção de cDNA, PCR convencional e PCR em tempo real, conforme protocolos descritos anteriormente.

2.12-Análise da expressão gênica do receptor *SISOBIR1* em diversos órgãos/tecidos de tomateiro

Para verificar o nível de expressão do gene *SISOBIR1* em diferentes órgãos/tecidos de tomateiro, amostras de folha, caule, raiz, flor e frutos em diferentes fases de desenvolvimento (fruto verde, amarelo e vermelho) foram coletadas. A expressão relativa foi determinada por RT-qPCR utilizando como normalizador o gene que codifica uma Ubiquitina (*UBI*) de tomate (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene normalizador *UBI* usado durante a validação do nível de expressão gênica do gene *SISOBIR1* em diferentes órgãos/tecidos de plantas de tomateiro por PCR em tempo real.

Gene	Sequências de Oligonucleotídeos
<i>UBI</i>	F. 5' GAT CAT CAA TGT GTT TTC GCT TTT 3' R. 5' CAC AAA CTG CAT ATT CAT AAA GAT ACC A 3'

2.13-Região codificadora do gene *SISOBIR1* e seus sítios de restrição

A sequência de nucleotídeos do EST contendo a região codificadora de *SISOBIR1* disponível no banco SOL foi inicialmente analisada no programa *ExPASy Proteomics Server* usando a ferramenta *Translate* (<http://web.expasy.org/translate/>). Dessa forma foi possível verificar a localização dos respectivos códons de início e término da região codificadora do receptor bem como estimar o tamanho da proteína codificada.

Essa sequência de nucleotídeos também foi utilizada para análise no programa *NebCutter* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) com o objetivo de localizar os sítios das enzimas de restrição que clivam a região para o estabelecimento da estratégia de clonagem.

2.14-Desenho dos oligonucleotídeos para amplificação e clonagem da região codificadora de *SISOBIR1*

O fragmento correspondente à região codificadora do gene *SISOBIR1* foi amplificado por PCR convencional (conforme descrito no item 2.8) empregando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 4. Neste caso, alterou-se a temperatura de anelamento

(56,4°C por 45 segundos), a etapa de polimerização (2 minutos a 72°C), e a extensão final (10 minutos a 72°C).

O produto de amplificação foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T *Easy* (kit *pGEM-T Vector Systems* - Promega). A reação de ligação foi composta de 1 µL da enzima T4 DNA ligase (3 U - Fermentas), 1 µL do vetor (50 ng/µL), 7,5 µL de tampão 2X da DNA Ligase, 1,5 µL do produto de amplificação (150 ng/ µL) e 4 µL de água livre de nuclease para um volume final de 15 µL. A ligação foi incubada a 4°C por 16 horas para posterior transformação em células competentes de *Escherichia coli*.

Tabela 4. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar a região codificadora do gene *SISOBIR1*.

Gene	Sequências dos Oligonucleotídeos
<i>SISOBIR1</i>	<i>RLKrc F</i> 5'AT GAC TTC GAA TAT CCA CT 3'
	<i>RLKrc R</i> 5'CTA ATG CTT GAT CTG AGT TAA CAT GC 3'

2.15-Transformação de células competentes de *Escherichia coli*

Após a ligação do produto de PCR ao plasmídeo realizou-se a transformação de *E. coli* nas seguintes condições: 100 µL de *E. coli* DH5α competente foi descongelada no gelo e incubada com 10 µL do produto de ligação por 30 minutos. Realizou-se um choque térmico por 1 minuto e 30 segundos a 42°C. Em seguida, as bactérias foram mantidas no gelo por mais 5 minutos, sendo depois acrescentados 400 µL de meio LB líquido. As bactérias transformadas foram incubadas sob agitação a 37°C por 1 hora e plaqueadas em meio LB sólido contendo o antibiótico de seleção ampicilina (100 mg/mL) adicionado de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo - 24 mg/ml) e X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-Dgalactosídeo - 50 mg/ml). Após crescimento a 37°C por 16 horas, o DNA plasmidial dos clones positivos foi extraído conforme protocolo descrito a seguir.

2.16-Análise dos clones transformantes

As colônias brancas selecionadas foram repicadas individualmente em tubos de 15 mL estéreis, contendo 3 mL de meio LB líquido e 3 µL do antibiótico ampicilina (100 mg/mL) (pré-inóculo). Os tubos foram incubados a 37 °C por 16 horas sob agitação de 150

rpm. Antes de dar início à extração de DNA plasmidial, para cada clone selecionado foram feitas culturas permanentes adicionando-se 150 µL de glicerol e 850 µL de cultura bacteriana, incubação em nitrogênio líquido e armazenamento a -80 °C.

Para a extração de DNA plasmidial foi utilizado o protocolo de lise alcalina (mini-preparação) conforme descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Os DNAs plasmidiais foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-Vis *Spectrophotometer*, *NanoDrop Technologies*).

A confirmação da inserção do fragmento de interesse nos clones recombinantes foi realizada por digestão com enzima de restrição em reações com volume final de 30 µL contendo: 20 µL de DNA plasmidial, 0,5 µL da enzima *EcoR* I (10 U/µL) (Fermentas), 6 µL do tampão da enzima Tango 2X e 3,5 µL de água livre de nuclease. As reações foram mantidas a 37°C por 4 horas. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Alguns clones positivos tiveram o seu DNA plasmidial purificado através do kit *QIAprep Spin Miniprep* (Quiagen), conforme instruções do fabricante, para posterior sequenciamento.

2.17-Sequenciamento

O sequenciamento do DNA plasmidial dos clones selecionados foi realizado utilizando o kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing* versão 3.1 (Applied Biosystems) em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Foram realizadas duas reações para cada clone, sendo uma com o oligonucleotídeo *forward* e outra para o *reverse* (Tabela 5).

Para tal, foi utilizado 2 µL do tampão 2,5 *Save Money* (400 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂), 2 µL do mix de *BigDye*, 1 µL (5 mM) dos oligonucleotídeos (Tabela 5) e o equivalente a 200 ng de DNA plasmidial. As reações foram realizadas em termociclador com os ciclos de temperatura programados para: desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 10°C até a precipitação.

As amostras foram secas a temperatura ambiente e o precipitado ressuspendido em 10 µl de formamida *Hi-Di™* (Applied Biosystems). No momento da aplicação no sequenciador, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e rapidamente transferidas para o gelo.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas empregando o programa Bioedit v.7.05, e submetidas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – Estados Unidos da América) utilizando a ferramenta BLAST. A sequência deduzida de aminoácidos da proteína, por sua vez, foi analisada por diferentes programas de análise protéica disponibilizados no sítio do *Expasy Bioinformatics Resource Portal* (<http://www.expasy.org/>).

Tabela 5. Descrição dos oligonucleotídeos usados para sequenciar a região codificadora do gene *SISOBIR1*

Gene	Sequências dos Oligonucleotídeos
<i>T7</i>	<i>F</i> - 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
<i>SP6</i>	<i>R</i> - 5' TAT TTA GGT GAC ACT ATA G 3'

2.18-Reação de PCR convencional utilizando a enzima *Pfu* para clonagem no vetor pENTR/D- TOPO[®]

A região codificadora do gene *SISOBIR1* inserida em pGEM-T *Easy* foi reamplificada por PCR visando a sua inserção no vetor de entrada pENTR/D-TOPO[®]. Os oligonucleotídeos disponibilizados na Tabela 4 foram utilizados, porém, no oligonucleotídeo *forward* foi necessário adicionar os nucleotídeos CACC ao seu terminal 5'.

A reação foi preparada em um volume final de 50 µL contendo: 5 µL 10X tampão *Pfu* com MgSO₄, 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 mM), 0,5 µL de *Pfu* DNA Polymerase (*Fermentas*) (2,5 U/ µL), 1 µL de DNA plasmidial kit (100 ng/ µL) e 40,5 µL de água livre de nuclease. A amplificação foi realizada em termociclador *MasterCycler Gradient* (Eppendorf) utilizando 35 ciclos. Os parâmetros utilizados foram: desnaturação inicial (5 min/ 95°C) seguida de um ciclo básico de desnaturação (45 segundos/ 94°C), uma etapa de anelamento (35 segundos/ 56,4°C), polimerização por 4 minuto a 72°C, seguida de extensão final de 10 minutos a 72°C. O fragmento gerado foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

2.19-Construção baseada em vetor TOPO

A clonagem do produto correspondente à região codificadora do gene *SISOBIR1* no vetor pENTR/D- TOPO[®] foi realizada utilizando-se o kit *pENTR Directional TOPO[®] Cloning* (Invitrogen). Este kit permite a clonagem do produto de reação da PCR sem extremidades coesivas nos vetores do Sistema Gateway[®] onde uma recombinação sítio específica possibilita a clonagem do inserto na orientação correta com eficiência igual ou superior a 90%.

A reação de clonagem direcionada no vetor constituiu-se de 1 µL do produto da PCR (aproximadamente 150 ng/µL), 1 µL de solução salina, 1 µL do vetor TOPO (15-20 ng/µL) e 3 µL de água livre de nuclease.

Para a transformação do vetor pENTR/D- TOPO[®] foram utilizados 3 µL da reação de ligação, misturada com *E. coli TOP 10*. Esta mistura foi colocada no gelo por 30 minutos, após realizou-se choque térmico a 42°C por 1 minuto e 30 segundos, sendo novamente incubada no gelo por 2 minutos. Em seguida, acrescentou-se 250 µL de meio SOC (disponibilizado no kit) e deixou-se agitar a 37°C por 1 hora a 150 rpm. As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo o antibiótico de seleção canamicina (100 mg/mL) e incubadas a 37°C por 16 horas.

A extração de DNA plasmidial foi realizada inicialmente por meio de lise alcalina (mini-preparação) e os clones positivos confirmados através da PCR convencional empregando os oligonucleotídeos específicos da região codificadora do gene *SISOBIR1* (Tabela 4).

Alguns clones positivos tiveram o seu DNA plasmidial purificado através do kit *QIAprep Spin Miniprep* (Quiagen), conforme instruções do fabricante, quantificados e sequenciados (item 2.17) usando o par de oligos universais M13 (*F*: 5'GTAAACGACGGCCAG3' e *R*: 5'CAGGAAACAGCTATGAC 3'). Adicionalmente, um oligonucleotídeo interno (5'ACA TTT CAG GGA ATA GTT TCC 3') foi desenhado para completar o sequenciamento do fragmento clonado.

2.20-Clonagem no vetor binário Gateway contendo GFP

Com a obtenção do vetor de entrada pENTR/D- TOPO[®]:*SISOBIR1* a região codificadora foi transferida para o vetor de destinação pK7WGF2,0 (Figura 1), gerando uma

construção (pEGFP:*SISOBIR1*) que permite a expressão de *SISOBIR1* fusionado a proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*).

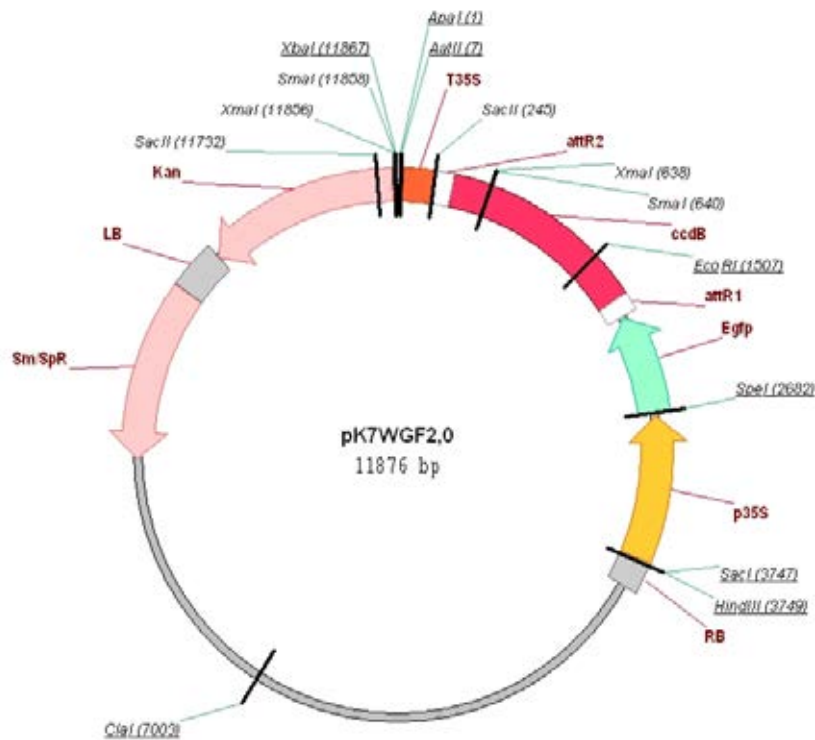


Figura 1. Representação esquemática do vetor pK7WGF2,0 com a indicação dos sítios *attR*, local de inserção do clone de entrada.

A reação LR consiste em uma recombinação sítio-específica na qual os sítios *attL* presentes no vetor de entrada (pENTR/D- TOPO[®]) e que estão, portanto, flanqueando o produto da PCR, são com este transferidos para o vetor de destino pK7WGF2,0 que contém os sítios *attR* (Figura 2). Para a reação foram utilizados 1 µL do vetor de entrada (25 ng/ µL), 1 µL do vetor de destinação (50 ng/ µL), 3 µL de água livre de nuclease, 1 µL do tampão 5X *LR-Clonase Reaction Buffer* e 1 µL da enzima LR Clonase. A reação foi incubada a 25°C por 2 horas, sendo em seguida adicionados 0,5 L de Proteinase K e incubação por mais 10 minutos a 37°C. Essa reação foi usada para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α.



Figura 2. Diagrama esquemático da construção pEGFP:SISOBIR1 contendo a região codificadora de SISOBIR1 fusionada a Egfp sob controle do promotor e terminador 35S do CaMV (*Cauliflower mosaic virus*). Can denota o gene *nptII* que confere resistência a canamicina; *attR2* e *attR1* são as regiões de recombinação homólogas; Egfp (proteína fluorescente verde com *enhancer*) e bordas (LB e RB).

2.21-Transformação de *E. coli* eletrocompetentes com pEGFP:SISOBIR1 e seleção dos transformantes

Para a transformação 2 μ L da reação LR foram misturadas a células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α . Em seguida, essas células foram transferidas para uma cuvetta (0,1 cm) de eletroporação, a qual foi mantida no gelo e submetidas a um choque elétrico com capacitância de 25 μ F e 1,8 kV de carga e 400 Ω de resistência. Após a eletroporação, as células foram ressuspendidas em 450 μ L de meio SOC e incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação de 150 rpm. A suspensão celular foi plaqueada em meio LB sólido contendo o antibiótico de seleção estreptomicina (100 mg/mL) e incubada à 37°C por 16 horas.

Os clones recombinantes foram confirmados através da análise de restrição com o uso das enzimas *Xba*I e *Hind*III bem como por reação de PCR convencional (item 2.8) empregando os oligonucleotídeos correspondentes à região codificadora do gene *SISOBIR1* (Tabela 4). Como controles dessa reação foram empregados DNA plasmidial correspondente ao vetor de entrada (controle positivo) e água livre de nuclease (controle negativo).

Os resultados da análise de restrição e os produtos amplificados na PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

2.22-Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

À cepa LBA 4404 de *A. tumefaciens* eletrocompetente adicionou-se 1 μ L de DNA plasmidial contendo o cassete de expressão pEGFP:SISOBIR1 (Figura 5) sendo incubada no gelo por 2 minutos. Toda a suspensão foi transferida para uma cuvetta (gelada) e a mesma foi

posicionada no eletroporador para a aplicação do pulso (capacitância de 25 μ F e 1,8 kV de carga e 400 Ω de resistência). Imediatamente após o pulso adicionou-se 1 mL de meio SOC e a suspensão foi transferida para microtubos e incubada por aproximadamente 2 horas a 28°C sob agitação de 150 rpm. A suspensão foi plaqueada em meio LB sólido contendo os antibióticos rifampicina (100 mg/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e espectiomicina (90 mg/mL). As placas foram embrulhadas em papel alumínio e incubadas a 28°C por cerca de 2 a 3 dias.

As colônias crescidas foram repicadas individualmente em tubos de 15 mL estéreis, contendo 3 mL de meio LB líquido e os antibióticos acima citados. Os tubos foram incubados no escuro a 28°C por cerca de 2 dias sob agitação de 150 rpm.

A confirmação dos clones positivos foi realizada empregando PCR (item 2.8) com os oligonucleotídeos descritos na Tabela 4. O controle positivo da reação foi o DNA plasmidial extraído de uma colônia transformada com o vetor de entrada, e o negativo, água livre de nuclease.

2.23-Germinação das sementes de *Nicotiana benthamiana*

Sementes de *N. benthamiana* foram semeadas em vaso contendo solo autoclavado com substrato e mantidas em sala climatizada. As plântulas foram individualizadas 20 dias após o semeio, totalizando 6 vasos, os quais permaneceram por aproximadamente 45 dias sob condições controladas até a realização dos ensaios de agroinfiltração.

2.24-Ensaios de agroinfiltração e observação da localização subcelular

Para os ensaios de agroinfiltração as agrobactérias contendo o cassete de expressão pEGFP:*SISOBIR1* (Figura 2) foram cultivadas em meio LB líquido (20 mL) adicionado dos antibióticos seletivos, sendo as mesmas mantidas no escuro sob agitação (150 rpm) por cerca de 2 dias a 28°C até atingirem uma absorbância a 600 nm (A_{600}) entre 0,6 e 0,8. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 5.700 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. O precipitado bacteriano foi então ressuspensionado em 20 mL de tampão de agroinoculação (MES 10 mM, pH 5,6 contendo $MgCl_2$ 10 mM e Acetoseríngona 200 μ M) e incubadas no escuro sob agitação (150 rpm) a 28°C por aproximadamente 3 horas.

A construção pm-rk CD3-107 foi usada como controle positivo de localização nos ensaios de agroinfiltração, sendo a mesma coinfiltrada com a construção pEGFP:*SISOBIR1*. Essa construção, inserida no vetor binário pBIN20, contém a sequência codificadora de uma aquaporina de membrana (gene *AtPIP2A*) fusionada à proteína fluorescente mCherry (fluorescência vermelha) sob controle de um duplo promotor 35S (2X35S) (Nelson *et al.*, 2007). O clone foi adquirido junto ao *Arabidopsis Biological Resource Center*. A construção pm-rk CD3-107 foi inserida em *A. tumefaciens* cepa LBA 4404 e empregada nos ensaios de agroinfiltração.

As soluções bacterianas contendo as construções pEGFP:*SISOBIR1* e 2x35S:*AtPIP2A*:mCherry, respectivamente, foram levemente misturadas para serem coinfiltradas nas folhas de *N. benthamiana*. A solução bacteriana foi injetada com seringa de plástico de 1 mL na face abaxial das folhas, entre as nervuras secundárias, por meio de quatro a seis pontos de inoculação. As plantas foram mantidas em condições controladas por um período de 48 a 72 horas para posterior visualização.

As análises de localização das proteínas de fusão, mediante visualização de fluorescência, foram realizadas em microscópio Confocal Leica (modelo - TCS P5), usando a epiderme das folhas agroinfiltradas. A epiderme foi isolada com o auxílio de uma pinça e mantida em placa de Petri contendo água Milli-Q autoclavada.

2.25-Análise filogenética

Uma análise filogenética foi realizada empregando as sequências de aminoácidos do domínio catalítico PKc (quinase) de diferentes RLKs de plantas. Inicialmente foram selecionadas sequências provenientes de RLKs de tomate (Solyc04g077010 2.1; Solyc06g065260 2.1; Solyc11g020280 1.1; Solyc08g066320 2.1; Solyc12g008500 2.1; Solyc08g066210 2.1; Solyc09g072810 2.1; Solyc04g071680 1.1; Solyc04g074020 2.1; Solyc06g069650 2.1; Solyc03g059490 1.1; Solyc06g048620 2.1; Solyc03g033610 1.1; Solyc02g084370 1.1; Solyc07g005540 1. 1) e arabidopsis (AT5G49660.1; AT3G19700.1; AT1G09970.2; AT1G72180.1; AT5G25930.1; AT1G35710.1; AT4G08850.1; AT1G74360.1; AT3G02130.1; AT5G01890.1; AT1G75640.1; AT4G36180.1; AT5G45800.1; AT5G58150.1 e AT2G24230.1). Além dessas, as sequências de aminoácidos das proteínas SOBIR1 de arabidopsis (AT2G31880.1) e de tomate [Solyc06g071810 1.1 - SGN-U565512 (proteína estudada) e Solyc03g111800 2.1] também foram incluídas. A seleção de tais sequências foi baseada no trabalho de Sakamoto e colaboradores (2012) que identificaram e classificaram

todos os putativos RLKs de tomate através da comparação com os RLKs previamente descritos em *A. thaliana* (Shiu & Bleecker, 2003; Shiu *et al.*, 2004).

Adicionalmente, a sequência de aminoácidos entre o 334 ao 576, correspondente ao domínio quinase da proteína *S*/SOBIR1 foi comparada com as sequências depositadas no GenBank utilizando a ferramenta BLAST, sendo selecionadas as seguintes sequências: PREDICTED:SOBIR1-like [*Vitis vinifera*](XP_002276125.1); PREDICTED:SOBIR1-like [*Cucumis sativus*](XP_004138075.1); PREDICTED:SOBIR1-like [*Glycine max*](XP_003523117.1); PREDICTED:SOBIR1-like [*Fragaria vesca* subsp. *vesca*](XP_004299167.1) e *Nicotiana tabacum* mRNA for receptor-like protein kinase (AB073628.2) (WRK) denominado *NtSOBIR1* (Liebrand *et al.*, 2013a).

As sequências foram alinhadas empregando-se o programa CLUSTAL W. Para as análises de agrupamento e construção do dendrograma foi usado “Neighbor-joining (NJ)” (Saitou & Nei, 1987) com 1000 réplicas. Todas as análises filogenéticas foram implementadas empregando o pacote de ferramentas MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011).

3- RESULTADOS

3.1-Análise da expressão do receptor *SISOBIR1* em plantas de tomate infectadas pelos vírus PepYMV e TCSV

Para analisar a expressão do gene *SISOBIR1* nas plantas de tomate inoculadas com PepYMV e TCSV foi utilizado RNA total extraído de *pools* de amostras de folhas (cada *pool* contendo folhas de 6 plantas) para cada tempo de coleta (72 horas, 7, 14 e 21 dias) das plantas inoculadas com os vírus e plantas mock. A qualidade dos cDNAs obtidos foram analisadas pela amplificação por PCR convencional, de parte da região codificadora da TCTP de tomate, que pode ser usada como um controle de qualidade do cDNA, por se tratar de uma proteína que apresenta a presença de transcritos em todos os tecidos vegetais (Carvalho, 2010). A eletroforese dos produtos da PCR amplificados gerou um fragmento de aproximadamente 500 pb (pares de base) correspondente à região codificadora da TCTP (Carvalho, 2010) demonstrando assim que os cDNAs encontravam-se em boa qualidade.

Antes das análises de tempo real, a presença dos vírus PepYMV e TCSV nas plantas de tomateiro inoculadas foi confirmada por RT-PCR empregando oligos específicos para cada espécie viral. Para tal foram utilizadas as amostras de RNA total extraídas aos 21 dpi, portanto, provenientes de folhas sistemicamente infectadas. A eletroforese dos produtos da PCR permitiu observar a presença de um fragmento de 960 pb nas plantas infectadas pelo PepYMV (Moura *et al.*, 2011) (Figura 3), e a presença de um fragmento de 453 pb (Eiras *et al.* 2001) nas plantas infectadas com o TCSV (Figura 4). As bandas correspondentes foram observadas em todas as amostras analisadas revelando assim, que as plantas encontravam-se devidamente infectadas pelos respectivos vírus.

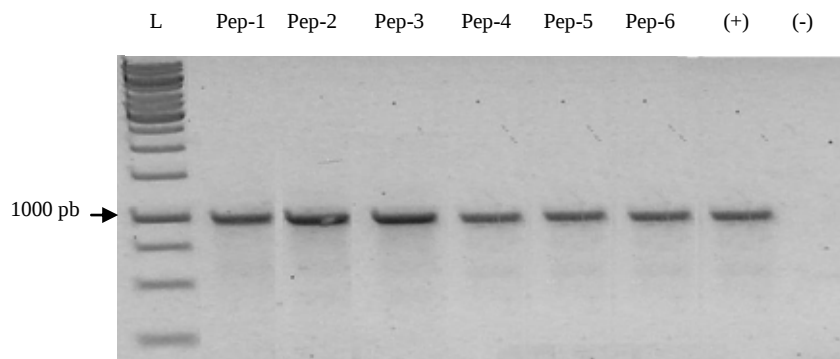


Figura 3: Amplificação por RT-PCR da parte da região codificadora da proteína capsial do PepYMV (seta) em amostras de plantas de tomateiro inoculadas com o vírus. Amostras: Pep-1 – Pep-6 de plantas 21 dpi; L (marcador molecular de 1Kb); (+) controle positivo – planta que serviu como fonte de pré-inóculo e (-) controle negativo – água. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

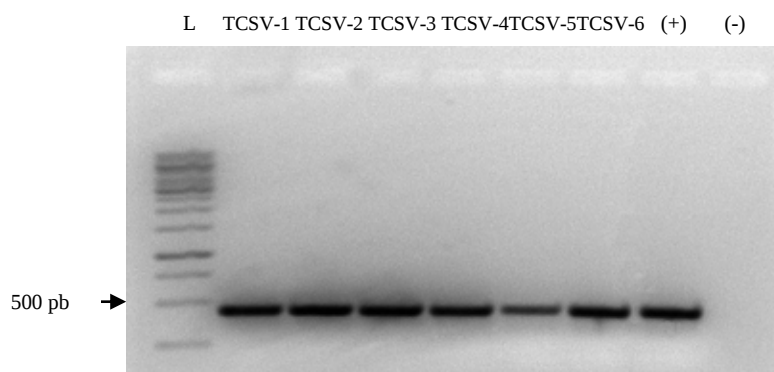


Figura 4: Amplificação por RT-PCR da região não traduzida do terminal 3' do S RNA e de parte do gene que codifica para a proteína N (senso viral) do TCSV em amostras de plantas de tomateiro inoculadas com o vírus. Amostras: TCSV-1 – TCSV-6 de plantas 21 dpi; L (marcador molecular de 1Kb); (+) controle positivo – planta que serviu como fonte de pré-inóculo, e (-) controle negativo – água. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

A análise de expressão relativa por PCR em tempo real do gene que codifica o receptor *SISOBIR1* revelou uma repressão estatisticamente significativa ($P < 0,05$) nas plantas inoculadas com o PepYMV em relação ao controle não tratado (NT), em todos os tempos avaliados (Figura 5). Ou seja, a acumulação de transcritos do gene alvo nos diferentes tempos de coleta foi drasticamente afetada pela presença do vírus.

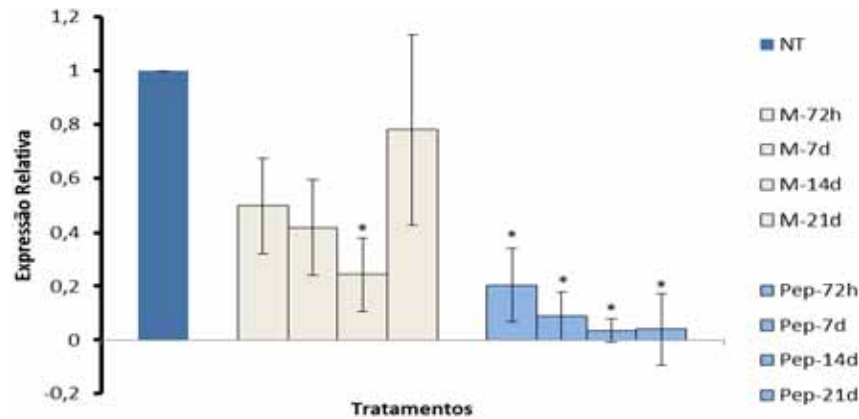


Figura 5. Expressão relativa do gene *SISOBIR1* em plantas infectadas pelo PepYMV. Amostra NT (não tratada); M (controle mock - mistura de tampão com abrasivo). Análises realizadas a 72 h e 7, 14 e 21 dpi. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação ao controle NT com $P < 0,05$.

Por outro lado, nenhuma modulação significativa na expressão do gene *SISOBIR1* foi observada nas plantas tratadas com a mistura de tampão com abrasivo (controle mock), exceção feita ao tempo de 14 dpi. Neste tempo, uma redução significativa na expressão relativa foi detectada quando comparada com o controle não tratado. Esse resultado parece indicar que o gene alvo poderia estar respondendo ao ferimento provocado pelo uso do abrasivo, na ausência do vírus. Corroborando essa hipótese, a indução pelo estresse mecânico da expressão do gene *WRK* (wound-induced receptor-like kinase), que codifica um LRR-RLK de tabaco com alta similaridade ao *SISOBIR1* já foi relatada na literatura (Ito *et al.*, 2002).

Devido a isso, um novo gráfico de expressão foi elaborado visando mostrar o que provavelmente possa corresponder somente ao efeito da infecção viral pelo PepYMV nos níveis de transcritos do gene *SISOBIR1* nessas plantas, descontando a influência do estresse mecânico que é observado nas plantas controle mock (Figura 6).

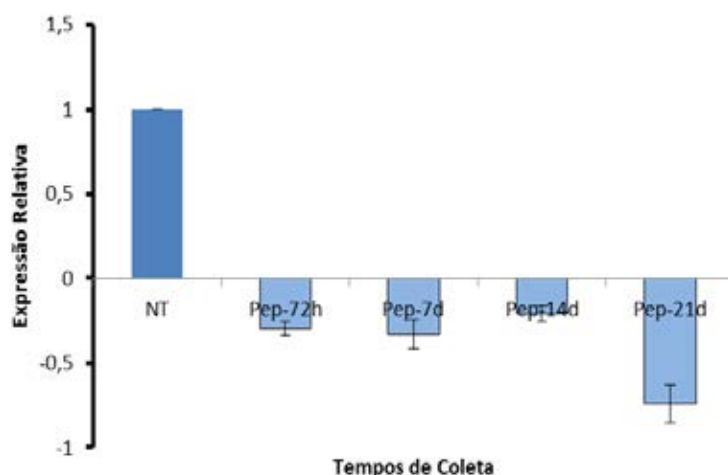


Figura 6. Expressão relativa do gene *SISOBIR1* onde os níveis de acúmulos dos transcritos foram obtidos a partir dos valores de expressão das plantas infectadas pelo PepYMV deduzidos dos valores de expressão das plantas controle mock. Amostra NT (não tratada); Análises realizadas a 72 h e 7, 14 e 21 dpi.

No caso da análise de expressão relativa do gene *SISOBIR1* em plantas infectadas pelo TCSV, um aumento na sua expressão nas plantas inoculadas em relação ao controle não tratadas (NT) foi observado nos tempos de 7, 14 e 21 dpi. Um pico significativo de acumulação de transcritos ($P < 0,05$) foi detectado no tempo de 14 dpi (Figura 7). Já para o tempo de 72 hpi não se observou variação nos níveis de expressão de *SISOBIR1* em relação ao controle não tratado (NT). Diante disso, pode-se inferir que a infecção da planta hospedeira por um tospovírus leva a um acúmulo de transcritos do gene alvo como um provável mecanismo de ativação para uma resposta de defesa da planta frente ao patógeno.

Alterações significativas na expressão do gene *SISOBIR1* também foram verificadas nas plantas tratadas com a mistura de tampão com abrasivo (controle mock) nos tempos 7, 14 e 21 dpi, sendo que em 72 horas após o ferimento houve um pequeno aumento nos níveis de transcritos em relação ao controle (NT) (Figura 7).

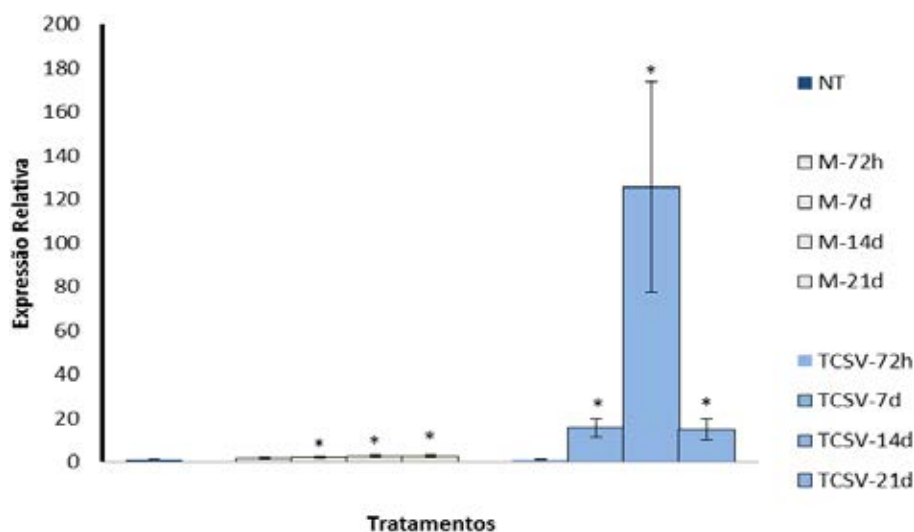


Figura 7. Expressão relativa do gene *SISOBIR1* em plantas infectadas pelo TCSV. Amostra NT (não tratada); M (controle mock - mistura de tampão com abrasivo). Análises realizadas a 72 h e 7, 14 e 21 dpi. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação ao controle NT com $P < 0,05$.

3.2-Análise da expressão em plantas de tomateiro tratadas com tampão e abrasivo

Tendo em vista a hipótese de modulação da expressão do gene *SISOBIR1* por estresse mecânico, um novo experimento foi instalado para verificar se o referido gene poderia ser responsivo ao ferimento. Para tal *pools* de folhas tratadas com uma mistura de tampão e abrasivo (cada *pool* contendo folhas de 6 plantas) foram usados para a extração de RNA total, sendo que folhas provenientes de plantas não tratadas foram usadas como controle. Neste caso, as coletas foram realizadas em tempos menores, uma vez que a resposta a injúria mecânica acontece de forma rápida (León *et al.*, 2001). Os cDNAs obtidos foram empregados na análise de PCR real time utilizando-se oligonucleotídeos *SISOBIR1*-específicos e gene *APT1* como normalizador.

Como resultado, verificou-se que o gene *SISOBIR1* é notavelmente induzido pelo estresse mecânico (ferimento), apresentando um aumento de aproximadamente 8 vezes em relação ao controle não tratada (NT) detectado 1 hora após ao tratamento (Figura 8). Entretanto, depois desse pico inicial a expressão é diminuída nos demais tempos, sendo um nível basal observado após 3 h e uma redução significativa em relação ao controle constatada após 6 h.

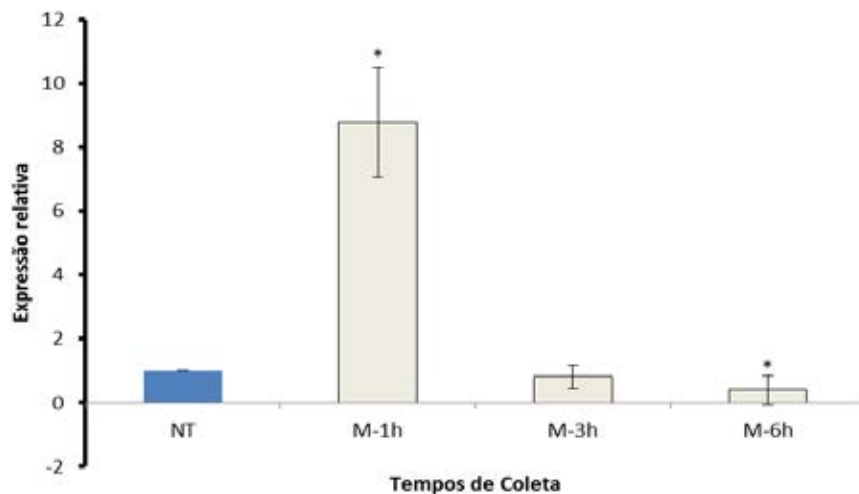


Figura 8. Expressão relativa do gene *SISOBIR1* em plantas de tomate submetidas ao tratamento com tampão e abrasivo (mock). Amostra NT (não tratada). Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação ao controle NT com $P < 0,05$.

3.3-Análise da expressão gênica em diferentes órgãos/tecidos de tomateiro

A expressão relativa do gene *SISOBIR1* foi avaliada em diferentes órgãos/tecidos de tomateiro. Foram avaliadas amostras de folha, caule, raiz, flor, fruto verde e fruto amarelo. Os RNAs destes diferentes órgãos/tecidos foram tratados com DNaseI e serviram de molde para a síntese dos cDNAs utilizados na reação de qPCR.

Na Figura 9 é possível observar que o gene *SISOBIR1* é expresso na folha, caule e flor, com um maior nível de expressão observado na folha. Por outro lado, a acumulação de transcritos do gene alvo nos demais órgãos/tecidos analisados (raiz e frutos verde e amarelo) foi muito baixa ou não detectada quando a análise é normalizada com o gene que codifica a Ubiquitina de tomateiro. Cabe ressaltar que um pool de cDNAs provenientes de todos os órgãos analisados foi usado como calibrador e expressão obtida considerada igual a 1. Estes resultados mostram que o gene *SISOBIR1* é expresso predominantemente nas folhas.

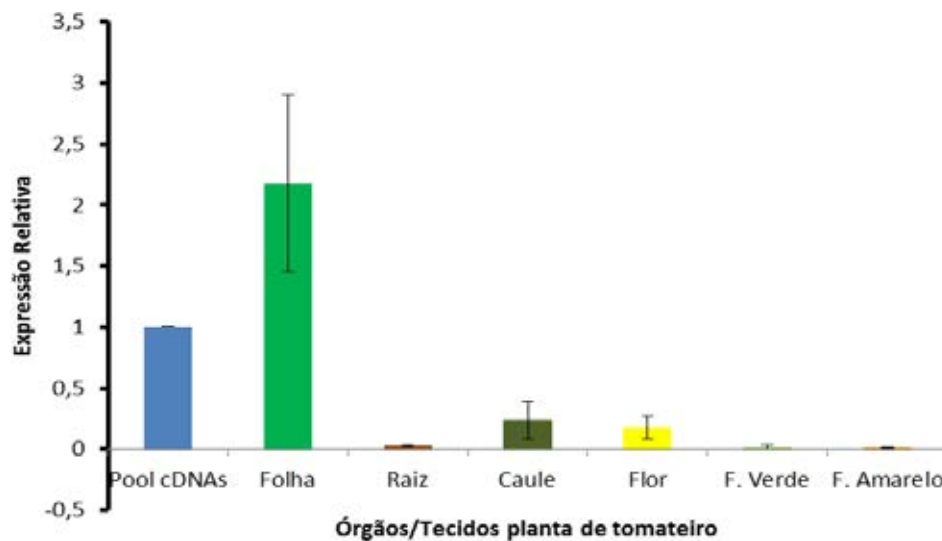


Figura 9. Expressão relativa do gene *SISOBIR1* em diferentes órgãos/tecidos de tomateiro. Um pool de cDNAs provenientes de todos os órgãos analisados foi usado como calibrador.

3.4-EST correspondente à região codificadora de *SISOBIR1* - análises *in silico*

O EST (SGN-U565512) identificado no banco de dados *SOL Genomics* apresenta 2096 nucleotídeos e contém uma fase aberta de leitura de 1878 nucleotídeos (nt). A região 5' não-traduzida (UTR) tem 98 nt enquanto que a região 3' apresenta 120 nt. A proteína codificada apresenta 625 aminoácidos (Figura 10), massa molecular predita de 69.8 kDa e ponto isoelétrico de 9.16.

Um domínio serina/treonina quinase está presente entre os aminoácidos 331-625 sendo o sítio ativo [LIVMFYC]-x-[HY]-x-D-[LIVMFY]-K-x(2)-N-[LIVMFYCT] localizado entre os aminoácidos 469-481. A existência de um peptídeo sinal que se estende até o aminoácido 21 foi predita pelo programa SignalP 4.1. Adicionalmente, os programas TMHMM e TOPPred indicaram a existência, com alta significância, de uma única hélice transmembrana entre os aminoácidos 270-290 (Figura 10).

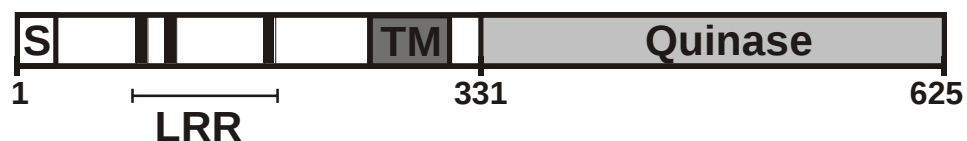


Figura 10. Representação esquemática do receptor *SISOBIR1* mostrando os diferentes domínios/motivos presentes em sua sequência primária de aminoácidos. S- peptídeo sinal; LRR – repetições ricas em leucina; TM – domínio transmembrana.

3.5-Clonagem da região codificadora de *SISOBR1* no vetor binário Gateway contendo GFP

A construção do vetor de entrada (pENTR/D- TOPO[®]) contendo a referida região codificadora foi transferida para o vetor de destinação o vetor binário pK7WGF2,0 que gerou um clone capaz de expressar o receptor *SISOBR1* fusionado a proteína EGFP. Para a seleção dos transformantes, o DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina e empregado para a análise dos recombinantes por meio da digestão com as enzimas de restrição *Xba* I e *Hind* III e via PCR. O vetor recombinante (pEGFP:*SISOBR1*) assim obtido foi inserido em *A. tumefaciens* para a realização dos ensaios de agroinfiltração em tabaco.

3.6-Localização subcelular do receptor *SISOBR1*

Para a localização subcelular do receptor *SISOBR1*, as construções pEGFP:*SISOBR1* e 2X35S:*AtPIP2A*-mCherry, usado para a marcação da membrana plasmática, inseridas em *A. tumefaciens*, foram coinfiltradas em folhas de *N. benthamiana*. Após 48 e 72 horas de inoculação, a epiderme das folhas infiltradas foi delicadamente retirada e avaliada sobre microscópio confocal, sendo a localização do receptor verificada.

Nas imagens capturadas na microscopia confocal após 72 horas a fluorescência associada à fusão EGFP:*SISOBR1* foi visualizada na periferia das células infiltradas estando aparentemente associada à parede celular/membrana plasmática (Figura 11). Um padrão altamente similar foi observado quando o filtro foi trocado visando capturar a emissão da fluorescência associada à fusão *AtPIP2A*-mCherry. Neste caso, a fluorescência vermelha também foi visualizada na periferia das células, mais precisamente junto da membrana plasmática, uma vez que este é marcador específico de membrana plasmática. A sobreposição das imagens confirma a co-localização das duas proteínas, o que permite inferir que o receptor *SISOBR1* está associado à membrana plasmática.

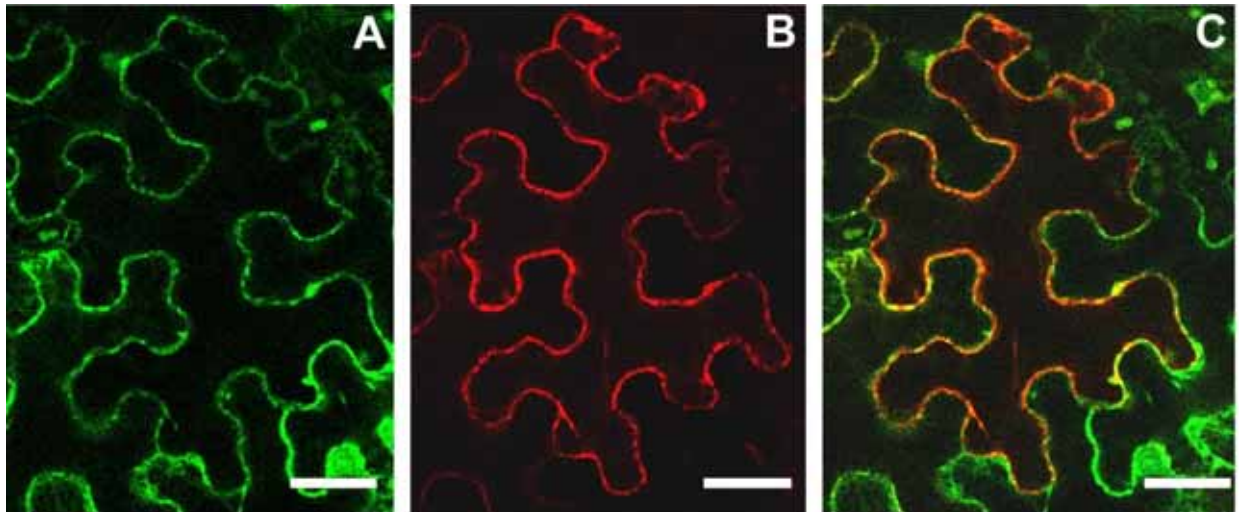


Figura 11 - Localização subcelular do receptor *SISOBIR1* em células da epiderme foliar de *N. benthamiana*. (A) Sinal fluorescente verde da fusão EGFP:*SISOBIR1*; (B) Sinal fluorescente vermelho da fusão AtPIP2A-mCherry (controle); (C) Sobreposição das fluorescências emitidas. Escala da barra = 30,0 μ m.

3.7-Relações filogenéticas do receptor *SISOBIR1*

Uma análise filogenética foi realizada na tentativa de encontrar indicativos do possível papel funcional para o receptor *SISOBIR1* de tomate. Para tal foram empregadas 39 sequências de putativos LRR-RLKs de tomate e arábida. A árvore filogenética obtida (Figura 12) revelou que os LRR-RLKs incluídos na análise foram distribuídos nos ramos correspondentes às diferentes subfamílias LRR já descritas (LRR-I a LRR-XV). Nove das sequências analisadas foram agrupadas e formaram um ramo externo, que inclui os receptores *SOBIR1* de arábida e de tomate. A sequência do receptor *SISOBIR1* apresentou maior identidade de sequência com o receptor *WRK* de *N. tabacum* que está envolvido com a resposta de hipersensibilidade e que foi denominado de *NtSOBIR1* por Liebrand e colaboradores (2013a).

A análise filogenética empreendida neste estudo corroborou com a análise realizada por Sakamoto e colaboradores (2012) empregando diversos RLKs putativos de tomate, incluindo receptores citoplasmáticos. Os autores verificaram que os LRR-RLKs foram agrupados com pelo menos um LRR-RLK de arábida e distribuídos dentro das 15 subfamílias de LRR descritas. Neste estudo observou-se que o receptor *SISOBIR1* agrupou-se com o receptor *SOBIR1* de arábida em um mesmo ramo da árvore não sendo, porém, incluído em nenhuma das subfamílias.

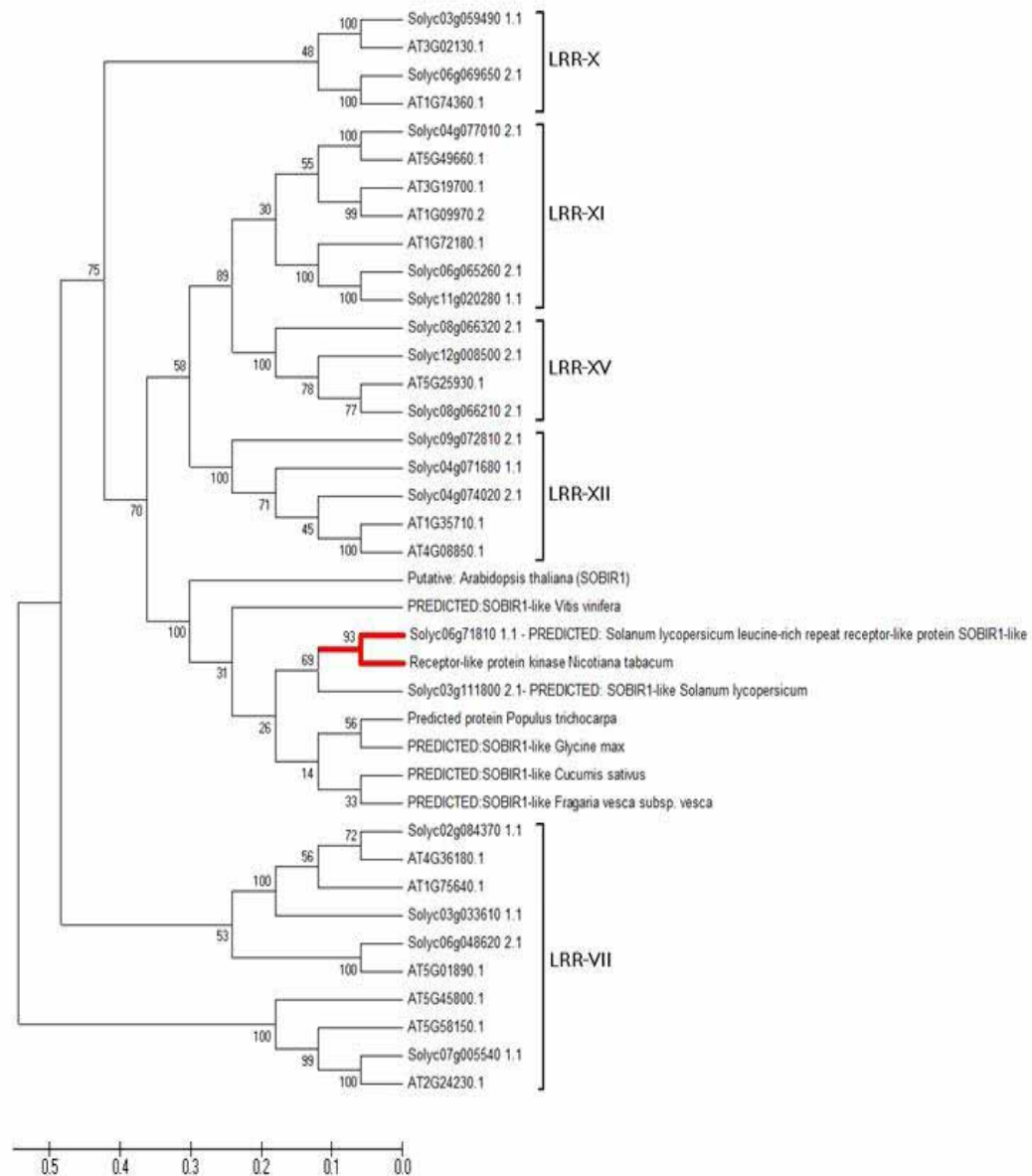


Figura 12. Árvore filogenética mostrando a relação da sequência deduzida de aminoácidos do domínio catalítico PKc (quinase) do receptor S/SOBIR1 de tomate com mais de 39 outras sequências de receptores. A árvore foi construída usando Neighbor-Joining com bootstrap de 1000 repetições. O ramo que contém o receptor de tomate investigado está realçado de vermelho.

4- DISCUSSÃO

Inúmeros estudos de análise da expressão gênica global têm sido utilizados para investigar as alterações no transcriptoma da planta hospedeira provocadas por infecções virais. Tais análises têm fornecido informações importantes sobre o impacto da infecção viral nos mecanismos de defesa da planta hospedeira, permitindo a identificação de genes potencialmente envolvidos na resposta de defesa antiviral.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização de um gene que codifica um receptor do tipo LRR-RLK em tomate e cuja expressão diferencial em uma interação compatível com um potyvírus foi constatada em ensaios de macroarranjo empregando folhas inoculadas. Por outro lado, essa mesma expressão diferencial em outra interação compatível com um tospovírus ainda não havia sido relatada.

Segundo Alfenas-Zerbini e colaboradores (2009), o gene do receptor de proteína quinase de tomate teve sua expressão reprimida pelo PepYMV no tempo de 72 hpi. No presente trabalho, a subsequente validação do perfil de expressão deste gene (denominado *SISOBIR1*; Liebrand *et al.*, 2013a) em plantas de tomateiro cv. Santa Clara inoculadas com o PepYMV mostrou que esta repressão também ocorre nos estágios mais tardios da infecção viral.

Em relação à validação do perfil de expressão do gene *SISOBIR1* nas plantas de tomateiro inoculadas com o TCSV, um aumento nos níveis de transcritos do gene durante a infecção sistêmica foi constatada. Catoni e colaboradores (2009) estudando a resposta transcricional de genes em caule e raízes de plantas de tomateiro infectadas pelo TSWV (*Tomato spotted wilt virus*), um vírus pertencente ao gênero *Tospovirus*, verificaram a expressão induzida de genes relacionados à defesa e sinal de transdução nas raízes. Neste estudo observou-se que todos os genes envolvidos na cascata de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPKKK) foram ativados.

Assim, com base nos dois tipos de modulação negativa e positiva observadas no presente trabalho levantou-se a hipótese de que este receptor poderia estar atuando de forma indireta nas vias de sinalização relacionadas com a resposta antiviral.

Diversos relatos mostram que os vírus de RNA são capazes de promover uma modulação negativa da expressão de genes da planta hospedeira. A repressão de importantes genes endógenos foi observada, por exemplo, em plantas de *N. benthamiana* infectadas pelo *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV), sendo essa repressão considerada um componente primordial para o completo desenvolvimento dos sintomas da doença (Havelda *et al.*, 2008).

Os autores mostraram que a replicação viral não é necessária para a manutenção da regulação negativa destes genes e que o mecanismo de silenciamento por RNA não implica na regulação negativa. Além disso, verificou-se que a repressão de genes da hospedeira devido à infecção viral decorre de uma combinação particular entre o vírus e a planta hospedeira havendo um importante envolvimento do componente genético nesse processo (Havelda *et al.*, 2008). Corroborando essa observação, análises transcriptômicas demonstraram que a resposta global de diferentes ecótipos de *Arabidopsis* frente à infecção pelo *Tobacco etch virus* (TEV) é variável e, segundo o ecótipo analisado, envolve a ativação e repressão de genes de diferentes categorias funcionais (Hillung *et al.*, 2012). Com base nesses dados é possível sugerir que a repressão do receptor *SISOBIR1* seja específica da interação tomate-PepYMV.

Curiosamente, genes codificadores de diversas classes de receptores quinase, incluindo receptores do tipo LRR-RLK como o *SISOBIR1*, têm sido comumente relatados como sendo diferencialmente expressos em diferentes patossistemas virais (Naqvi *et al.*, 2011; Czosnek *et al.*, 2013). Na maioria das vezes, esses genes são regulados positivamente frente à infecção viral, como verificado no presente trabalho para o gene *SISOBIR1* em plantas de tomateiro infectadas com o tospovírus TCSV.

Na interação entre *Brachypodium* e os vírus *Panicum mosaic virus* (PMV) e seu satélite SPMV, por exemplo, Mandadi & Scholthof (2012) observaram que genes LRR-RLK pertencentes a subfamílias LRR-VIII-2 e LRR-XII eram altamente induzidos pela infecção viral. Em plantas de *N. benthamiana* inoculadas com os vírus envelopados *Sonchus yellow netvirus* (SYNV) (gênero *Rhabdovirus*) e um tospovírus *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), a expressão do gene que codifica para um receptor *SOBIR1-like* (GenBank: BQ516009) foi induzida durante a infecção sistêmica de ambos os vírus (Senthil *et al.*, 2005).

Em um estudo mais abrangente, Whitham e colaboradores (2003) investigaram o padrão de expressão gênica em folhas de *A. thaliana* inoculadas com cinco espécies virais com genoma composto por moléculas de RNA fita simples de polaridade positiva e negativa, incluindo um potyvírus [TVCV (tobamovírus), ORMV (tobamovírus), PVX (potexvírus), CMV (cucumovírus) e TuMV (potyvírus)]. A análise revelou alterações coordenadas na expressão de genes em resposta à infecção pelos diferentes vírus, incluindo mudanças vírus-específicas e gerais. Dentre os genes que tiveram a expressão induzida pelas infecções encontra-se o ortólogo do receptor *SISOBIR1* de *Arabidopsis* (AT2G31880), cuja expressão foi regulada positivamente em resposta a todas as cinco viroses em um ou mais tempos durante o curso da infecção. Observa-se, neste caso, que o receptor *SOBIR1* teve sua expressão aumentada independente da espécie viral, e do tipo de genoma associado (RNA de fita

simples de polaridade positiva ou negativa), utilizada na inoculação das plantas (Whitham *et al.*, 2006).

Por outro lado, demonstramos que a expressão do gene *SISOBIR1* é também modulada por estresse mecânico. Neste contexto, Ito e colaboradores (2002) relataram que a expressão do gene *WRK*, renomeado *NtSOBIR1* (Liebrand *et al.*, 2013a) é sensível à mudança de temperatura e também induzida rapidamente por ferimento em plantas de tabaco que carregam o gene *N*. O gene *N* é um gene que confere resistência ao *Tobacco mosaic virus* (TMV) e promove a morte celular dependente da temperatura. O gene *NtSOBIR1* é dentre os genes ortólogos a *SISOBIR1* aquele que apresenta maior identidade (82%) com o referido receptor de tomate.

No estudo de Ito e colaboradores (2002) verificou-se que elevados níveis de acumulação de transcritos do gene *NtSOBIR1* eram encontrados antes da formação da lesão necrótica (resposta de hipersensibilidade) em folhas de tabaco carregando o gene *N* inoculadas com TMV. Por outro lado, a ocorrência de baixos níveis de acumulação de transcritos do referido gene era detectada em plantas de tabaco (cv. Samsunn nn) recessivas para o gene de resistência. Além disso, a indução do gene alvo por ferimento ocorria minutos após o ferimento, sendo portanto rápida e transiente (Ito *et al.*, 2002; Takabatake *et al.*, 2006). De acordo com Takabatake e coautores (2006) quando as plantas sofrem algum tipo de ferimento elas respondem rapidamente, recompondo os tecidos danificados e protegendo-os de ataques posteriores.

Cabe ressaltar que em nossos experimentos, apesar de não termos empregado um cultivar de tomate contendo algum gene de resistência para o PepYMV ou TCSV, foi possível observar claramente que o receptor de tomate responde rapidamente ao processo de injúria causado nas folhas. O pico de expressão em resposta ao ferimento ocorreu 1 hora após a aplicação do estresse, sendo essa expressão reduzida ao longo do tempo.

De acordo com Takabatake e colaboradores (2006) mesmo havendo centenas de genes receptores de proteína quinase encontrados no genoma de plantas, poucos foram analisados pelos seus papéis fisiológicos. Neste contexto, apesar de um acúmulo de transcritos serem observados após o ferimento, a razão e as consequências desta indução ainda não foram esclarecidas de forma definitiva.

Avaliando a expressão relativa do gene *SISOBIR1* em diferentes órgãos/tecidos de tomateiro foi possível conferir que este gene é expresso na folha, caule e flor, apresentando um maior nível de expressão na folha. Por outro lado, a acumulação de transcritos do gene alvo nos demais órgãos/tecidos analisados (raiz e frutos verde e amarelo) apresentou-se muito

baixa ou não detectável, revelando que o gene *SISOBIR1* é expresso predominantemente nas folhas. Contrariamente, Ito e colaboradores (2002) observaram que o gene *NtSOBIR1* na ausência de estresse é expresso em baixos níveis de forma constitutiva e ubíqua. Por outro lado, uma comparação subjetiva dos nossos dados com os depositados no arabidopsis eFP Browser (www.bar.utoronto.ca), uma ferramenta que disponibiliza dados de expressão gênica de arabidopsis (Winter *et al.*, 2007), demonstrou que o gene ortólogo *AtSOBIR1* encontra-se expresso em baixos níveis em vários órgãos/tecidos, porém sua expressão é elevada nas folhas como observado para o gene *SISOBIR1*. É importante salientar que as folhas representam locais de penetração para diferentes patógenos, o que pode explicar a maior expressão do receptor *SISOBIR1* neste órgão.

Adicionalmente, utilizando agroinfiltração e microscopia confocal foi demonstrado que o receptor *SISOBIR1* está associado à membrana plasmática. Resultados similares foram obtidos por Liebrand e colaboradores (2013a) investigando este mesmo receptor, e por Takabatake e co-autores (2006) pesquisando o receptor ortólogo de tabaco *NtSOBIR1*.

Na tentativa de buscar identificar um possível papel funcional para o receptor *SISOBIR1*, uma árvore filogenética foi construída empregando diversas sequências de putativos LRR-RLKs de tomate e arabidopsis (Shiu & Bleeker, 2003; Shiu *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2012). A árvore obtida corroborou com a análise realizada por Sakamoto e colaboradores (2012) no qual verificaram que os receptores do tipo SOBIR1 agrupam-se em um ramo externo da árvore não sendo incluídos em nenhuma das subfamílias de LRR conhecidas. Neste estudo a análise filogenética demonstrou que o receptor *SISOBIR1* teve maior identidade com o receptor SOBIR1 de tabaco cuja função está relacionada com a transdução de sinais relacionados a resposta de hipersensibilidade e ao estresse mecânico (Takabatake *et al.*, 2006). Os dados obtidos também apontam para um possível papel do receptor *SISOBIR1* na resposta ao estresse mecânico em plantas de tomate. No entanto, este receptor apresentou comprovadamente alterações na sua expressão com a infecção viral, o que sugere que sua função não está restrita somente a uma resposta exclusivamente relacionada ao ferimento.

Com relação ao papel desempenhado por *SISOBIR1*, recentemente foi descrita a interação deste receptor com receptores de proteínas (RLPs) Cf-4 e Ve1 de tomate (também conhecidas como proteínas de avirulência –Avr) que ativam a resposta de hipersensibilidade e imunidade da planta a duas raças de fungos (Liebrand *et al.*, 2013a). Curiosamente, *SISOBIR1* foi capaz de interagir não só com RLPs envolvidos na imunidade da planta, mas

também com RLPs envolvidos no desenvolvimento vegetal, o que sugere que *SISOBIR1* atue como um regulador basal para diferentes tipos de receptores de superfície celular (Liebrand *et al.*, 2013a).

5- CONCLUSÕES

- ✓ O gene *SISOBIR1* é reprimido durante a infecção do tomateiro com o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV);
- ✓ O gene *SISOBIR1* é induzido durante a infecção do tomateiro com o *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV);
- ✓ O gene *SISOBIR1* é responsivo ao estresse mecânico;
- ✓ O gene *SISOBIR1* é expresso preferencialmente nas folhas;
- ✓ O receptor *SISOBIR1* está localizado na membrana plasmática da célula vegetal;
- ✓ O receptor *SISOBIR1* agrupa-se com os receptores *SOBIR1* de arabidopsis, tabaco e uva.

4- Capítulo 2:

Estudo funcional do gene que codifica o receptor SOBIR1 de tomate (*SISOBIR1*) empregando superexpressão em plantas de tabaco.

1-INTRODUÇÃO

Estudos recentes realizados com o gene *SISOBIR1* e seus ortólogos apontaram para algumas possíveis funções desempenhadas por este receptor (Gao *et al.*, 2009; Liebrand *et al.*, 2013a). Neste sentido, Liebrand e colaboradores (2013a) demonstraram que o receptor *SISOBIR1* interage com receptores de superfície celular diretamente envolvidos na resposta de defesa do tomate a duas raças diferentes de fungos. Os autores observaram que os mesmos interveem de maneira direta não só na resistência contra tais patógenos, mas também interagem com proteínas tipo receptores associados ao desenvolvimento da planta.

Diante das hipóteses de que o PepYMV poderia estar interferindo em alguma via de sinalização mediada por *SISOBIR1* e que o TCSV poderia estar ativando a sinalização dessa mesma via, este capítulo buscou investigar o efeito da superexpressão deste receptor frente a infecção com cada uma dessas espécies virais. Em paralelo procurou-se investigar a expressão de genes de defesa previamente selecionados e proceder à detecção de espécies reativas de oxigênio nas plantas com superexpressão. Neste caso, buscou-se correlacionar a expressão constitutiva do receptor com possíveis padrões de tolerância ou susceptibilidade das plantas a esses dois tipos de infecções virais.

2-MATERIAIS E MÉTODOS

2.1-Clonagem no vetor binário Gateway pK7WG2,0

Após a construção do vetor de entrada pENTR/D-TOPO[®]:*SISOBIR1* (item 2.19 – material e métodos capítulo 1), a região codificadora do gene *SISOBIR1* foi transferida para o vetor binário pK7WG2,0 (Figura 1 e 2), gerando uma construção que permite a superexpressão deste receptor em plantas transgênicas.

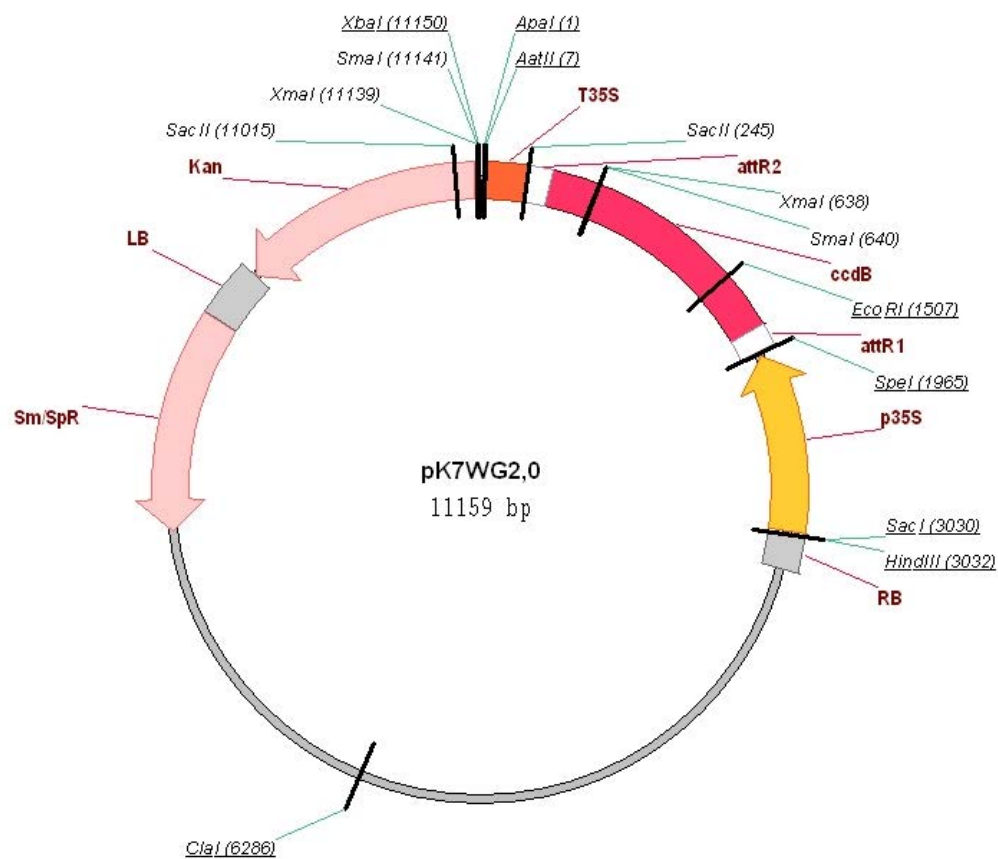


Figura 1. Representação esquemática do vetor binário pK7WG2,0 com a indicação dos sítios *attR*.



Figura 2. Diagrama esquemático da construção inserida no vetor pK7WG2,0 contendo a região codificadora do gene *SISOBIR1* sob controle do promotor (p35S) e sinais de terminação da transcrição (T35S) do CaMV. Can denota o gene *nptII* que confere resistência a canamicina, *attR2* e *attR1* são as regiões de recombinação homólogas.

Posteriormente realizou-se a transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* e a seleção dos transformantes, conforme descrito no item 2.21 (capítulo 1).

O DNA dos clones positivos foi então sequenciado, sendo o DNA plasmidial contendo o cassete de expressão (Figura 2) posteriormente usado para transformar cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404.

2.2-Esterilização e germinação das sementes de *Nicotiana tabacum*

Sementes de *N. tabacum* SR1 foram inicialmente esterilizadas passando por um período de incubação em água ultrapura autoclavada por 1 hora. Posteriormente, as sementes foram imersas (sobre agitação) em etanol 70% por 5 minutos, seguida de dois processos de lavagem com água ultrapura. As sementes foram incubadas em hipoclorito de sódio 50% por 1 minuto e lavadas quatro vezes em água ultrapura. As sementes foram transferidas para placas de Petri contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido. As placas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para frascos com meio novo a fim de obterem bom desenvolvimento.

2.3-Obtenção de plantas transgênicas de tabaco

Para a obtenção de plantas transgênicas de tabaco foi utilizado o protocolo descrito no “Manual de transformação genética de plantas modelos” da EMBRAPA (2002).

As agrobactérias transformadas com o cassete de expressão foram incubadas em 5 ml de meio LB líquido seletivo com agitação de 150 rpm a 28°C , até atingirem uma absorbância a 600 nm (A_{600}) de aproximadamente 1,5. A suspensão foi diluída até chegar a uma A_{600} de aproximadamente 0,1.

Para a transformação foram utilizados discos foliares retirados de plantas crescidas em condições estéreis como descrito acima (item 2.2). Aproximadamente 40 discos foliares foram utilizados. Os discos foram imersos por 10 minutos em meio LB contendo as agrobactérias sendo posteriormente secos em papel de filtro estéril e transferidos para placas contendo meio MS sólido, sendo mantidos com a face adaxial em contato com o meio. As placas foram mantidas no escuro por 48 horas a 28°C. Posteriormente, os discos foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS adicionado de BAP (citocinina 6-benzilaminopurina – 2 mg/L) e os antibióticos cefotaxina (300 mg/L) e canamicina (50 mg/μL) (meio de regeneração). Estas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz até o surgimento de calos.

Com o aparecimento dos primeiros calos nos discos foliares, estes foram transferidos das placas de Petri para frascos de vidro (devidamente esterilizados) também contendo meio de regeneração.

Os calos foram mantidos por 45 dias em meio de regeneração. Após esse período, as brotações derivadas dos calos foram individualmente transferidas para novos frascos contendo meio de enraizamento [meio MS adicionado de cefotaxina, ANA (ácido naftalenoacético (auxina) – 0,1 mg/L) e canamicina)] para formação das raízes.

Após o estágio de enraizamento, 26 plantas foram transferidas para copos de plástico de 300 mL contendo vermiculita e terra vegetal (na proporção 1:2) respectivamente e aclimatadas em caixas cobertas parcialmente com filme de PVC transparente. Após a aclimação, as plantas foram transferidas para vasos maiores e mantidas em estufa até a coleta das sementes.

2.4-Extração de DNA genômico

O DNA genômico das plantas transgênicas de tabaco foi extraído de folhas conforme protocolo de Konieczny *et al.*, (1993), parcialmente modificado. Para isso 100 mg de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. Esse material foi transferido para microtubos onde foi adicionado 500 μL do tampão de extração (100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 50 mM de EDTA pH 8,0; 500 mM de NaCl; 10 mM de β-Mercaptoetanol e água ultrapura autoclavada), sendo acrescido a este volume 70 μL de SDS 10%, seguida de agitação em agitador, com posterior incubação por 10 minutos a 65 °C. À amostra foram adicionados 216 μL de acetato de potássio 3 M (pH 5,5), sendo a mesma misturada por inversão e incubada por 5 minutos no gelo. Posteriormente centrifugou-se a

12.700 rpm por 10 minutos e transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos. Foram adicionados 640 µL de álcool isopropílico e 60 µL de acetato de sódio 3 M ao sobrenadante, seguido por uma incubação de 10 minutos a -20 °C, centrifugação por 15 minutos a 12.700 rpm e descarte do sobrenadante.

O precipitado foi dissolvido em 200 µL de TE pH 8,0, sendo a amostra centrifugada por mais 5 minutos a 12.700 rpm o sobrenadante foi transferido para novos microtubos acrescidos de 20 µL de acetato de sódio 3M e 440 µL de etanol 100%. Incubou-se por 10 minutos a -20 °C, centrifugou-se por 5 minutos a 12.700 rpm e descartou-se o sobrenadante. Ao precipitado acrescentou-se 500 µL de etanol 70%, centrifugou-se novamente por 5 minutos a 12.700 rpm e descartou-se o sobrenadante. O DNA genômico foi seco por aproximadamente 5 minutos em estufa a 37 °C, sendo então ressuspendido em 50 µL de água livre de nuclease, tratado com RNase e quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-Vis *Spectrophotometer*, *NanoDrop Technologies*).

2.5-Confirmação da inserção via PCR de DNA genômico

A verificação da inserção do cassete de expressão no genoma das 26 plantas regeneradas foi realizada através de PCR de DNA genômico. As reações foram preparadas em um volume de 25 µL contendo: 12,5 µL do reagente *GoTaq® Colorless Master Mix 2x* (Promega), 1 µL de DNA genômico (aproximadamente 200 ng/µL), 10,5 µL de água livre de nuclease e 0,5 µL dos oligonucleotídeos (10 mM). Os oligos, cujas sequências estão disponibilizadas na Tabela 1, pareiam, respectivamente, no promotor 35S e na região codificadora do receptor *SISOBIR1*, gerando um fragmento de aproximadamente 2015 pb. Os controles utilizados foram: DNA plasmídial contendo o cassete de expressão (controle positivo), DNA genômico extraído de planta de tabaco selvagem (WT) e água livre de nuclease como controles negativos.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para confirmação da inserção do cassete nas plantas de tabaco transformadas.

Gene	Sequências de Oligonucleotídeos
<i>P35S</i>	<i>F.</i> 5' ACA ATC CCA CTA TCC TTC 3'
<i>SISOBIR1</i>	<i>RLKrc R</i> 5'CTA ATG CTT GAT CTG AGT TAA CAT GC 3'

Nas amplificações os parâmetros utilizados foram: desnaturação inicial (5 minutos / 95°C) seguida de um ciclo básico de desnaturação (30 segundos/ 94°C), de anelamento (45 segundos / 56,4°C), etapa de polimerização (2 minutos e 30 segundos / 72°C,) e extensão final (10 minutos / 72°C). Os produtos amplificados na PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, observados em transiluminador ultravioleta e fotografados.

2.6-Extração de RNA total das plantas transgênicas

Dentre as plantas que apresentaram a inserção do cassete algumas foram selecionadas para a extração do RNA total visando confirmar a expressão do transgene. O RNA foi extraído a partir de folhas maceradas em nitrogênio líquido empregando o protocolo descrito por Korimbocus *et al.*,(2002). Os procedimentos de quantificação, análise da integridade, tratamento com DNaseI e produção de cDNA, foram realizados como descrito nos itens 2.4 a 2.7 do Capítulo 1.

2.7-Quantificação da expressão relativa do gene *SISOBIR1* nas plantas de tabaco transgênicas

A técnica de PCR em tempo real foi empregada para quantificar a expressão relativa do gene *SISOBIR1* em 6 plantas transgênicas de tabaco (T0) correspondentes a eventos independentes de transformação. As reações foram preparadas de acordo com o item 2.10 (Capítulo 1), o normalizador empregado foi o gene que codifica uma Actina em tabaco (0,15 µL a 10 mM) oligos: *F.* 5' AGC CAA AAT AGA ACC TCC AAT CCA A 3' e *R.* 5' TTT CCT GGA ATT GCT GAT AGG ATG A 3'.

2.8-Seleção de eventos de transformação para experimentos posteriores

As plantas correspondentes aos três eventos de transformação com maiores níveis de expressão do gene *SISOBIR1* (denominadas T-1, T-2 e T-6) foram selecionadas para a realização dos ensaios posteriores. Para tal, as sementes foram coletadas e armazenadas.

2.9-Inoculação das plantas transgênicas com PepYMV e análise da acumulação viral

Sementes dos referidos eventos de transformação foram inicialmente germinadas em vasos de tamanho pequeno contendo uma mistura de vermiculita e solo (1:2). Após a

germinação, as plântulas foram transferidas para novos vasos, em uma quantidade de 3 plantas/vaso, totalizando 24 vasos por evento de transformação analisado. Além dos transformantes também foram semeadas sementes de tabaco selvagem não transformado para serem usadas como controle. Todas essas plantas foram mantidas em casa de vegetação em condições controladas e tiveram a inserção do cassete de expressão reconfirmada por PCR convencional empregando DNA genômico extraído conforme protocolo descrito por Edwards *et al.*, (1991) com modificações.

As plântulas dos 3 eventos de transformação, bem como do controle não transformado, foram separadas em parcelas contendo 6 plantas cada. Todas as plantas de uma parcela tiveram suas folhas inoculadas mecanicamente (via EVT) empregando extrato de tabaco selvagem infectado com o isolado 304 do PepYMV. As 6 plantas da outra parcela tiveram suas folhas inoculadas apenas com a mistura de tampão com abrasivo (controle mock); enquanto que as 6 plantas da última parcela foram mantidas sem nenhum tipo de inoculação nas folhas (NT) para constituir o controle negativo. Todas as plantas foram mantidas dentro de gaiolas antiafídicas em casa de vegetação sobre condições controladas.

A acumulação viral nas plantas inoculadas e nos diferentes controles (mock e NT) foi determinada usando folhas coletadas a 72h, 7, 14 e 21 dias após a inoculação (dpi). O material foliar foi acondicionado a 4°C, sendo posteriormente maceradas em tampão de extração segundo protocolo da técnica de ELISA indireto.

Paralelamente, as 12 plantas restantes de cada evento de transformação foram tratadas, respectivamente, com uma mistura de tampão com abrasivo (6 plantas) e não tratadas para constituir o controle negativo. O mesmo foi realizado com as plantas de tabaco não transformadas. A coleta das folhas tratadas e não tratadas foi realizada após 1, 3 e 6 horas. Para a extração do RNA total foram obtidos *pools* de amostras de 6 folhas de cada evento de transformação para cada tempo de coleta, sendo que o mesmo foram extraído utilizando o protocolo de extração de RNA por CTAB. A quantificação, análise da integridade, tratamento com DNaseI e produção de cDNA foram realizados conforme descritos nos itens 2.4 a 2.7 do capítulo 1.

2.10-Teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) indireto

Para verificar a acumulação do PepYMV nas plantas de tabaco foi utilizado o teste de ELISA indireto empregando um anti-soro universal anti-potyvirus (Agdia). As amostras de folhas (0,18 g) foram inicialmente maceradas em tampão de extração *Indirect*

Sample Extraction 1X [1,59 g de Na_2CO_3 ; 2,93 g de NaHCO_3 ; 0,2 g de NaN_3 ; 20 g de Polyvinylpyrrolidona (PVP) dissolvidos em 1000 mL de água destilada, pH 9,6] na proporção 1:10. Cem μL do macerado foram adicionados a cada cavidade da placa de poliestireno, a qual foi incubada por 2 horas a 4°C. Após este período, a placa foi lavada 7 vezes com tampão PBS-Tween 1X (8,0 g de NaCl; 1,15 g de Na_2HPO_4 ; 0,2 g de KH_2PO_4 ; 0,2 g de KCl; 500 μL de Tween 20 dissolvidos em 1000 mL de água destilada obtendo uma solução final com pH 7,4). Adicionou-se o anticorpo primário (anti-poty) diluído (1:200) em tampão ECI 1X (2,0 g de albumina bovina; 20 g de PVP, 0,2 g de azida de sódio dissolvidos em 1000 mL de água destilada com pH 7,4), sendo a placa incubada por 16 horas a 4°C. O ciclo de 7 lavagens em tampão PBS-Tween (1X) foi repetido. Após as lavagens, o anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina (anti-mouse IgG) diluído (1:200) em tampão ECI (1X) foi adicionado e a placa incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Um novo ciclo de 7 lavagens com PBS-Tween (1X) foi repetido. A revelação foi realizada utilizando-se p-nitrofenilfosfato em pastilha de 5 mg, diluída em 5 mL de tampão PNP (1X) (0,1 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de azida de sódio; 97 mL de dietanolamina dissolvidos em 1000 mL de água destilada obtendo uma solução final com pH 9,8). A leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Plus *Version* 2.03) usando uma absorbância a 405 nm. Foram consideradas positivas as amostras com valor de absorbância pelo menos três vezes maior que o obtido para as plantas saudáveis.

Os dados obtidos por ELISA foram submetidos a teste de homogeneidade de variâncias (Levene) e atendendo as pressuposições estatísticas foram submetidos à análise de variância ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Todas essas análises foram realizadas no programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*) versão 9.0.

2.11-Análise do acúmulo viral de TCSV por qPCR em plantas de tabaco transgênicas

Sementes de tabaco da geração T2 dos eventos de transformação T-1, T-2 e T-6, bem como sementes de tabaco selvagem, foram semeadas em solo autoclavado com substrato e mantidas em casa de vegetação. Após 12 dias de semeio, as plântulas resultantes foram individualizadas, totalizando 48 plantas, as quais foram separadas em 2 parcelas contendo três plantas para cada evento de transformação e controle selvagem. O segundo par de folhas completamente expandido das plantas de uma das parcelas foi inoculado mecanicamente (via EVT) com extrato de planta infectada com o isolado de TCSV, enquanto que as plantas da

outra parcela foram mantidas sem nenhum tipo de inoculação nas folhas (plantas NT) para constituir o controle negativo. As plantas foram mantidas dentro de gaiolas antiafídicas em casa de vegetação sobre condições controladas.

As folhas das plantas inoculadas com TCSV e não inoculadas (NT) foram coletadas a 72h, 7 e 14 dias após a inoculação (dpi). Essas foram imediatamente colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C , para posterior extração de RNA total empregando o kit de extração *Total RNA Purification* (Norgen) de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida os RNAs foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-Vis *Spectrophotometer*, *NanoDrop Technologies*), tratados com DNase e os cDNAs foram produzidos utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante. Estes cDNAs foram empregados na análise de PCR em tempo real para verificar a acumulação viral.

A quantificação relativa da carga viral de TCSV foi realizada utilizando um método de curva padrão ou curva de diluição seriada para processamento em tempo real de dados de PCR relativa (Larionov *et al.*, 2005). Para tal, oligonucleotídeos vírus-específicos (Tabela 2) foram desenhados com base na sequência de nucleotídeos do isolado de TCSV usado na inoculação. As sequências genômicas foram fornecidas pelo Laboratório de Virologia Vegetal, do Departamento de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP – Botucatu.

As reações foram preparadas em duplicatas para um volume total de 10 μL utilizando 0,15 μL (10 mM) de ambos os oligonucleotídeos: o específico para o TCSV e aqueles usados para amplificar o gene 18S (Tabela 2) usado como normalizador. As amplificações (ciclagem e temperaturas) foram realizadas de acordo com o item 2.10 (capítulo 1).

Tabela 2. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para a quantificação relativa do número de cópias do vírus TCSV bem como para amplificação do normalizador empregado nas reações de PCR em tempo real.

Alvo	Sequências de Oligonucleotídeos
TCSV	TCSV-F. 5' CACATTGCCAGGATAAGTAACG 3' TCSV-R. 5' AGTGTAGATCTAGACCGCTC 3'
18S	F. 5' AGGAATTGACGGAAGGGCA 3' R. 5' GTGCGGCCCAAGAACATCTAAG 3'

A quantidade viral relativa presente em uma amostra de planta selvagem escolhida aleatoriamente e coletada aos 7 dpi, período no qual a infecção viral já se tornou sistêmica, foi normalizada com a expressão do gene 18S (amostra calibrador). Em cada placa, uma curva padrão foi realizada utilizando diluição serial de dez vezes (até 10^6) de ambos os cDNAs utilizados como molde nas reações de qPCR.

A quantidade basal relativa do vírus presente na amostra de planta selvagem coletada aos 7 dpi recebeu o valor relativo de 0,1 e as concentrações em todas as amostras foram normalizadas proporcionalmente. Para tal utilizou-se das seguintes equações:

$$\text{Alvo Normalizado (amostra teste)} = \frac{\text{Alvo}}{\text{Controle Endógeno}}$$

$$\text{Alvo Normalizado (amostra calibrador)} = \frac{\text{Calibrador}}{\text{Controle Endógeno}}$$

Os valores dos alvos normalizados são divididos para calcular a diferença de vezes na quantidade dos alvos entre as amostras testes e a amostra calibrador, da seguinte forma:

$$\text{Diferença de vezes no alvo} = \frac{\text{Alvo Normalizado (amostra)}}{\text{Alvo Normalizado (amostra calibrador)}}$$

2.12-PCR em tempo real para verificação do nível de expressão de proteínas relacionadas à patogenicidade (*pathogenesis related proteins* – PRs) em plantas de tabaco transgênicas

O acúmulo de transcritos dos genes *PR-1* e *PR-6* (PI-II), que codificam proteínas (básicas) relacionadas à resposta a ferimento e defesa, nas plantas de tabaco transgênicas (evento de transformação T1) foi determinado por RT-qPCR. As reações foram preparadas de acordo com o item 2.10 (capítulo 1) utilizando 0,25 μ L (10 mM) dos oligonucleotídeos referentes às respectivas PRs e como normalizador o gene da Actina (0,15 μ L a 10 mM) (Tabela 3).

O acúmulo de transcritos do gene endógeno que codifica o receptor *WRK* (wound-induced receptor-like protein kinase) de tabaco, recentemente nominado *NtSOBIR1*, foi determinado em paralelo.

Tabela 3. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para verificação da expressão relativa dos genes *PR-1*, *PR-6* e *WRK* nas plantas de tabaco transgênicas submetidas a fermento. O gene que codifica uma Actina foi utilizado como normalizador das reações.

Gene	Sequências de Oligonucleotídeos
<i>PR-1</i>	F. 5' GTC CAT ACT AAT TGA AAC GAC CTA C 3' R. 5' CCA CTT CAG AGG ATT ACA TAT ATA GTA C 3'
<i>PR-6</i>	F. 5' ATG GCG AGT TTG TTT GTG AAG 3' R. 5' ACC CTT GTC TGC GTT ACA AC 3'
<i>WRK</i>	F. 5' GGA ACT TTG TCT CCT GCC ATT G 3' R. 5' CCC AGA AAA CAG ATT GTT TCC AAG 3'
<i>Actina</i>	F. 5' AGC CAA AAT AGA ACC TCC AAT CCA A 3' R. 5' TTT CCT GGA ATT GCT GAT AGG ATG A 3'

2.13-Detecção de íons superóxido em folhas de tabaco

Para a detecção dos íons superóxido (O_2^-), folhas de plantas de tabaco transgênicas (eventos de transformação T-1, T-2 e T-6 – geração T2) e folhas de tabaco selvagem foram utilizadas. As plantas em estudo foram germinadas em vasos de tamanho pequeno contendo uma mistura de vermiculita e solo (1:2), em uma quantidade de 2 plantas/vaso, totalizando 8 vasos. Essas plantas foram mantidas em casa de vegetação em condições controladas. Aproximadamente três semanas após a germinação, as folhas dessas plantas foram feridas com um pinça e avaliadas quanto à presença das espécies reativas de oxigênio em 1, 3 e 6 horas após o ferimento, sendo as coletas sempre realizadas da mesma planta. Para a avaliação da presença de superóxido, quatro folhas de cada planta transgênica e selvagem, respectivamente, foram coletadas e infiltradas a vácuo durante 10 minutos em uma solução contendo 0,5 mg/mL de NBT (tetrazólio nitroblue) em tampão HEPES 25 mM, pH 7,6. As folhas foram mantidas na solução em temperatura ambiente e no escuro por duas horas. Em seguida, as folhas foram lavadas por diversas vezes em álcool 80% para a retirada da clorofila das amostras.

3- RESULTADOS

3.1-Confirmação da inserção do cassete de expressão

A região codificadora do gene *SISOBIR1* inserida no vetor de entrada (pENTR/D-TOPO®) foi transferida para o vetor binário pK7WG2,0 para superexpressão. Plantas de tabaco (*N. tabacum* SR1) foram então transformadas e regeneradas.

Para confirmar a inserção do cassete de expressão nas plantas regeneradas procedeu-se a extração de DNA genômico. Para tal foram utilizadas folhas coletadas de plantas correspondentes a 26 eventos de transformação independentes e oligonucleotídeos complementares ao promotor 35S (P35S) e à região codificadora de *SISOBIR1*. Dos 26 eventos de transformação analisados, 19 apresentaram amplificação do fragmento de tamanho esperado ($\cong 2015$ pb), confirmando, portanto, a inserção do cassete (Figura 3).

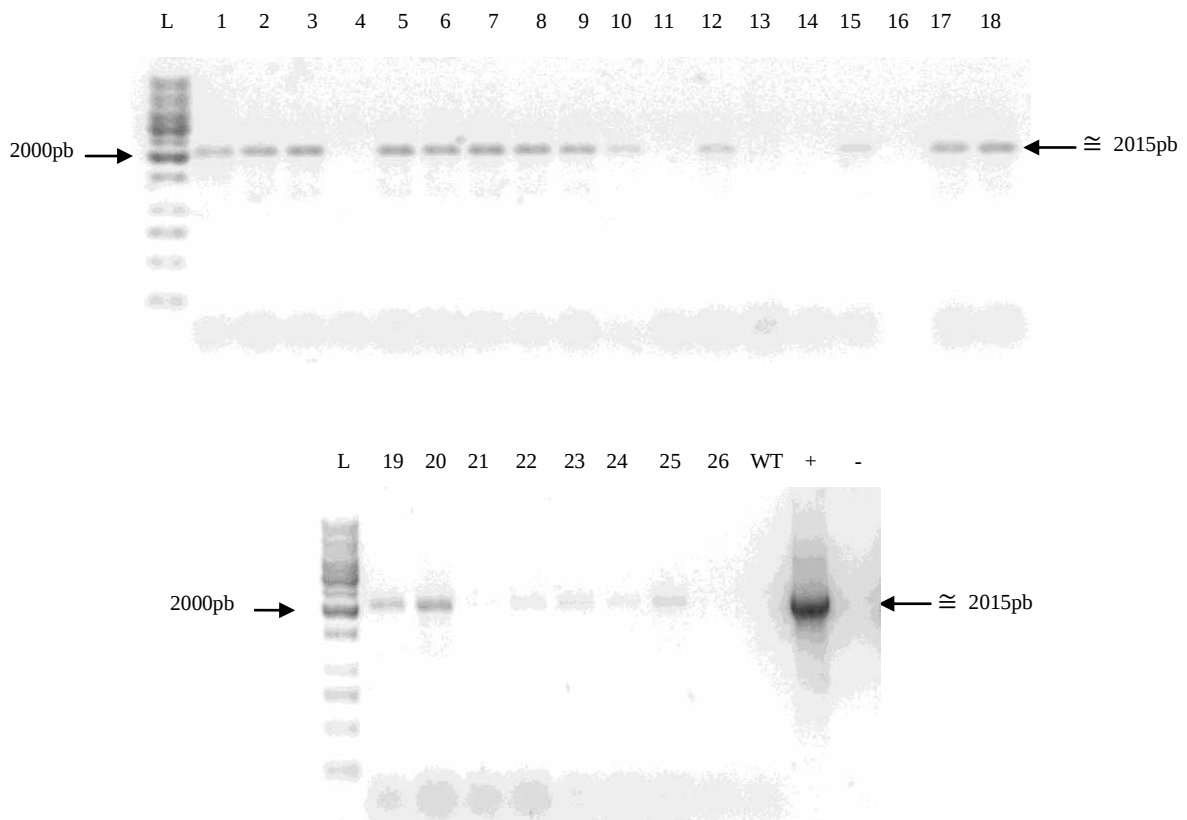


Figura 3. Amplificação por PCR do cassete de expressão nas diferentes linhagens transgênicas de tabaco selecionadas (numeradas 1 a 26). Controle negativo - tabaco selvagem não transformado (WT); Controle positivo - vetor com a região codificadora do gene *SISOBIR1* de tomate (+); Controle negativo - água (-); L (Marcador molecular de 1Kb).

3.2-Expressão do transgene nas plantas de tabaco transformadas

Das 19 plantas que apresentaram a inserção do cassete de expressão, seis foram selecionadas aleatoriamente para verificar a expressão do transgene. A expressão relativa foi determinada por RT-qPCR utilizando-se oligonucleotídeos complementares à região codificadora de *SISOBIR1*. Os resultados obtidos evidenciaram que todas as plantas analisadas apresentavam expressão do transgene (Figura 4). Dentre os eventos de transformação analisados, os eventos denominados T-1, T-2 e T-6 foram os que apresentaram maiores níveis de transcritos do gene alvo. A expressão em planta WT (tabaco selvagem não transformado) foi verificada, porém nenhuma expressão do transcrito foi observada devido ao uso na reação de oligonucleotídeos específicos para a região codificadora de *SOBIR1* de tomate.

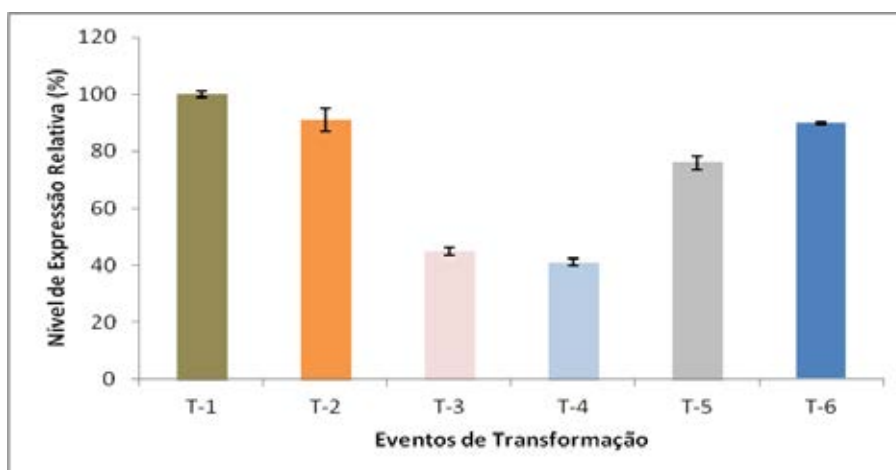


Figura 4. Expressão relativa do gene que codifica o receptor *SISOBIR1* em plantas de tabaco transgênicas. Os valores de expressão gênica relativa são mostrados como porcentagem do nível mais elevado de expressão detectado em planta transgênica individual (100%). Os resultados de expressão relativa foram normalizados contra o gene da Actina.

3.3-Acumulação de PepYMV nas plantas transgênicas e selvagens de tabaco

A acumulação do PepYMV nas plantas de tabaco inoculadas foi determinada empregando ELISA indireto e anti-soro universal para potyvirus. Para tal foram coletadas folhas de todas as plantas (eventos de transformação e plantas selvagens), dos 3 tratamentos (inoculadas com vírus, controle mock e plantas não tratadas) nos diferentes tempos.

O aparecimento de sintomas (mosaico) nas plantas transformadas (T-1, T-2 e T-6) e selvagens (não transformado) inoculadas com o vírus foi observado aos 14 dpi. Os sintomas

observados nas folhas das plantas transgênicas foram semelhantes àqueles observados nas plantas selvagens, não sendo possível identificar uma predominância de sintomas nestes dois grupos. Como o esperado, nenhuma das plantas do controle mock e do controle sem inoculação desenvolveram sintomas (Figura 5).

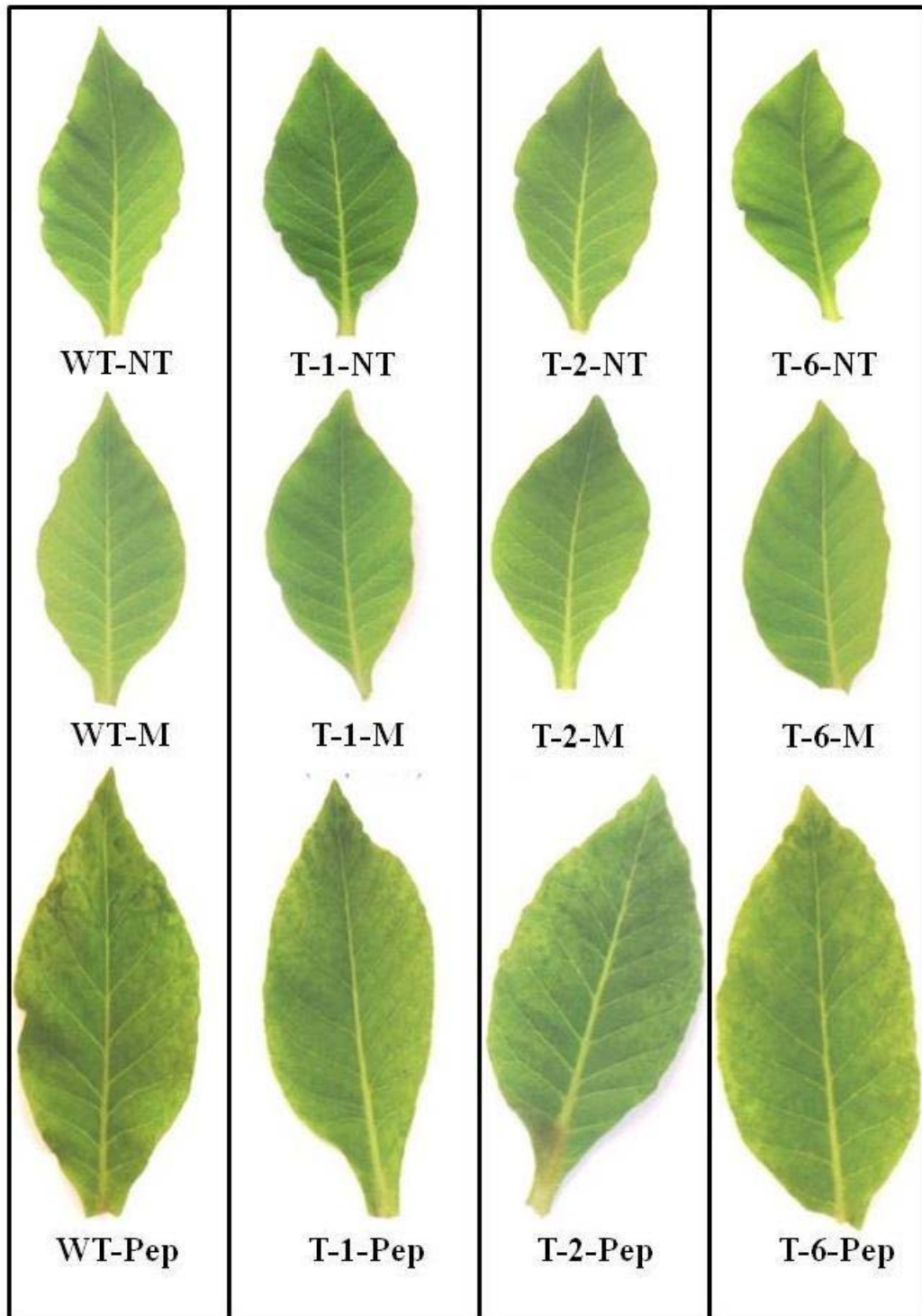


Figura 5. Sintomas observados aos 14 dpi em folhas de tabacos transgênicos capazes de superexpressar o gene *SISOBIR1* de tomate e tabaco selvagem (WT) inoculadas com o PepYMV. NT (não tratadas) e M (inoculação mock).

Corroborando essa sintomatologia, o teste ELISA confirmou a infecção das plantas inoculadas com o vírus bem como a ausência de infecção nas plantas dos controles mock e não inoculado.

Os valores médios de absorbância obtidos nos extratos foliares provenientes dos 3 eventos de transformação e das plantas de tabaco selvagem (não transformado) inoculadas com o PepYMV foram então plotados em gráfico e submetidos a análise estatística (Figura 6).

Os dados obtidos não revelaram variação significativa na acumulação viral entre as amostras controle e transgênicas a 72 hpi, muito embora os transformantes T-2 e T-6 diferiram estatisticamente entre si (Figura 6). Aos 7 dpi, a acumulação viral foi significativamente maior no controle não transformado do que nos transformantes T-2 e T-6, porém não diferiu significativamente do transformante T-1. O transformante T-6 foi o que apresentou menor acumulação viral neste período, diferindo dos demais (Figura 6). Aos 14 dpi, a acumulação viral foi significativamente menor no transformante T-2, porém nenhuma diferença significativa foi observada para as demais amostras analisadas (Figura 6). Para o tempo de 21 dpi, a acumulação viral foi significativamente menor no controle não transformado se comparada com os transformantes T-1 e T-6. Por outro lado, a acumulação viral na planta selvagem foi similar àquela detectada para o transformante T-2 (Figura 6).

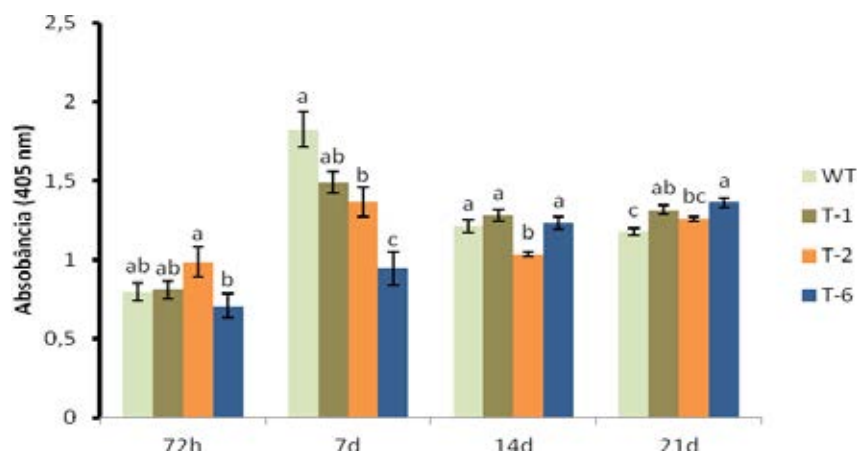


Figura 6. Detecção do PepYMV em plantas transgênicas de tabaco capazes de superexpressar o receptor *SISOBIR1*. Eventos de transformação independentes foram analisados (T-1, T-2 e T-6); (WT) plantas selvagens não transformadas. Letras diferentes indicam variação significativa segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.4-Acumulação do TCSV nas plantas de tabaco transgênicas

A acumulação de TCSV nas plantas de tabaco capazes de superexpressar o receptor *SISOBIR1* foi verificada empregando a técnica de PCR em tempo real devido a indisponibilidade de um anti-soro para esse vírus. Para as análises foram utilizadas folhas coletadas de todas as plantas (eventos de transformação e plantas selvagens) dos 2 tratamentos (inoculadas com vírus e plantas não tratadas) nos diferentes tempos. As plantas que não foram inoculadas (NT) foram avaliadas somente no tempo de 72 hpi.

Nenhum sinal de amplificação pode ser evidenciado durante a qPCR quando amostras provenientes de plantas NT foram usadas, demonstrando que as mesmas não se encontravam infectadas (Figura 7). Confirmando essa observação, nenhum produto de amplificação foi observado quando uma alíquota da duplicata de reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 8).

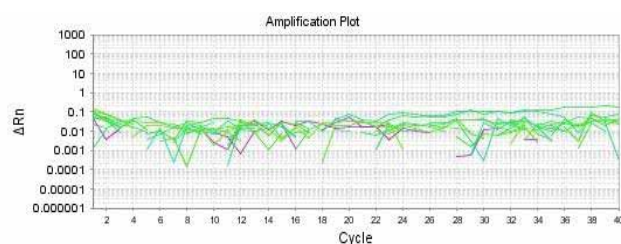


Figura 7. Plot da amplificação obtido usando amostras de plantas não inoculadas (NT).

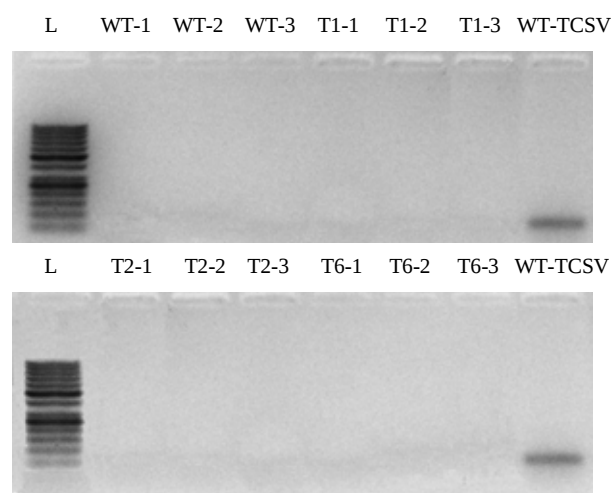


Figura 8. Amplificação do vírus TCSV nas plantas não inoculadas (NT). Amostras provenientes de plantas selvagens (WT) ou de diferentes eventos de transformação (T-1, T-2 e T-6); Controle positivo – planta selvagem infectada pelo TCSV; L (Marcador molecular de 50 pb).

A determinação da carga viral relativa nas plantas selvagens e transformadas (superexpressando o receptor) a 72 hpi não revelou diferenças entre elas (Figura 9). Aos 7 dpi verificou-se um aumento da carga viral em todas as plantas analisadas (Figura 9), sendo este aumento, entretanto, mais expressivo nos transformantes T-2 e T-6 (de 7 e 9x, respectivamente, quando comparado com a carga viral determinada a 72 hpi). Um aumento

subsequente na carga viral foi observado em todas as plantas analisadas aos 14 dpi. Este aumento foi uniforme e a carga viral aparenta ter atingindo níveis máximos neste ponto, uma vez que a partir desse período de infecção, as plantas já começam a apresentar definhamento.

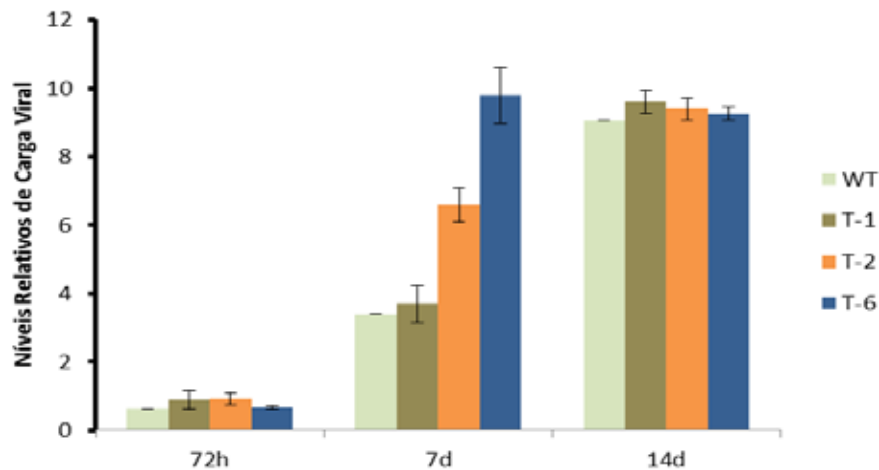


Figura 9. Carga viral relativa de TCSV presente nas plantas transgênicas de tabaco capazes de superexpressar o receptor *SISOBIR1*. Eventos de transformação independentes foram analisados (T-1, T-2 e T-6); (WT) planta selvagem não transformada. Os valores das amostras encontram-se relacionadas à amostra calibrador que recebeu o valor relativo de 0,1.

O aparecimento de sintomas nas plantas transgênicas (T-1, T-2 e T-6) e selvagens (não transformadas) inoculadas com o TCSV foi observado aos 14 dpi, sendo estes muito mais severos do que aqueles observados quando da inoculação com PepYMV. No caso do TCSV, os sintomas observados incluíram: paralisação do crescimento das plantas, manchas em forma de anéis concêntricos, deformação foliar severa, clorose, mosqueado e necrose intensa, não sendo possível identificar uma predominância desses sintomas entre estes dois grupos. Como o esperado, todas as plantas que não sofreram inoculação não desenvolveram sintomas (Figura 10).

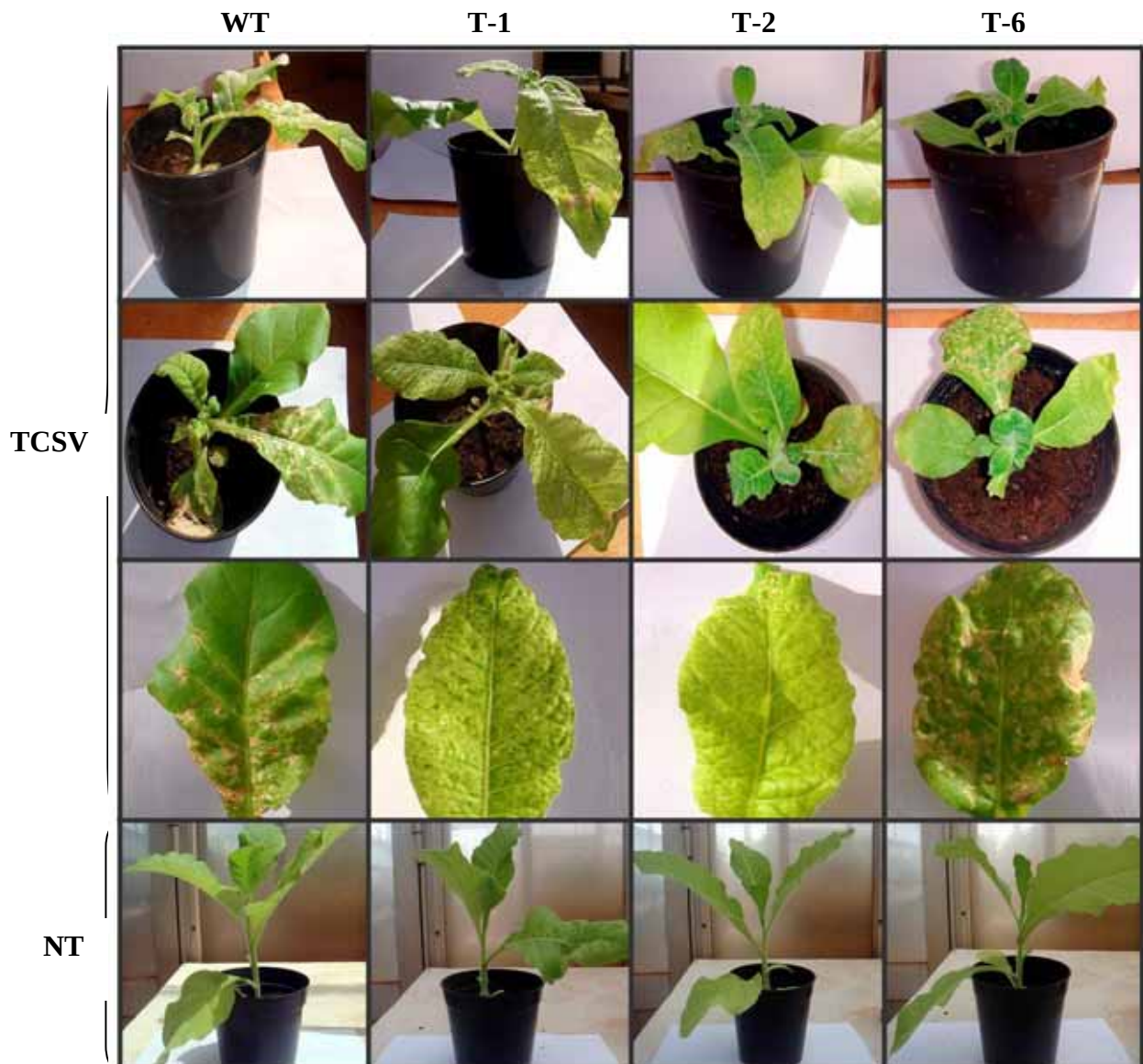


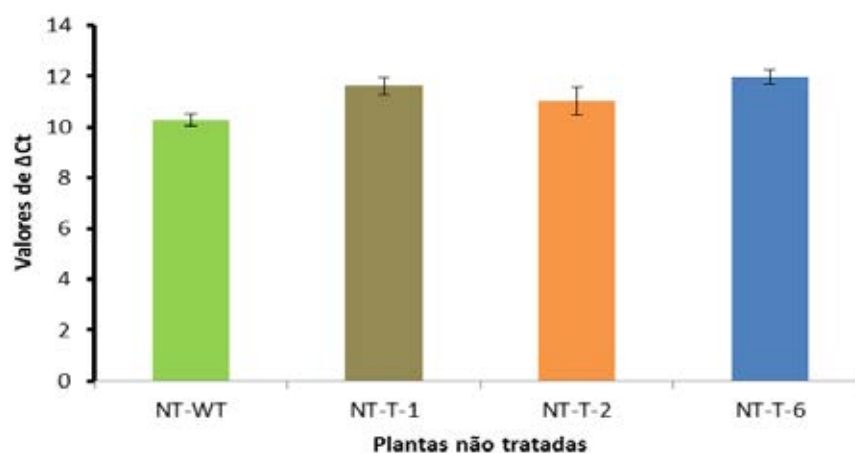
Figura 10. Sintomas observados aos 14 dpi em folhas de tabacos transgênicos capazes de superexpressar o gene *SISOBIR1* e de tabaco selvagem (WT), respectivamente, inoculadas com TCSV. NT (plantas não tratadas ou inoculadas).

3.5-Análise da expressão gênica de proteínas relacionadas à patogenicidade (PRs)

Tendo em vista que plantas que superexpressam o receptor SOBIR1 de *arabidopsis* apresentam um aumento na expressão de genes codificadores de proteínas de defesa PR (*PR-1* e *PR-2*) (Gao *et al.*, 2009), uma análise foi empreendida para verificar se a expressão de algum destes genes poderia estar alterada nas plantas transgênicas de tabaco geradas no presente estudo em resposta a ferimento.

A figura 11A mostra que não foi observada diferença significativa entre os valores de ΔC_t obtidos durante a amplificação do gene *PR-1* em plantas de tabaco selvagem e transgênicas não submetidas a estresse. Contudo, a análise de expressão relativa do gene *PR-1* revelou um significativo aumento de expressão do gene alvo ($P < 0,05$) em todas as plantas tratadas com a mistura de tampão e abrasivo (Figura 11B). Variações temporais no perfil de expressão do gene alvo foram observadas nas plantas do evento de transformação T-1, sendo um pico de acumulação de transcritos observado 1 hora após a aplicação do estresse, com posterior redução nos demais tempos até atingir um nível basal. Nas plantas de tabaco selvagem e nas do evento de transformação T-6, um aumento significativo no nível de transcritos do gene *PR-1* foi verificado 3 h após o ferimento, sendo que nas plantas T-6 este aumento foi aproximadamente 50 vezes menor do que o ocorrido nas plantas de tabaco selvagem. As plantas do evento de transformação T-2 foram as que apresentaram o aumento dos níveis de transcrito mais tardiamente (6 h).

11A



11B

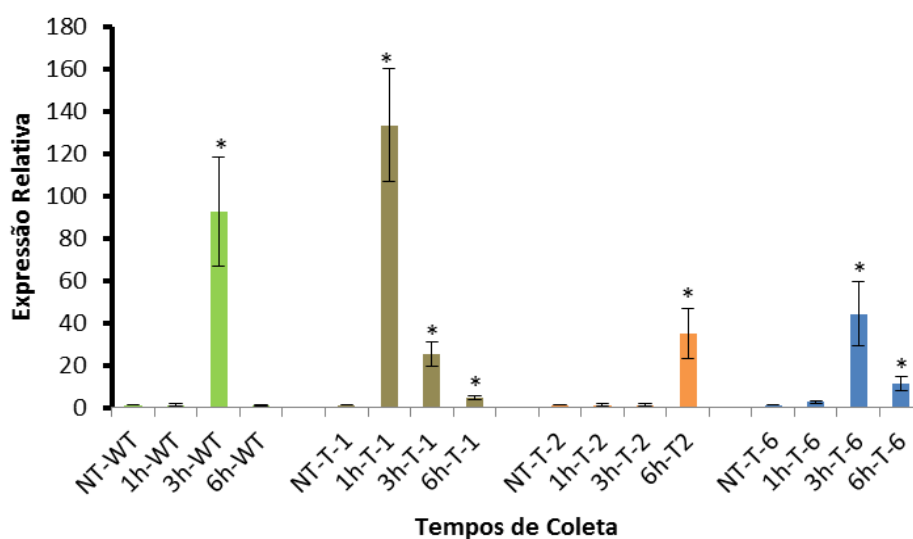
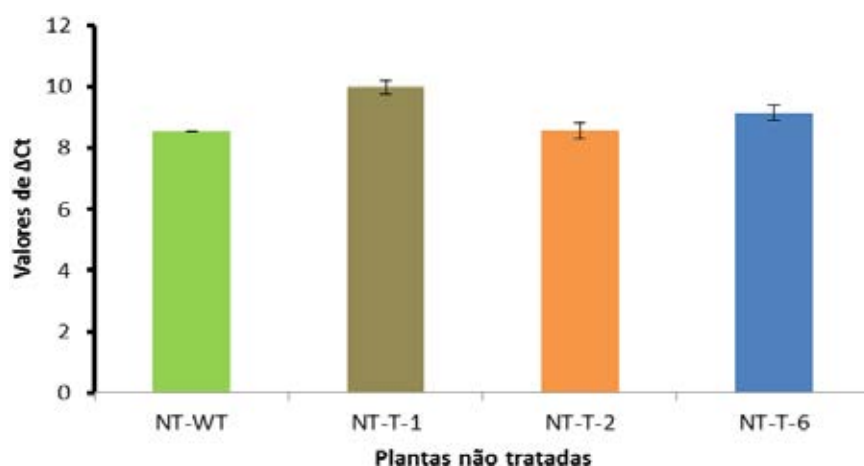


Figura 11. A: Valores de ΔC_t obtidos na amplificação do gene *PR-1* em plantas não estressadas de tabaco selvagem e transgênicas. **B:** Expressão relativa do gene *PR-1* de tabaco em *pools* de 6 plantas submetidas a ferimento e abrasivo. Amostra NT (amostras de tabaco não tratadas); WT – tabaco selvagem tratado; T-1, T-2 e T-6 – eventos de transformação tratados. Coletas 1, 3 e 6 horas. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação aos controles não tratado, com $P < 0,05$.

De forma semelhante ao ocorrido na análise do gene *PR-1*, a Figura 12A demonstra que em condições não estressantes não foi observada diferença significativa nos valores de ΔC_t obtidos durante a amplificação de *PR-6* em plantas de tabaco selvagem e transgênicas.

Por outro lado, em todas as plantas tratadas com a mistura de tampão com abrasivo (mock) foi verificado um aumento significativo da expressão ($P < 0,05$) de *PR-6* (PI-II) (Figura 12B). Nas plantas do evento de transformação T-2 e nas plantas de tabaco selvagens a elevação dos níveis dos transcritos foi detectada ao longo das horas, com um pico de expressão ocorrendo 6 horas após a aplicação do estresse. Nas plantas do evento de transformação T-1, os níveis de transcritos do gene *PR-6* aumentaram após 1 hora do tratamento mantendo-se elevados nos demais tempos de análise. Já nas plantas do evento de transformação T-6, o nível de transcritos elevou-se 1 hora após o ferimento, e um pico de expressão foi observado em 3 horas. Neste caso, diferentemente do que ocorreu nas plantas dos outros eventos de transformação (T-1 e T-2) e nas plantas selvagens, uma redução na expressão foi observada no tempo de 6 horas (Figura 12B).

12A



12B

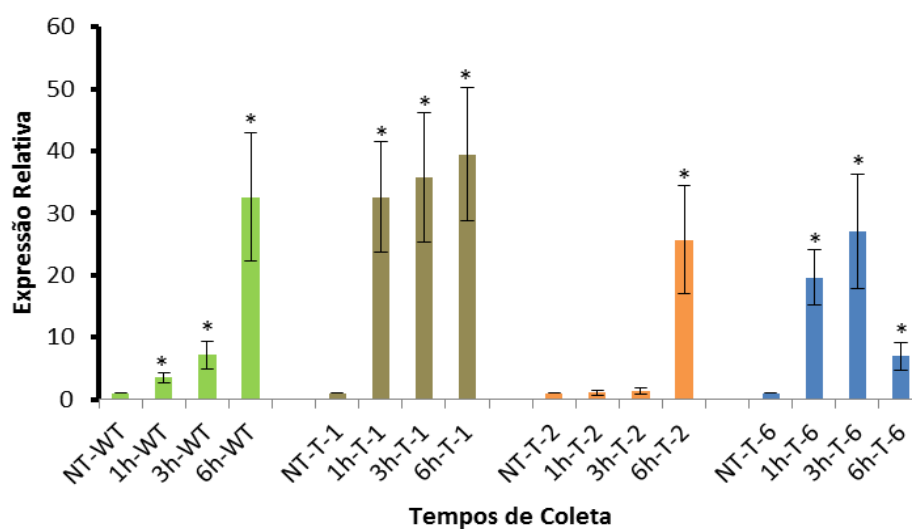


Figura 12. A: Valores de ΔC_t obtidos na amplificação do gene *PR-6* em plantas não estressadas de tabaco selvagem e transgênicas. **B:** Expressão relativa do gene *PR-6* de tabaco em *pools* de 6 plantas submetidas a ferimento e abrasivo. Amostra NT (amostras de tabaco não tratadas); WT – tabaco selvagem tratado; T-1, T-2 e T-6 – eventos de transformação tratados. Coletas 1, 3 e 6 horas. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação aos controles não tratados com $P < 0,05$.

Com base nos resultados obtidos nesses experimentos pode-se concluir que em todas as amostras analisadas observou-se um aumento da expressão dos genes *PR-1* e *PR-6* em resposta ao ferimento provocado pelo uso de abrasivo, sendo que pequenas variações temporais puderam ser notadas.

Por outro lado, o perfil de expressão do gene endógeno *NtSOBIR1* (*WRK*) foi bastante similar entre plantas transgênicas e selvagens apresentando um pico de expressão no tempo de 1 hora pós-tratamento, com posterior redução da expressão relativa nos demais tempos (Figura 13). Esse resultado indica a efetividade do tratamento realizado uma vez que *WRK* é relatado como sendo induzido por ferimento (Ito *et al.*, 2002; Takabatake *et al.*, 2006). Cabe ressaltar que as proteínas *S/SOBIR1* e *NtSOBIR1* apresentam 82% de identidade.

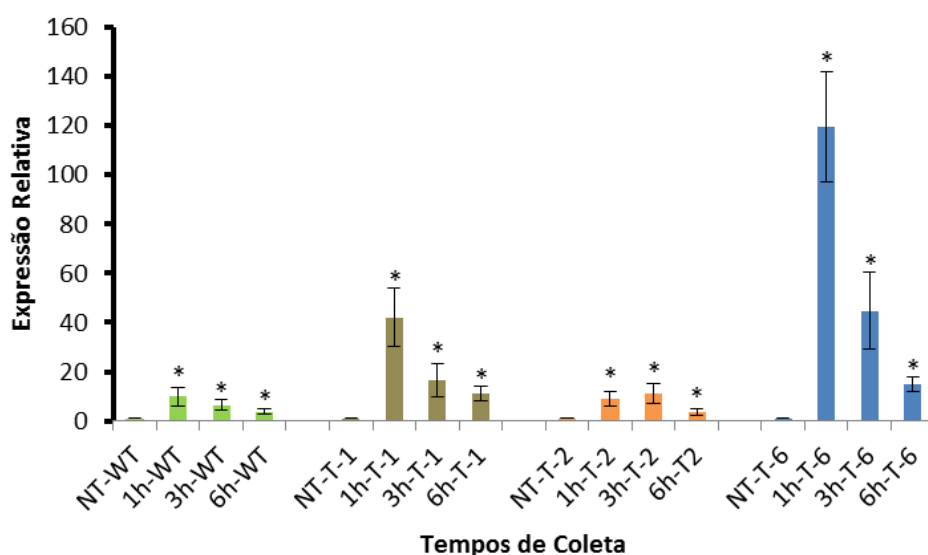


Figura 13. Expressão relativa do gene que codifica o receptor *WRK* de tabaco em *pools* de 6 plantas submetidas a ferimento com abrasivo. Amostra NT (amostras de tabaco não tratadas); WT – tabaco selvagem tratado; T-1, T-2 e T-6 – eventos de transformação tratados. Coletas 1, 3 e 6 horas. Os asteriscos indicam expressão diferencial significativa em relação aos controles não tratados com $P < 0,05$.

3.6-Detecção de superóxido em folhas de tabaco

A detecção de íons superóxido nas folhas das plantas selvagens e transgênicas submetidas a ferimento, no tempo de 1 hora, revelou uma maior concentração de superóxido nas folhas da planta transgênica (Figura 14 B), próximo ao local de ferimento, se comparada

com a folha da planta selvagem (Figura 14 A). A ocorrência de uma coloração azul mais intensa junto ao local da lesão pode ser observada nas folhas transgênicas (Figura 14B), enquanto essa coloração foi mais dispersa na folha selvagem. Por outro lado, nos demais tempos avaliados (3 e 6 horas após o ferimento), observou-se uma distribuição generalizada da coloração azul pelas folhas não permitindo uma distinção efetiva.

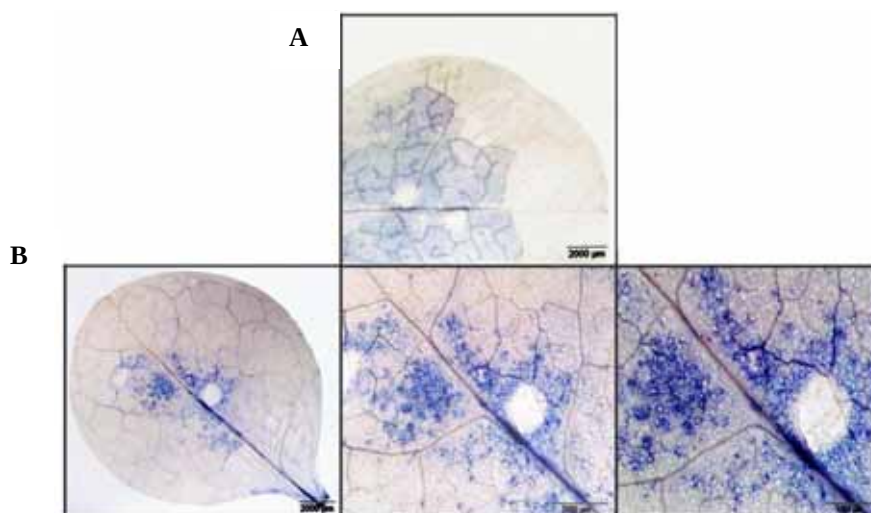


Figura 14. Visualização do radical superóxido detectado por coloração NBT em folhas de plantas selvagem (WT) e transgênica 1 hora após o ferimento. **A-** folha de planta selvagem; **B-** folha de planta transgênica (evento de transformação T-6) e respectivos aumentos.

4- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no primeiro capítulo do presente estudo mostraram a ocorrência de uma modulação diferencial da expressão do receptor *SISOBIR1* frente à infecção por duas espécies virais. Com base nos resultados obtidos, o PepYMV poderia estar interferindo negativamente em alguma via de sinalização mediada por *SISOBIR1*, uma vez que o gene é reprimido pela infecção viral, enquanto que o TCSV poderia estar ativando a sinalização dessa mesma via, devido ao considerável aumento dos níveis de transcritos do gene *SISOBIR1* nas plantas infectadas.

Neste segundo capítulo, na tentativa de corroborar as hipóteses mencionadas, uma análise funcional foi realizada utilizando plantas transgênicas de tabaco capazes de superexpressar o receptor. Os três eventos de transformação selecionados para os estudos apresentaram níveis elevados do transcrito do gene *SISOBIR1*. Os mesmos foram inoculados mecanicamente, juntamente com plantas de tabaco selvagem (que não expressam este receptor e sim o seu ortólogo *NtSOBIR1*), com os vírus PepYMV e TCSV para averiguar os padrões de tolerância ou suscetibilidade frente a essas infecções.

Em relação ao PepYMV, apesar de pequenas variações no acúmulo viral terem sido observadas nos transformantes, quando comparado à planta selvagem, os dados obtidos não permitiram distinguir um padrão biológico possivelmente relacionado a um aumento de tolerância ou suscetibilidade das plantas transgênicas superexpressando o gene *SISOBIR1*.

No caso da infecção pelo TCSV, mesmo utilizando uma técnica de maior acurácia para a quantificação da carga viral, os dados obtidos também não discriminaram um padrão biológico que eventualmente pudesse estar associado a um aumento de tolerância ou suscetibilidade das plantas transgênicas ao vírus.

Os resultados obtidos sugerem que a superexpressão do receptor *SISOBIR1* não interfere com a resposta de defesa da planta hospedeira aos processos infecciosos causados por ambas as espécies virais. O fato da expressão do gene *SISOBIR1* ser modulada de forma diferente nas plantas de tomateiro infectadas pelo PepYMV (repressão) e pelo TCSV (indução) sugere que tais alterações de expressão são influenciadas pelo tipo de interação planta-vírus específica, bem como pela agressividade das espécies virais envolvidas, pois neste estudo verificou-se a ocorrência de sintomas bem mais severos da doença nas plantas infectadas por TCSV.

Outro fator relevante é que as proteínas transmembranas, tais como LRR-RLKs e LRR-RLPs são sintetizadas no retículo endoplasmático (ER), de onde são transportadas para a

membrana plasmática pela maquinaria de tráfego celular, e posteriormente podem ser removidas da membrana por endocitose (Liebrand *et al.*, 2013b).

No estudo realizado por Liebrand e colaboradores (2013a), verificou-se que SOBIR1 pode estar envolvido no tráfego endosomal. A expressão transiente do receptor fusionado a EGFP em células da epiderme de folhas de *Nicotiana benthamiana* revelou que SOBIR1 localiza-se principalmente na membrana plasmática, como observado em nossos experimentos, mas adicionalmente se concentra também em vesículas citoplasmáticas móveis. Esta localização pode resultar em uma possível interação do receptor com proteínas virais, fato que poderia provocar mudanças na expressão do receptor. Alguns estudos apontam que a fosforilação de proteínas virais está ligada à atividade específica de receptores kinase da hospedeira, e que ambos desempenham um papel direto no sentido de facilitar as funções virais e a patogenicidade (Fontes *et al.*, 2004; Mariano *et al.*, 2004; Florentino *et al.*, 2006).

Em paralelo, nós investigamos o efeito da superexpressão do gene *SISOBIR1* no aumento ou diminuição da expressão de genes relacionados com respostas a estresse biótico e abiótico, mais especificamente aqueles que codificam proteínas relacionadas a patogenicidade [genes *PR-1* e *PR-6* (PI-II)]. Nossos resultados para o nível de expressão do gene *PR-1* indicaram pouca variação entre os três eventos de transformação analisados e o controle não transformado (planta selvagem), contudo em todas as amostras, um pico de expressão em algum ponto ao longo do tempo foi detectado. No caso do gene *PR-6*, um perfil de expressão similar foi observado, com aumento gradativo da expressão até atingir um pico em determinado tempo, porém sem diferenças entre plantas transgênicas e selvagens.

Essas proteínas de patogenicidade são induzidas após a resposta de hipersensibilidade (HR), no entanto, elas respondem de forma diferente ao ferimento. Geralmente, os níveis de expressão dos genes *PRs* são determinados pelo equilíbrio entre indutores e inibidores endógenos nas células (Ohashi & Ohshima, 1992). Em seu estudo, Takabatake e colaboradores (2006) constataram, por northern blot, um aumento na expressão dos genes *PR-1* e *PR-6* em folhas estressadas mecanicamente provenientes de plantas transgênicas capazes de superexpressar o gene *NtSOBIR1*. Os autores verificaram que nas plantas controle os níveis de ambos os transcritos eram inferiores aos das plantas transgênicas superexpressando o receptor no tempo de 24 horas pós-estresse. Por outro lado, em plantas onde o gene *NtSOBIR1* foi silenciado, a expressão destes genes foi bastante reduzida.

Segundo Balandin e colaboradores (1995) o nível de expressão de *PR-6* em plantas de tabaco após o ferimento varia ao longo do tempo de análise. A primeira indução da expressão de *PR-6* é normalmente observada 6 horas após o ferimento, sendo que esta

expressão pode ser aumentada em até pelo menos 3 dias. Contudo, nas folhas superiores sem ferimento não se constata aumento da expressão de *PR-6* ao longo do tempo.

Nas nossas condições, o perfil de expressão do gene endógeno *NtSOBIR1* (*WRK*) após o ferimento foi bastante similar entre plantas transgênicas e selvagens, ocorrendo um pico de expressão no tempo de 1 hora pós-ferimento. A expressão foi mantida em níveis relativamente elevados em relação ao controle não tratado ao longo do tempo, confirmando assim os resultados obtidos por Takabatake e colaboradores (2006).

É importante destacar que a superexpressão de *AtSOBIR1* em *arabidopsis* é capaz de ativar a resposta de defesa da planta (Gao *et al.*, 2009). Esses autores avaliaram duas linhagens representativas, uma com baixo nível de expressão de *SOBIR1* (5x) e outra com expressão elevada (70x), e verificaram que os cotilédones da linhagem com alta expressão morreram logo após a germinação, sinalizando que a superexpressão desse gene em *arabidopsis* leva a ativação da morte celular. Os genes *PR-1* e *PR-2* tiveram sua expressão aumentada de maneira constitutiva na linhagem com alta expressão de *SOBIR1*. Além disso, a superexpressão de *SOBIR1* determinou uma maior resistência da planta à bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomate*, sugerindo a ativação de respostas de resistência ao patógeno (Gao *et al.*, 2009). Cabe ressaltar que *SOBIR1* foi identificado em uma triagem para supressores do fenótipo *bir1-1* em *A. thaliana*. *BIR1* é um receptor que interage com o receptor *BAK1* *in vivo*, sendo que o mutante *bir1-1* promove uma ativação da resposta de defesa de maneira constitutiva. Por outro lado, o mutante *sobir1-1* é capaz de suprimir fortemente a morte celular observada em *bir1-1*, indicando que *SOBIR1* é um regulador positivo da sinalização de defesa (Gao *et al.*, 2009).

O receptor *SOBIR1* também está envolvido com crescimento e desenvolvimento em *arabidopsis*. Pela análise de mutantes para o gene que codifica uma proteína denominada *NEVERSHED* (*NEV*), que regula o tráfico na membrana e é essencial para a queda do órgão floral foi identificado um *LRR-RLK* denominado *EVERSHED* (*EVR*)/ *SOBIR1* que age como inibidor da abscisão. Uma mutação em *EVR* recupera os defeitos na estrutura de Golgi em mutantes *nev* nas células na zona de abscisão, sugerindo que *EVR* pode regular o tráfico na membrana durante esse processo (Leslie *et al.*, 2010).

Quanto à detecção de íons superóxido, os resultados obtidos sugerem um maior acúmulo de superóxido nas plantas de tabaco geneticamente transformadas em relação à planta selvagem uma hora após o ferimento das folhas com o uso de uma pinça. Por outro lado, nos tempos mais tardios não foi possível notar diferenças entre as plantas. A constatada

maior acumulação de EROS imediatamente após o estresse pode ser uma evidência da participação destas na resposta mediada por SOBIR1.

O ferimento funciona como um estímulo aumentando os níveis das espécies reativas de oxigênio (Song *et al.*, 2006). As respostas a ferimento em plantas são limitadas a ativação de vários sinais locais tais como EROS e cálcio, a ativação da via de morte celular e a geração de sinais a longa-distância que envolve EROS e ondas elétricas, bem como vários hormônios (Suzuki & Mittler, 2012). No estágio inicial de resposta ao ferimento as plantas produzem superóxido e peróxido de hidrogênio que podem desempenhar importantes papéis na transdução de sinal (León *et al.*, 2001; Suzuki & Mittler, 2012). O fato das plantas transgênicas apresentarem um rápido acúmulo de superóxido mediante o ferimento pode indicar uma maior agilidade de acionamento das respostas de defesa mediadas por *S/SOBIR1*.

Em suma, os resultados obtidos no presente estudo forneceram informações importantes sobre o gene *S/SOBIR1* e seu produto, mas não permitiu esclarecer de forma definitiva o papel deste durante os processos de infecção viral causados pelos vírus PepYMV e TCSV. É provável que as alterações nos perfís de expressão do gene *S/SOBIR1* sejam um efeito colateral do processo de infecção ocasionados pelos vírus na planta hospedeira, uma vez que este receptor está associado com a resposta basal de defesa e imunidade das plantas (Liebrand *et al.*, 2013b). Outra possibilidade estaria relacionada com possíveis mudanças no padrão de fosforilação das proteínas da hospedeira ou mesmo das proteínas virais, fato que precisa ser averiguado.

5- CONCLUSÕES

- ✓ Não foram evidenciadas diferenças na acumulação viral entre plantas de tabaco transgênicas superexpressando o receptor *SISOBIR1* e plantas selvagens não transformadas;
- ✓ Um aumento na expressão dos genes PR-1 e PR-6 foi evidenciado nas plantas superexpressando o receptor *SISOBIR1* logo após o ferimento, porém de modo similar ao observado em plantas de tabaco selvagem.
- ✓ Um provável aumento na liberação do ânion superóxido pode ser observado nas plantas de tabaco superexpressando *SISOBIR1* em relação à planta selvagem na fase inicial da resposta a ferimento.

5- REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potiviridae*. **Archives of Virology**; 2005:150:459-479.
- ADKINS, S.; ZITTER, T.; MOMOL, T. Tospoviruses (Family *Bunyaviridae*, Genus *Tospovirus*). (2005) Website at: <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- AFRREN, B.; GULFISHAN, M.; BAGHEL, G.; FATMA, M.; KHANN, A.A.; NAQVI, Q.A. Molecular Detection of a Virus Infecting Carrot and its Effect on Some Cytological and Physiological Parameters. **African Journal of Plant Science**; 2011:5(7):407-411.
- AFZAL, A.J.; WOOD, A.J.; LIGHTFOOT, D.A. Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**; 2008:21(5):507-517.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th. ed. San Diego: Elsevier; 2005:948 p.
- ALFENAS-ZERBINI, P.; MAIA, I.G.; FÁVARO, R.D.; CASCARDO, J.C.M.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; ZERBINI, F.M. Genoma-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**; 2009:22:352-361.
- ALVARENGA, M.A.R. **Tomate: produção em campo, casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras, UFLA; 2004:400p.
- ALVAREZ, M.E.; PENNELL, R.I.; MEIJER, P-J.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Reactive Oxygen Intermediates Mediate a Systemic Signal Network in the Establishment of Plant Immunity. **Cell**; 1998:92:773-784.
- AOKI, K.; OGATA, Y.; IGARASHI, K.; YANO, K.; NAGASSAKI, H.; KAMINUMA, E.; TOYODA, A. Functional genomics of tomato in a post-genome-sequencing phase. **Breeding Science**; 2013:63:14-20.
- APFATA, J.A.C. **Análise funcional da via de sinalização antiviral mediada por NIK em tomateiro**. 59f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa - UFV – Viçosa, Minas Gerais, 2010.
- ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; COSTA, H.; BOITEUX, L.S.; NEVES, L.O. de Q.; PRATES, R.S.; BERTINI, L.A. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira**; 2004:22(3):655-658.
- BALANDIN, T.; DOES, C. van der.; ALBERT, J-M. B.; BOL, J. F.; LINTHORST, H.J.M. Structure and induction pattern of a novel proteinase inhibitor class II gene of tobacco. **Plant Molecular Biology**; 1995:27:1197-1204.
- BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C.C; JULIATTI, F.C. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS. **Bioscience Journal**; 2010:26(2):231-239.

BECRAFT, P.W. Receptor kinase signaling in plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**; 2002:8:163-192.

BECRAFT, P.W. Receptor kinases in plant development. **Trends in plant science**; 1998:3(10):384-388.

BERGER, P.H. ; ADAMS, M.J. ; BARNETT, O.W. ; BRUNT, A.A. ; HAMMOND, J. ; HILL, J.H. ; JORDAN, R.L. KASHIWAZAKI, S. ; RYBICKI, E.P. ; SPENCE, N. ; STENGER, D.C. ; OHKI, S.T. ; UYEDA, I. ; VAN ZAAYEN, A. ; VALKONEN, J.P. VETTEN, H.J. **Family Potyviridae**. In : FAUQUET, C.M. ; MAYO, M.A. ; MANILOFF, J. ; DESSELBERG, U. ; BALL, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy*. Eighth Reprt of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press: 2005:819-841.

BEZERRA, I.C.; RESENDE, R. de O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; DE ÁVILA, A.C. Increase of Tospoviral Diversity in Brazil with the Identification of Two New Tospovirus Species, One from Chrysanthemum and One from Zucchini. **Virology**; 1999:89(9):823-830.

BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**; 2005:89(7):1113-1121.

BOITEUX, L.S; CUPERTINO F.P; SILVA C; DUSI A.N; MONTENESHICH D.C. Resistance to *Potato virus Y* (pathotype 1-2) in *Capsicum annuum* and *Capsicum chinense* is controlled by two independent major genes. **Euphytica**; 1996:87:53-58.

BRIESE, T.; CALISHER, C.H.; HIGGS, S. Viruses of the family Bunyaviridae: Are all available isolates reassortants? **Virology**; 2013:446:207–216.

BURGYÁN, J.; HAVELDA, Z. Viral Suppressors of RNA Silencing. **Trends in Plant Science**; 2011:16(5):265-272.

CARVALHO, M. **ESTUDO DO PAPEL DA TCTP (*Translationally Controlled Tumour Protein*) NA RESPOSTA AOS ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS EM PLANTAS**. 73f. Dissertação (Dissertação em Ciências Biológicas – Genética) Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, Botucatu, SP, 2010.

CASTELLS, E.; CASACUBERTA, J.M. Signalling through kinase-defective domains: the prevalence of atypical receptor-like kinases in plants. **Journal of Experimental Botany**; 2007:58(13):3503–3511.

CATONI, M.; MIOZZI, L.; FIORILLI, V.; LANFRANCO, L.; ACCOTTO, G.P. Comparative Analysis of Expression Profiles in Shoots and Roots of Tomato Systemically Infected by *Tomato spotted wilt virus* Reveals Organ-Specific Transcriptional Responses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**; 2009:22(12):1504–1513.

CHAPA-OLIVER, A.M.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.M.; OCAMPO-VELÁZQUEZ, R.V; FEREGRINO-PÉREZ, A.A; MEJÍA-TENIENTE, L.; HERRERA-RUÍZ, G.; TORRES-PACHECO, I. Analogies between Geminivirus and

Oncovirus: Cell Cycle Regulation. **African Journal of Biotechnology**; 2011;10(55):11327-11332.

CHAPARRO-GARCIA, A.; WILKINSON, R.C.; GIMENEZ-IBANEZ, S.; FINDLAY, K.; COFFEY, M.D.; ZIPFEL, C.; RATHJEN, J.P.; KAMOUN, S.; SCHORNACK, S. The Receptor-Like Kinase SERK3/BAK1 Is Required for Basal Resistance against the Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. **PLoS ONE**; 2011;6(1):1-10.

CHRISTENSEN, A.B.; HO CHO, B.; NÆSBY, M.; GREGERSEN, P. L.; BRANDT, J.; MADRIZ-ORDENANA, K.; COLLINGE, D. B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular Plant Pathology**; 2002;3(3):135–144.

CHUNG, B.Y.; MILLER, W.A.; ATKINS, J.F.; FIRTH, A.E. An overlapping essential gene in the Potyviridae. **PNAS**; 2008;105(15):5897–5902.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; HARAKAVA, R.; CHAGAS, C.M. *Tomato chlorotic spot virus* in Hydroponically-Grown Lettuce in São Paulo State, Brazil. **Fitopatologia brasileira**; 2004;29(3):307-311.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; ROGGERO, P.; CHAGAS, C.M. Diversidade de tospovírus em diferentes regiões produtoras de olerícolas do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**; 2001;27:177-182.

COOPER, B. Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. **The Plant Journal**; 2001;26:339-349.

CUNHA, L.C.V.; RESENDE, R.O.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A.K. Distinct features of *Pepper yellow mosaic virus* isolates from tomato sweet pepper. **Fitopatologia Brasileira**; 2004;29:663-667.

CZOSNEK, H.; EYBISHTZ, A.; SADE, D.; GOROVITS, R.; SOBOL, I.; BEJARANO, E.; ROSAS-DÍAZ, T.; LOZANO-DURÁN, R. Discovering Host Genes Involved in the Infection by the *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* Complex and in the Establishment of Resistance to the Virus Using *Tobacco Rattle Virus*-based Post Transcriptional Gene Silencing. **Viruses**; 2013;5:998-1022.

DE ÁVILA, A.C.; HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R. de O.; GOLDBACH, R.W.; PETERS, D. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. **Journal of General Virology**; 1993;74:153-159.

DEWEY, R.A.; SEMORILE, L.C.; GRAU, O.; CRISCI, J.V. Cladistic Analysis of *Tospovirus* Using Molecular Characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**; 1997;8(1):11-32.

DIANESE, E.C.; RESENDE, R.O.; INOUE-NAGATA, A.K. Alta incidência de *Pepper yellow mosaic virus* em tomateiro em região produtora no Distrito Federal. **Tropical Plant Pathology**; 2008;33(1):67-68.

DIELEN, A-S.; SASSAKI, F.T.; WALTER, J.; MICHON, T.; MÉNARD, G.; PAGNY, G.; KRAUSE-SAKATE, R.; MAIA, I.G.; BADAOU, S.; LE GALL, O.; CANDRESSE, T.; GERMAN-RETANA, S. The 20S proteasome $\alpha 5$ subunit of *Arabidopsis thaliana* carries an RNase activity and interacts in planta with the *Lettuce mosaic potyvirus* HcPro protein. **Molecular Plant Pathology**; 2010:1-14.

DING, S.W.; VOINNET, O. Antiviral immunity directed by small RNAs. **Cell**; 2007:130:413-426.

DONG, J-H.; CHENG, X-F.; YIN, Y-Y.; FANG, Q.; DING, M.; LI, T-T.; ZHANG, L-Z.; SU, X-X.; MCBEATH, J.H.; ZHANG, Z-K. Characterization of tomato zonate spot virus, a new tospovirus in China. **Archives of Virology**; 2008:153:855-864.

DURRANT, W.E.; DONG, X. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. **Annual Review of Phytopathology**; 2004:42:185-209.

ECHER, M. de M.; COSTA, C.P. Reaction of Sweet Pepper to the *Potato virus Y* (PVYm). **Scientia Agricola**; 2002:59(2):309-314.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**; 1991:19(6):1349.

EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; COLARICCIO, A.; HARAKAVA, R.; ARAUJO, J.; CHAGAS, C. M. CARACTERIZAÇÃO DO *Tomato chlorotic spot virus* ISOLADO DE JILÓ NO VALE DO PARAÍBA, ESTADO DE SÃO PAULO. **Fitopatologia brasileira**; 2002:27(3):285-291.

EIRAS, M.; RESENDE, R. de O.; DE ÁVILA, A.C. ESTRATÉGIA PARA A DETECÇÃO DE TOSPOVÍRUS. **Arquivos do Instituto Biológico**; 2001:68(1):69-73.

EL-HOSEN, M.E.; EL-FALLAL, A.A.; EL-SAYED, A.A.; DIAB, A.; SADIK, A.S. Biology Cytopathology and Molecular Identification of an Egyptian Isolate of *Zucchini yellow mosaic Potyvirus* (ZYMV-EG). **Pakistan Journal of Biotechnology**; 2010:7(1-2):75-80.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **Metodologias para Transformação Genética de Plantas-Modelo**. Brasília, 2002.

FAOSTAT – FAO - 2011. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Food and Agricultural commodities production. Disponível em: <http://www.faostat.fao.org>. Acesso em: 28 de maio de 2013.

FAUQUET, C.M. ; MAYO, M.A. ; MANILOFF, J. ; DESSELBERG, U. ; BALL, L.A. (Ed.). **Vírus Taxonomy. Eighth Reprt of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego : Elsevier Academic Press; 2005:1259p.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV; 2008:194-241p.

FLORENTINO, L.H.; SANTOS, A.A.; FONTENELLE, M.R.; PINHEIRO, G.L.; ZERBINI, F.M.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; FONTES, E.P.B. A PERK-Like Receptor Kinase Interacts with the Geminivirus Nuclear Shuttle Protein and Potentiates Viral Infection. **Journal of Virology**; 2006:80(13):6648–6656.

FOLKERTSMA, R.T.; SPASSOVA, M.I.; PRINS, M.; STEVENS, M.R.; HILLE, J.; GOLDBACH, R.W. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Lycopersicon esculentum* cv. Stevens and its application to physically map the Sw-5 locus. **Molecular Breeding**; 1999:5:197–207.

FONTES, E.P.B.; SANTOS, A.A.; LUZ, D.F.; WACLAWOVSKY, A.J.; CHORY, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. **Genes & Development**; 2004:18:2545–2556.

FONTES, P.C.R.; SILVA, D.J.H.- **Produção de tomate de mesa**. Viçosa, MG: Aprenda fácil; 2002:196p.

FRANCKI, R.I.B. Responses of plant cells to virus infection with special references to the sites of RNA. In: Positive strand RNA viruses (M.A. Brinton and R.R. Rueckert, eds.) **Plan R. Liss, New York**, 1987:423–436.

GAO, M.; WANG, X.; WANG, D.; XU, F.; DING, X.; ZHANG, Z.; BI, D.; CHENG, Y.T.; CHEN, S.; LI, X.; ZHANG, Y. Regulation of Cell Death and Innate Immunity by Two Receptor-like Kinases in Arabidopsis. **Cell Host & Microbe**; 2009:6:34–44.

GARCION, C.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J.P. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Ed.). **Induced resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell; 2007:109–132p.

GERMAN, T.L.; ULLMAN, D.E.; MOYER, J.W. Tospoviruses: Diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. **Annual Review of Phytopathology**; 1992:30:315–348.

GIORDANO, L.B.; DE ÁVILA, A.C.; CHARCHAR, J.M.; BOITEUX, L.S. ‘Viradoro’: A Tospovirus-resistant Processing Tomato Cultivar Adapted to Tropical Environments. **HortScience**; 2000: 35(7):1368–1370.

GIORIA, R.; BRAGA, R. de S.; KRAUSE-SAKATE, R.; ROULLIER, C.; ROSA, D.D.; MOURA, M.F.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SAWAZAKI, H.E.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Breakdown of Resistance in Sweet Pepper Against *Pepper yellow mosaic virus* in Brazil. **Scientia Agricola**; 2009:66(2):267–269.

GOFF, K.E.; RAMONELL, K.M. The role and regulation of receptor-like kinases in plant defense. **Gene Regulation and Systems Biology**; 2007:1:167–175.

GOODMAN, R.N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia, University of Missouri Press; 1986:433p.

GREEFF, C.; ROUX, M.; MUNDY, J.; PETERSEN, M. Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. **Frontiers in Plant Science**; 2012:3:1-7. doi: 10.3389/fpls.2012.00209.

GRIOT, C.; GONZALEZ-SCARANO, F.; NATHANSON, N. Molecular determinants of the virulence and infectivity of California serogroup Bunyaviruses. **Annual Review of Microbiology**; 1993:47:117-38.

HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B; ROBERTSON, D. Reprogramming plant gene expression: A prerequisite to geminivirus DNA replication. **Molecular Plant Pathology**; 2004:5:149-156.

HANSSEN, I.M.; LAPIDOT, M.; THOMMA, B.P.H.J. Emerging Viral Diseases of Tomato Crops. **Molecular Plant-Microbe Interactions**; 2010:23(5):539–548.

HAVELDA, Z.; VÁRALLYAY, E.; VÁLÓCZI, A.; BURGYÁN, J. Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. **The Plant Journal**; 2008:55:278–288.

HERRERO, S.; CULBREATH, A.K.; CSINOS, A.S.; PAPPU, H.R.; RUFTY, R.C.; DAUB, M.E. Nucleocapsid Gene-Mediated Transgenic Resistance Provides Protection Against *Tomato spotted wilt virus* Epidemics in the Field. **Virology**; 2000:90(2):139-147.

HILLUNG, J.; CUEVAS, J. M.; ELENA, S. F. Transcript profiling of different *Arabidopsis thaliana* ecotypes in response to *Tobacco etch potyvirus* infection. **Frontiers in Microbiology | Virology**; 2012:3:1-9.

HULL, R. Matthew's Plant Virology (4a ed.). Academic Press; 2002.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses: Virus Taxonomy 2012. Accessed em: www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp.

IGLESIAS, V.A.; MEINS JR., F. Movement of plant virus is delayed in a β -1,3- glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. **The Plant Journal**; 2000:21(2):157-166.

INNES, R.W. Guarding the Goods. New Insights into the Central Alarm System of Plants. **Plant Physiology**; 2004:135:695–701.

INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; LOBO, T.O.T.A.; ÁVILA, A.C; MONTE, D.C. Analysis of the nucleotide sequence of the coat protein and 3' untranslated region of two Brazilian *Potato virus Y* isolates. **Fitopatologia Brasileira**; 2001:26:45-52.

INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; MONTE, D.C.; DUSI, A.N.; ÁVILA, A.C.; van der VLUGT, R.A.A. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. **Archives of Virology**; 2002:147:849–855.

ITO, N.; TAKABATAKE, R.; SEO, S.; HIRAGA, S.; MITSUHARA, I.; OHASHI, Y. Induced Expression of a Temperature-Sensitive Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Protein

Kinase Gene by Hypersensitive Cell Death and Wounding in Tobacco Plant Carrying the *N* Resistance Gene. **Plant Cell Physiology**; 2002;43(3):266-274.

JAMBUNATHAN, N. Determination and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS), Lipid Peroxidation, and Electrolyte Leakage in Plants. **Plant Stress Tolerance Methods in Molecular Biology**; 2010:639:291-297.

JONES, D.R. Plant viruses transmitted by thrips. **European Journal Plant Pathology**; 2005;113:119-157.

JUHÁSZ, A.C.P.; SILVA, D.J.H.; ZERBINI JÚNIOR, F. M.; CARNEIRO, P.C.S.; SOARES, B.O.; CRUZ, C.D. Base genética da resistência de um acesso de tomate silvestre ao mosaico-amarelo do pimentão. **Pesquisa agropecuária brasileira**; 2008;43(6):713-720.

JUHÁSZ, A.C.P.; SILVA, D.J.H.; ZERBINI-JÚNIOR, F.M.; SOARES, B.O.; AGUILERA, G.A.H. SCREENING OF *Lycopersicon* sp. Accessions for Resistance to *Pepper yellow mosaic virus*. **Scientia Agricola**; 2006;63(5):510-512.

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J-C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**; 2011;5(6):709-725.

KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based makers. **The Plant Journal**; 1993;4(2):403-410.

KOONIN, E.V.; WOLF, Y.I.; NAGASAKI, K.; DOLJA, V.V. The Big Bang of picornalike virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. **Nature Reviews Microbiology**; 2008;6:925–939.

KORIMBOCUS, J.; COATES, D.; BARKER, I.; BOONHAM, N. Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. **Journal of Virological Methods**; 2002;103:109-120.

KRUPA, A.; ANAMIKA; SRINIVASAN, N. Genome-wide comparative analyses of domain organisation of repertoires of protein kinases of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. **Gene**; 2006;380:1–13.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta). In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres; 2005:589-596p.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**; 2005;6(62):1-16.

LEE, B-ha.; LEE, H.; XIONG, L.; ZHU, J-K. A Mitochondrial Complex I Defect Impairs Cold-Regulated Nuclear Gene Expression. **The Plant Cell**; 2002;14:1235–1251.

LEITE, B.; RONCATO, L.D.; PASCHOLATI, S.F.; LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. In: LUZ, C.W.;

FERNANDES, J.M.S.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.) **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo;1997:5:235-280.

LEITE, G.L.D. Resistência de Tomates a Pragas. **UNIMONTES Científica**; Montes Claros; 2004: 6(2):129-140.

LEÓN, J.; ROJO, E.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. Wound signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**; 2001:52(354):1-9.

LESLIE, M. E.; LEWIS, M.W.; YOUN, J-Y.; DANIELS, M.J.; LILJEGREN, S.J. The EVERSHED receptor-like kinase modulates floral organ shedding in *Arabidopsis*. **Development**; 2010:137(3):467-476.

LI, W.; LEWANDOWSKI, D.J.; HILF, M.E.; ADKINS, S. Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. **Virology**; 2009: 390:110–121.

LIEBRAND, T.W.H.; van den BERG, G.C.M.; ZHANG, Z.; SMIT, P.; CORDEWENER, J.H.G.; AMERICA, A.H.P.; SKLENAR, J.; JONES, A.M.E.; TAMELING, W.I.L.; ROBATZEK, S.; THOMMA, B.P.H.J; JOOSTEN, M.H.A.J. Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. **PNAS**; 2013a:1-6. doi/10.1073/pnas.1220015110.

LIEBRAND, T.W.H.; van den BURG, H.A.; JOOSTEN, M.H.A.J. Two for all: receptor-associated kinases SOBIR1 and BAK1. **Trends in Plant Science**; 2013b:1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.10.003>.

LIN, A.; WANG, Y.; TANG, J.; XUE, P.; LI, C.; LIU, L.; HU, B.; YANG, F.; LOAKE, G.J.; CHU, C. Nitric Oxide and Protein S-Nitrosylation Are Integral to Hydrogen Peroxide-Induced Leaf Cell Death in Rice. **Plant Physiology**; 2012:158:451–464.

LIU, P.; WEI, W.; OUYANG, S.; ZHANG, J.-S. Analysis of expressed receptor-like kinases (RLKs) in soybean. **Journal of Genetics and Genomics**; 2009:36:611-619.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. **Methods**; 2001:25:402-408.

LONDOÑO, A.; CAPOBIANCO, H.; ZHANG, S.; POLSTON, J.E. First record of *Tomato chlorotic spot virus* in the USA. **Tropical Plant Pathology**; 2012:37(5):333-338.

LOPES, C.A.; De ÁVILA, A.C. Doenças do tomateiro. 2ª edição. Brasília Embrapa Hortaliças, 2005.

LOURENÇÃO, A.L.; SIQUEIRA, W.J.; MELO, A.M.T.; PALAZZO, S.R.L.; MELO, P.C.T.; COLARICCIO, A. Resistência de Cultivares e Linhagens de Tomateiro a *Tomato chlorotic spot virus* e a *Potato virus Y*. **Fitopatologia Brasileira**; 2005:30(6):609-614.

LSPA-IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**. IBGE: Rio de Janeiro; 2013:26(11):1-80.

LUCAS, W.J. Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. **Virology**; 2006:344:169-184.

LUCINDA, N.; ROCHA, W.B.; INOUE-NAGATA, A.K.; NAGATA, T. Complete genome sequence of pepper yellow mosaic virus, a potyvirus, occurring in Brazil. **Archives of Virology**; 2012:157:1397–1401.

MACIEL-ZAMBOLIM, E.; COSTA, H.; CAPUCHO, A.S.; ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; KITAJIMA, E.W. Surto Epidemiológico do Vírus do Mosaico Amarelo do Pimentão em Tomateiro na Região Serrana do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**; 2004:29(3):325-327.

MAIA, I.G.; HAENNI, A-L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **Journal of General Virology**; 1996:77:1335-1341.

MANDADI, K. K.; SCHOLTHOF, K-B. G. Characterization of a Viral Synergism in the Monocot *Brachypodium distachyon* Reveals Distinctly Altered Host Molecular Processes Associated with Disease. **Plant Physiology**; 2012:160:1432–1452.

MANDAL, B.; JAIN, R.K.; KRISHNAREDDY, M.; KUMAR, N.K.K.; RAVI, K.S.; PAPPU, H.R. Emerging problems of tospoviruses (Bunyaviridae) and their management in the Indian Subcontinent. **Plant Disease**; 2012:96(4):468-479.

MARIANO, A.C.; ANDRADE, M.O.; SANTOS, A.A.; CAROLINO, S.M.B.; OLIVEIRA, M.L.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; BROMMONSHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. **Virology**; 2004:318:24-31.

MÉRAI, Z.; KERÉNYI, Z.; KERTÉSZ, S.; MAGNA, M.; LAKATOS, L.; SILHAVY, D. Double-Stranded RNA Binding May be a General Plant RNA Viral Strategy to Suppress RNA Silencing. **Journal of Virology**; 2006:80(12):5747–5756.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**; 2002:7(9):405-410.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F. V. Reactive oxygen gene network of Plants. **Trends in Plant Science**; 2004:9(10):490-498.

MORRIS, E.R.; WALKER, J.C. Receptor-like protein kinases: the keys to response. **Current Opinion in Plant Biology**; 2003:6:339–342.

MOUND, L.A. The Thysanoptera vector species of Tospoviruses. **Acta Horticulturae**; 1996:431:298-309.

MOURA, M.F.; MITUTI, T.; MARUBAYASHI, J.M.; GIORIA, R.; KOBORI, R. F.; PAVAN, M.A.; SILVA, N.; KRAUSE-SAKATE, R. A classification of *Pepper yellow mosaic* virus isolates into pathotypes. **European Journal of Plant Pathology**; 2011:131:549–552.

MURASHIGE T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Plant Physiology**; 1962:15:473-497.

MURPHY, J.F.; RYCHLIK, W.; RHOADS, R.E.; HUNT, A.G.; SHAW, J.G.A. Tyrosine Residue in the Small Nuclear Inclusion Protein of Tobacco Vein Mottling Virus Links the VPg to the Viral RNA. **Journal of Virology**; 1991:65:511-513.

NAGATA, T.; DE ÁVILA, A.C.; TAVARES, P.C.M.; BARBOSA, C.J.; JULIATTI, F.C.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of different tospoviruses in six States of Brazil. **Fitopatologia brasileira**; 1995:20:90-95.

NAIKA, S.; LIDT de JEUDE, J. van; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B. van. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, (Tradução: Rob Barnhoorn; revisão: Láli de Araújo); 2006:6-102p.

NAQVIA, A.R.; SARWATC, M.; PRADHANB, B.; CHOUDHURY, N.R.; HAQ, Q.M.R.; MUKHERJEE, S.K. Differential expression analyses of host genes involved in systemic infection of *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV). **Virus Research**; 2011:160:395–399.

NAVROT, N.; ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J-P. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. **Physiologia Plantarum**; 2007:129:185–195.

NELSON, B.K.; CAI, X.; NEBENFUHR, A. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. **The Plant Journal**; 2007:51:1126–1136.

OAKENFULL, E.A.; RIOU-KHAMLI, C.; MURRAY, J.A. Plant D-type Cyclins and the Control of G1 Progression. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**; 2002:357:749-760.

OHASHI, Y.; OHSHIMA, M. Stress-Induced Expression of Genes for Pathogenesis-Related Proteins in Plants. **Plant Cell Physiology**; 1992:33(7):819-826.

OUCHI, J. INDUCTION OF RESISTANCE OR SUSCEPTIBILITY. **Annual Review of Phytopathology**; 1983:21:289-315.

PALAZZO, S.R.L.; BERGMANN, J.C.; CHAVES, A.R.C.; EIRAS, M.; CHARGAS, C.M.; COLARICCIO, A. Surto de Potyvirus associado ao mosaico amarelo do tomateiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**; 2004:30:117. Resumo.

PALUKAITIS, P.; CARR, J.P. Plant Resistance Responses to Viruses. **Journal of Plant Pathology**; 2008:90(2):153-171.

PANTHEE, D.R.; CHEN, F. Genomics of Fungal Disease Resistance in Tomato. **Current Genomics**; 2010:11:30-39.

PAPPU, H.R.; JONES, R.A.; JAIN, R.K. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. **Virus Research**; 2009;141(2):219-36.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismo de resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H., Amorim, L. (Ed). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronomia Ceres; 1995:1:Cp. 22:417-454.

PERALTA, I.E.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany**; 2005;30(2):424–434.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**; 2002;30(9):1-10.

PINTO, M. dos S. T.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, E.A.G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Brazilian Journal of Biosciences**; 2011;9(2):241-248.

POZZER, L.; RESENDE, R.O.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; GIORDANO, L.B.; ÁVILA, A.C. Tospovírus, uma visão atualizada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**; 1996;4:95-148.

PRINS, M.; GOLDBACH, R. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. **Trends in Microbiology**; 1998;6(1):31-35.

RANTALAINEN, K.I.; ESKELIN, K.; TOMPA, P.; MAKINEN, K. Structural Flexibility Allows the Functional Diversity of Potyvirus Genome-Linked Protein VPg. **Journal of Virology**; 2011;85(5):2449–2457.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia brasileira**; 2003;28(2):123-130.

RIBEIRO, D.; FORESTI, O.; DENECKE, J.; WELLINK, J.; GOLDBACH, R.; KORMELINK, R.J.M. Tomato spotted wilt virus glycoproteins induce the formation of endoplasmic reticulum- and Golgi-derived pleomorphic membrane structures in plant cells. **Journal of General Virology**; 2008;89:1811–1818.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**; 2005;21(3):133-149.

RICHMOND, K.E.; CHENAULT, K.; SHERWOOD, J.L.; GERMAN, T.L. Characterization of the Nucleic Acid Binding Properties of Tomato Spotted Wilt Virus Nucleocapsid Protein. **Virology**; 1998: 248:6–11.

RICK, C. M. Tomato Paste: A Concentrated Review of Genetic Highlights From the Beginnings to the Advent of Molecular Genetics. **Generics**; 1991;128:1-5.

RIECHMANN, J.L.; LAIN, S.; GARCIA, J.A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **Journal of General Virology**; 1992:73:1-16.

ROOSSINCK, M.J. Mechanisms of Plant Virus Evolution. **Annual Review of Phytopathology**; 1997:35:191-209.

RUDRABHATLA, P.; REDDY, M.M.; RAJASEKHARAN, R. Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/tyrosine-specific protein kinases. **Plant Molecular Biology**; 2006:60:293–319.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**; 1987:4(4):406-425.

SAKAMOTO, T.; DEGUCHI, M.; BRUSTOLINI, O.J.B.; SANTOS, A.A.; SILVA, F F.; FONTES, E.P.B. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-II-RLK subfamily in antiviral defense. **BMC Plant Biology**; 2012:12:229.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., **Cold Spring Harbor Laboratory**, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989:1659p.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**; 1993:101:7-12.

SCHERER, N. de M. **Evolução Molecular Darwiniana nas proteínas relacionadas à patogênese (PRs) em plantas**. 104f. Dissertação (Mestre em Genética e Biologia Molecular) – Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos e defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ; 2008: Cp.6:227-248.

SENTHIL, G.; LIU, H.; PURAM, G.; CLARK, A.; STROMBERG, A.; GOODIN, M.M. Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses. **Journal of General Virology**; 2005:86:2615–2625.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**; 2012:1-26.

SHIMOMURA, T.; DIJKSTRA, J. The occurrence of callose during the process of local lesion formation. **Neth. J. Pl. Path.**; 1975:81:107-121.

SHIU, S.-H.; BLEECKER, A.B. Expansion of the Receptor-Like Kinase/Pelle Gene Family and Receptor-Like Proteins in Arabidopsis. **Plant Physiology**; 2003:132:530–543.

SHIU, S.-H.; BLEECKER, A.B. Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. **Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment**; 2001:(113):re22.

SHIU, S-H.; KARLOWSKI, W. M.; PAN, R.; TZENG, Y-H.; MAYER, K. F. X.; LIA, W-H. Comparative Analysis of the Receptor-Like Kinase Family in Arabidopsis and Rice. **The Plant Cell**; 2004:1-15. doi: 10.1105/tpc.020834.

SHUKLA, D.D. ; WARD, C.W. ; BRUNT, A.A. **The Potyviridae**. Wallingford, UK : CAB International ; 1994:516p.

SONG, C.J.; STEINEBRUNNER, I.; WANG, X.; STOUT, S.C.; ROUX, S.J. Extracellular ATP Induces the Accumulation of Superoxide via NADPH Oxidases in Arabidopsis. **Plant Physiology**; 2006:140:1222–1232.

SOOSAAR, J.L.M.; BURCH-SMITH, T.M.; DINESH-KUMAR, S.P. Mechanisms of plant resistance to viruses. **Nature**; 2005:3:789-798.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**; 2011:10(1):18-46.

STANGE, C. Plant-virus interactions during the infective process. **Ciência e Investigación Agrária**; 2006:33:1-18.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic Acquires Resistance. **Annual Review of Phytopathology**; 1997:35:235–70.

SUN, X.; WANG, G-L. Genome-wide identification, characterization and phylogenetic analysis of the rice LRR-kinases. **PLoS ONE**; 2011:6:1-12.

SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants. **Free Radical Biology and Medicine**; 2012:53:2269–2276.

TADAMURA, K.; NAKAHARA, K.S.; MASUTA, C.; UYEDA, I. Wound-induced rgs-CaM gets ready for counterresponse to an early stage of viral infection. **Plant Signaling & Behavior**; 2012:7(11):1548–1551.

TAKABATAKE, R.; SEO, S.; ITO, N.; GOTOH, Y.; MITSUHARA, I.; OHASHI, Y. Involvement of wound-induced receptor-like protein kinase in wound signal transduction in tobacco plants. **The Plant Journal**; 2006:47:249–257.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**; 2011:28:2731-2739.

The Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**; 2012:485:635–641. doi:10.1038/nature11119.

TRUTA, A.A.C.; SOUZA, A.R R.; NASCIMENTO, A.V.S.; PEREIRA, R. de C.; PINTO, C.M. F.; BROMMONSCHENKELI, S.H.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Identidade e

Propriedades de Isolados de Potyvirus Provenientes de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**; 2004;29(2):160-168.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A.-L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**; 2001;74:157–175.

VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science Society of America**; 2004;44:1920–1934.

VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**; 1997;103:753–765.

VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for Naming Plant Pathogenesis-Related Proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**; 1994;12(3):245-264.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**; 2006;44:135–62.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**; 1999;55:85-97.

VELLOSILLO, T.; VICENTE, J.; KULASEKARAN, S.; HAMBERG, M.; CASTRESANA, C. Emerging Complexity in Reactive Oxygen Species Production and Signaling during the Response of Plants to Pathogens. **Plant Physiology**; 2010;154:444–448.

VIJAYAPALANI, P.; MAESHIMA, M.; NAGASAKI-TAKEKUCHI, N.; MILLER, W.A. Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3NPIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. **PLoS Pathogens**; 2012;8(4):1-15.

VOINNET, O. Induction and Suppression of RNA Silencing: Insights from Viral Infections. **Nature Reviews**; 2005;6:206-221.

WALKER, J. C. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. **Plant Molecular Biology**; 1994;26:1599–1609.

WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007. 258p.

WANG, G.; FIERS, M.; ELLENDORFF, U.; WANG, Z.; WIT, P.J.G.M.; ANGENENT, G.; THOMMA, B.P.H.J. The diverse roles of extracellular leucine-rich repeat-containing receptor-like proteins in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**; 2010;29(5):285–299.

WANG, Y.; LOAKE, G.J.; CHU, C. Cross-talk of nitric oxide and active oxygen species in plant programmed cell death. **Frontiers in Plant Science**; 2013;4(314):1-7.

WEBSTER, C.G.; REITZ, S.R.; PERRY, K.L.; ADKINS, S. A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. **Virology**; 2011:413: 216–225.

WEI, T.; WANG, A. Biogenesis of Cytoplasmic Membranous Vesicles for Plant Potyvirus Replication Occurs at Endoplasmic Reticulum Exit Sites in a COPI- and COPII-Dependent Manner. **Journal of Virology**; 2008:82(24):12252–12264.

WEI, T.; ZHANG, C.; HONG, J.; XIONG, R.; KASSACHAU, K.D.; ZHOU, X.; CARRINGTON, J.C.; WANG, A. Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. **PLoS Pathogens**; 2010:6:1-12.

WHALEN, M.C. Host defence in a developmental context. **Molecular Plant Pathology**; 2005:6(3):347–360.

WHITHAM, S. A.; QUAN, S.; CHANG, H-S.; COOPER, B.; ESTES, B.; ZHU, T.; WANG, X.; HOU, Y-M. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. **The Plant Journal**; 2003:33:271–283.

WHITHAM, S. A.; YANG, C.; GOODIN, M. M. Impact: Elucidating Plant Responses to Viral Infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**; 2006:19(11):1207–1215.

WILLIAMS, L.V.; LAMBERTINI, P.M.L.; SHOHARA, K.; BIDERBOST, E.B. Occurrence and Geographical Distribution of Tospovirus Species Infecting Tomato Crops in Argentina. **Plant Disease**; 2001:85(12):1227-1229.

WINTER, D.; VINEGAR, B.; NAHAL, H.; AMMAR, R.; WILSON, G.V.; PROVART, N.J. An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. **PLoS ONE**; 2007:(8):p.1-12.

ZELLER, H.; BOULOY, M. Infections by viruses of the families Bunyaviridae and Filoviridae. **Revue scientifique et technique**; 2000:19(1):79-91.

ZERBINI, F.M.; ZAMBOLIM, E.M. A família Potyviridae. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**; 1999:7:1-66.

APÊNDICE

ELABORAÇÃO DE UM CAPÍTULO DE LIVRO

Durante o desenvolvimento do meu doutorado passei por diversas situações que me deixaram muitas vezes desanimada, desacreditada e me fazendo pensar até em desistir, porém como uma das minhas grandes qualidades é a minha perseverança e persistência, mesmo com tudo isso continuei na minha caminhada. Como para quem nunca desiste uma hora as oportunidades chegam, em um certo período desses onde tudo parecia estar dando errado, eis que recebo um convite por email para participar da elaboração de um livro que iria abordar vários temas sobre virologia, tema este que está vinculado ao meu trabalho, pois estudei a interação vírus-planta que também fez parte do meu mestrado.

Fiquei muito contente em ler o email, ele despertou em mim o desejo de poder fazer algo inovador, além da oportunidade de demonstrar a minha capacidade de fazer aquilo que eu verdadeiramente me disponho a realizar e aceitei o convite. De imediato já tinha um grande desafio, pois precisava elaborar uma proposta de tema a ser abordado e que o mesmo fosse para mim algo interessante e desafiador. Frente a essa chance de produzir, pedi ajuda a alguns amigos do laboratório (Juliana, Alessandra e Rodrigo) e eles prontamente aceitaram essa aventura comigo.

Mas diante de tantos assuntos que podíamos escrever, pois no livro poderia ter trabalhos inéditos ou de revisões, muitas coisas passaram pelas nossas cabeças, até que por incentivo do Rodrigo decidimos escrever uma revisão sobre supressores do silenciamento gênico em plantas. Todo deslumbrado pelo tema, porque se tratava do meu trabalho de doutorado, ele sempre falou com muito entusiasmo sobre isso, e como eu também me simpatizava pelo assunto e queria poder aprofundar meu conhecimento, decidimos então sobre o que escreveríamos.

Inicialmente elaboramos a proposta, encaminhamos e com a sua aprovação iniciamos a batalha de escrever, nós tínhamos o compromisso de elaborar um capítulo de revisão que contesse o que demais atual e significativo já tivesse sido descrito sobre o assunto, porém queríamos fazer isso de uma forma simples e de fácil entendimento para os futuros leitores.

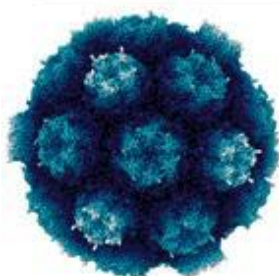
O resultado foi sensacional, conseguimos escrever a revisão e tivemos nosso tão esperado capítulo publicado on-line e na versão impressa, mas o melhor de tudo isso foi que provamos para aqueles que duvidavam da nossa capacidade e principalmente para nós mesmos o quanto somos competentes em realizarmos aquilo que almejamos.

Segue abaixo o link para acesso ao capítulo:

<http://www.intechopen.com/books/current-issues-in-molecular-virology-viral-genetics-and-biotechnological-applications/viral-counter-defense-x-antiviral-immunity-in-plants-mechanisms-for-survival>

**CURRENT ISSUES IN
MOLECULAR VIROLOGY**
VIRAL GENETICS AND
BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Edited by Victor Romanowski



INTECH

Chapter 11

**Viral Counter Defense X Antiviral Immunity in Plants:
Mechanisms for Survival**

Alessandra Tenório Costa, Juliana Pereira Bravo,
Rodrigo Kazuo Makiyama,
Alessandra Vasconcellos Nunes and Ivan G. Maia

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/56253>

1. Introduction

The history of plant virology dates to the late 19th century, when Iwanowski and Beijerinck, who were investigating the cause of a mysterious disease of tobacco, independently described an unusual agent that caused tobacco mosaic disease. This agent was later named *Tobacco mosaic virus* (TMV) [1]. During this period, viruses including *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) and *Lettuce mosaic virus* (LMV) were described. These viruses could be distinguished based on their transmission and method of disease induction. In addition, numerous techniques for the study of viruses were developed.

Viruses are among the most agriculturally important groups of plant pathogens, causing serious economic losses in many major crops by reducing yield and quality. A virus can be defined as a set of one or more nucleic acid template molecules, often encased in a protective coat of protein or lipoprotein, which is able to organise its own replication only within suitable host cells [1]. Because the genetic information encoded by viral genomes is limited, viruses depend entirely on host cells to replicate their genome and produce infectious progeny. Both plant and animal viruses can be classified according to the type of nucleic acid that makes up their genome. In plants, the vast majority of viruses have positive-sense (+) RNA genomes (i.e., the RNA genome has the same polarity as cellular mRNA), although negative-sense (–) RNA and double-stranded RNA viral genomes also exist. Other plant viruses have DNA genomes; the DNA can be double-stranded (caulimoviruses) or single-stranded (geminiviruses) [1, 2]. Cell-to-cell movement of plant viruses occurs through cytoplasmic “bridges” between cells

INTECH
open science | open minds

© 2013 Costa et al., licensee InTech. This is a paper distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.