

TARSIANE MARA CARNEIRO BARBOSA

**EFEITO DO SILENCIAMENTO DOS GENES *GmERD4* E *GmIMT* NO ACÚMULO  
DO *Cowpea mild mottle virus* EM PLANTAS DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B238e  
2018  
Barbosa, Tarsiane Mara Carneiro, 1992-  
Efeito do silenciamento dos genes *GmERD4* e *GmIMT* no  
acúmulo do *Cowpea mild mottle virus* em plantas de soja /  
Tarsiane Mara Carneiro Barbosa. – Viçosa, MG, 2018.  
viii, 45f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 41-45.

1. *Cowpea mild mottle virus*. 2. *Carlavirus*. 3. Vírus de  
plantas. 4. Soja - Doenças e pragas. 5. Silenciamento gênico.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 579.28

TARSIANE MARA CARNEIRO BARBOSA

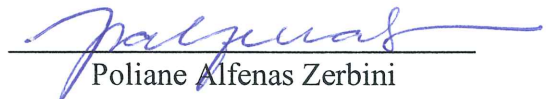
**EFEITO DO SILENCIAMENTO DOS GENES *GmERD4* E *GmIMT* NO ACÚMULO  
DO *Cowpea mild mottle virus* EM PLANTAS DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

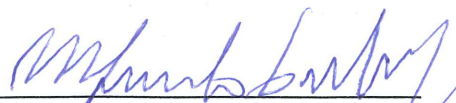
APROVADA: 31 de julho de 2018.



Eveline Teixeira Caixeta



Poliane Alfenas Zerbini



Francisco Murilo Zerbini Júnior  
(Orientador)

Aos meus pais, Cida e Luiz, e ao meu irmão Túlio.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me guiado e nunca me desamparado, sempre abençoado a minha vida.

Aos meus pais e meu irmão Túlio, pelo amor incondicional, compreensão e pelos ensinamentos. Agradeço por sempre acreditarem que eu podia realizar meus sonhos.

Ao Juninho, pela companhia diária ao longo dessa jornada, pela paciência, pelo carinho, por todo apoio, por sonhar este sonho comigo e compartilhar a alegria das minhas conquistas. Aos meus familiares e padrinhos pelas orações e por toda força transmitida para que eu consiga trilhar os meus caminhos.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realizar a minha formação em uma instituição de qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Claudine Márcia Carvalho pela oportunidade de participar do seu grupo e pela confiança.

Ao professor Francisco Murilo Zerbini pela disponibilidade, ensinamentos e ajuda valiosa no desenvolvimento do trabalho.

Às professoras Poliane Alfenas Zerbini e Eveline Teixeira Caixeta pela disponibilidade em poder participar da banca avaliadora e pelas valiosas observações para a correção da dissertação.

À Larissa, por toda orientação, pela paciência, pela confiança, pelo carinho. Obrigada por me ouvir, por aconselhar sempre. Sua amizade foi a minha fortaleza. Sem você nada disso teria se concretizado e sua ajuda foi essencial para que eu chegasse aonde cheguei.

Ao Murilo Alves que, mesmo distante, se fez presente em todos os momentos com seus conselhos, forças e acreditando no meu potencial.

À Angélica pela amizade valiosa, brincadeiras e momentos de desabafo. Obrigada por me guiar até aqui, a arrancar sorrisos em meio às lágrimas escondidas e pela companhia por longas horas do laboratório. Como você cantava: “Pra chegar onde eu cheguei abri mão da vaidade, e passar o que passei tem que ter força de vontade. Não me arrependo do que fiz, faria tudo de novo, pra chegar até aqui, sorrir, cantar para o meu povo.”

À Roberta por todo carinho, pelos abraços apertados, por acreditarem em mim, pela disponibilidade em me ajudar no EndNote, e pela companhia e amizade tão valiosa.

À Anelise por toda paciência e dedicação ao me ajudar nos experimentos do Northern blotting e também por todos os conselhos e conversar prazerosas.

À todos os amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular (LVVM), em sua antiga e atual formação, Ana Carolina P., Ana Carolina G., Ayane, Baltazar, Camila, Cesar, Diogo, Gabriela, Igor, Hermano, João Paulo A., João Paulo S., Josiane, Marcela, Márcio, Marcos, Monique, Osvaldo, Patrícia, Rafaela, Ruither, Sarah, Sílvia e Tales, por tornarem o ambiente de trabalho um lugar prazeroso, pelas brincadeiras, por todo incentivo e ajuda.

À todos que de alguma forma contribuíram, torceram por mim e me acompanharam durante toda essa etapa, sou imensamente grata.

## **BIOGRAFIA**

Tarsiane Mara Carneiro Barbosa, filha de Maria Aparecida Carneiro Barbosa e Luiz Carlos Barbosa, nasceu em 13 de março de 1992, em João Monlevade, Minas Gerais.

Cursou o ensino fundamental nas Escola Municipal Sebastião Francisco de Ávila e na Escola Estadual Padre Osvaldo de Podestá e o ensino médio na Escola Estadual José Modesto de Ávila, na cidade de Bela Vista de Minas, Minas Gerais.

No ano de 2011, ingressou no curso de graduação em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa (UFV), campus Viçosa-MG, vindo a graduar-se em julho de 2016.

Em agosto de 2016, iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 31 de julho de 2018.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. A Soja .....	3
2.2. A Família <i>Betaflexiviridae</i> .....	4
2.3. O Gênero <i>Carlavirus</i> .....	5
2.4. O <i>Cowpea mild mottle virus</i> .....	6
2.5. Componentes do Hospedeiro na Replicação Viral .....	10
2.6. Proteínas ERD4 e IMT interagem com a RdRp do CPMMV .....	11
2.7. Silenciamento Gênico Induzido por Vírus .....	16
3. OBJETIVO .....	20
3.1. Objetivo geral .....	20
3.2. Objetivos específicos .....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1. Material Vegetal .....	21
4.2. Silenciamento dos genes <i>GmERD4</i> e <i>GmIMT</i> .....	21
4.3. RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) .....	24
5. RESULTADOS .....	26
5.1. Eficiência do VIGS utilizando o vetor BPMV em diferentes cultivares de soja .....	26
5.2. Silenciamento dos genes <i>GmERD4</i> e <i>GmIMT</i> .....	29
5.3. A redução na expressão de <i>GmERD4</i> e <i>GmIMT</i> está relacionado a menor acúmulo do CPMMV nos estágios iniciais da infecção .....	31
6. DISCUSSÃO .....	36
7. CONCLUSÃO .....	40
8. LITERATURA CITADA .....	41

## RESUMO

BARBOSA, Tarsiane Mara Carneiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Efeito do silenciamento dos genes *GmERD4* e *GmIMT* no acúmulo do *Cowpea mild mottle virus* em plantas de soja.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Coorientadoras: Claudine Márcia Carvalho e Larissa Goulart Zanardo.

O *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV; família *Betaflexiviridae*, gênero *Carlavirus*), agente causal da necrose da haste da soja, é um vírus emergente no Brasil. Até o presente, poucos estudos abordaram a replicação dos betaflexivírus, sabendo-se apenas que ela ocorre no citoplasma. Duas proteínas de soja (*GmERD4*, associada a respostas a estresse hídrico, e *GmIMT*, uma inositol metiltransferase) foram previamente demonstradas serem capazes de interagir com o domínio RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) da replicase do CPMMV. A análise da expressão de ambos os genes em plantas de soja infectadas com o CPMMV demonstrou que estes são induzidos aos 3 e 7 dias após a inoculação (dai). Além disso, a superexpressão de *GmERD4* em protoplastos de soja aumentou o acúmulo viral. Assim, neste trabalho buscou-se melhor caracterizar a interação CPMMV-soja, utilizando o silenciamento gênico induzido por vírus (*virus-induced gene silencing* - VIGS). Os genes *GmERD4* e *GmIMT* foram silenciados com um vetor VIGS baseado no *Bean pod mottle virus* (BPMV). A expressão de ambos se encontrava reduzida em pelo menos 40-60% aos 5 e 14 dai das plantas de soja com o CPMMV. O silenciamento de *GmERD4* e *GmIMT* reduziu drasticamente o acúmulo do CPMMV aos 5 dai, e no caso das plantas silenciadas para *GmIMT*, até 14 dai. Esses resultados indicam que *GmERD4* é essencial durante os processos iniciais de infecção pelo CPMMV, enquanto *GmIMT* é essencial ao longo de todo o processo infeccioso. A interação entre o CPMMV e essas duas proteínas constitui, portanto, um alvo em potencial para o controle da necrose da haste da soja.

## ABSTRACT

BARBOSA, Tarsiane Mara Carneiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Effect of the silencing of the *GmERD4* and *GmIMT* genes on the accumulation of *Cowpea mild mottle virus* in soybean plants.** Adviser: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-advisers: Claudine Márcia Carvalho and Larissa Goulart Zanardo.

*Cowpea mild mottle virus* (CPMMV; family *Betaflexiviridae*, genus *Carlavirus*), the causal agent of soybean stem necrosis, is an emergent virus in Brazil. To date, very few studies have addressed the replication of betaflexiviruses, to the extent that little else is known besides that replication takes place in the cytoplasm. Two soybean proteins (*GmERD4*, associated with responses to drought, and *GmIMT*, an inositol methyltransferase) have been previously shown to interact with the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domain of the CPMMV replicase protein. Expression analysis of both genes in CPMMV-infected soybean plants demonstrated that they are induced at 3 and 7 days after inoculation (dai). Furthermore, overexpression of *GmERD4* in soybean protoplasts increased viral accumulation. In this context, this work was conducted to better characterize the CPMMV-soybean interaction. We used virus-induced gene silencing (VIGS) with a *Bean pod mottle virus* (BPMV)-based VIGS vector to silence *GmERD4* and *GmIMT*. Expression of both genes was reduced by 40-60% at 5 and 14 dai of soybean plants with CPMMV. Strikingly, silencing of *GmERD4* and *GmIMT* drastically reduced CPMMV accumulation at 5 dai, and up to 14 dai in the case of *GmIMT*-silenced plants. These results indicate that *GmERD4* is essential during the early stages of CPMMV infection, while *GmIMT* is essential during the entire infection process. Therefore, the interaction between CPMMV and these two proteins constitutes a potential target of antiviral measures for the control of soybean stem necrosis.

## 1. INTRODUÇÃO

Os vírus de plantas possuem genoma pequeno, e em sua absoluta maioria codificam em torno de 3 a 10 proteínas. Assim, a maioria das etapas necessárias para o sucesso da infecção viral envolve interações entre componentes virais e componentes do hospedeiro. A identificação desses e suas contribuições para o sucesso da infecção viral é de grande importância, uma vez que os componentes do hospedeiro desempenham muitas vezes papéis essenciais.

Os vírus de RNA de fita simples positivo [(+)ssRNA] são os mais comuns entre os vírus de plantas e muitos destes afetam importantes culturas agrícolas. Após a entrada das partículas virais nas células hospedeiras, os RNAs genômicos virais são liberados para o citoplasma do hospedeiro e atuam como mRNAs, direcionando a tradução de suas proteínas (normalmente aquelas associadas à replicação viral) pela maquinaria de tradução do hospedeiro (Dreher e Miller, 2006; Simon e Miller, 2013; Hyodo e Okuno, 2014).

A família *Betaflexiviridae* é composta por vírus de (+)ssRNA e atualmente inclui onze gêneros, entre eles o gênero *Carlavirus*. O carlavírus *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) é o agente causal da necrose da haste da soja, uma das mais importantes doenças virais da soja no Brasil (Almeida, 2008). Os sintomas em plantas infectadas variam de mosaico e clareamento de nervuras até necrose sistêmica (Zanardo, 2017; Zanardo e Carvalho, 2017).

Supõe-se que a replicação dos vírus pertencentes à família *Betaflexiviridae* seja citoplasmática (Adams e Kreuze, 2015) e possivelmente associada ao retículo endoplasmático (RE) (Chen e Ahlquist, 2000; Suhy *et al.*, 2000; Bamunusinghe *et al.*, 2009; Zanardo, 2017). Estudos de localização subcelular do domínio RdRp da replicase viral mostraram que este se encontra associado à rede do RE. Esse domínio interage *in vivo* e *in vitro* com duas proteínas em plantas de soja: GmERD4 e GmIMT. Essas proteínas são induzidas nos estágios iniciais da

infecção pelo CPMMV. Além disso, a superexpressão de *GmERD4* levou a um aumento no acúmulo do CPMMV (Zanardo, 2017).

Com o objetivo de validar os resultados obtidos por Zanardo (2017), utilizou-se a técnica de silenciamento gênico induzido por vírus (*virus-induced gene silencing* - VIGS) para reduzir a expressão dos genes *GmERD4* e *GmIMT* em plantas de soja e verificar se essa redução afeta o acúmulo do CPMMV. Espera-se agregar novos conhecimentos sobre o CPMMV (e sobre os vírus pertencentes ao gênero *Carlavirus* de modo geral), no sentido de desenvolver métodos eficazes para o controle da importante virose por ele causada.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A soja

A soja ocupa posição de destaque dentre os grãos mais produzidos no Brasil. A produção começou a crescer vertiginosamente a partir do início da década de 1980, quando a cultura tornou-se a mais importante do agronegócio do país. Ao longo dos anos vem apresentando um crescimento acentuado devido a maiores investimentos em pesquisa e tecnologia, bem como à ampliação da área de cultivo e ao maior rendimento da produção (Embrapa, 2017). No entanto, a monocultura da soja praticada em todo o país favorece o surgimento de doenças que afetam o desenvolvimento das sementes e/ou das plantas e, conseqüentemente, a produtividade das lavouras e a qualidade das sementes (Henning *et al.*, 2014).

Desde a safra 2000/01, uma virose vem preocupando agricultores no Brasil por sua rápida disseminação e por causar, muitas vezes, grandes perdas da produção (Almeida *et al.*, 2003; Almeida, 2008). Conhecida como necrose da haste da soja, essa doença causa a queima do broto e a necrose das hastes e nervuras, podendo levar as plantas à morte (Henning *et al.*, 2014). Pode apresentar também sintomas menos severos que não necessariamente matam a planta, como nanismo, deformação foliar e mosaico (Almeida *et al.*, 2003; Henning *et al.*, 2014).

O agente causador da necrose da haste é o vírus *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), pertencente à família *Betaflexiviridae* e gênero *Carlavirus* (Zanardo e Carvalho, 2017). O CPPMV é transmitido de forma não-persistente por moscas-brancas do complexo de espécies crípticas *Bemisia tabaci* (Zanardo, 2017).

## 2.2. A família *Betaflexiviridae*

A família *Betaflexiviridae* é composta por vírus de plantas com genoma de RNA de fita simples sentido positivo, com um "cap" (m7GpppG) na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3', e partículas alongadas flexuosas com 600-1000 nm de comprimento. A família é subdividida em duas subfamílias (*Trivirinae* e *Quinvirinae*) e contém onze gêneros: *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Chordovirus*, *Citrivirus*, *Divavirus*, *Foveavirus*, *Prunevirus*, *Robigovirus*, *Tepovirus*, *Trichovirus* e *Vitivirus* (ICTV, 2016). A subfamília *Quinvirinae* inclui três gêneros (*Carlavirus*, *Foveavirus* e *Robivirus*) que possuem um bloco triplo de genes (*triple gene block* - TGB) que codifica as proteínas de movimento, enquanto a subfamília *Trivirinae* inclui os demais gêneros com proteína de movimento tipo 30K (Adams e Kreuze, 2015).

Os vírus pertencentes a diferentes espécies na família devem apresentar menos de 72% de identidade nas sequências de nucleotídeos dos genes que codificam a replicase e a proteína capsidial, e 80% de identidade nas sequências de aminoácidos dessas proteínas. Vírus classificados em gêneros distintos geralmente possuem cerca de 45% de identidade nas sequências de nucleotídeos desses genes (Adams e Kreuze, 2015).

Em sua organização genômica, os membros da família podem possuir até seis fases abertas de leitura (*open reading frames* - ORFs) traduzidas via RNAs subgenômicos (Martelli *et al.*, 2007). O número de ORFs varia entre os gêneros e mesmo entre algumas espécies em alguns gêneros.

A primeira ORF codifica a replicase viral, que possui diversos domínios conservados: metiltransferase, RNA helicase e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), todos envolvidos na replicação viral (Martelli *et al.*, 2007). Em seguida estão as ORFs que codificam as proteínas responsáveis pelo movimento viral, tanto célula-a-célula quanto a longa distância. Nos gêneros *Carlavirus*, *Foveavirus* e *Robigovirus* (subfamília *Quinvirinae*) essas proteínas são codificadas pelas ORFs 2, 3 e 4, que formam o TGB. Os demais gêneros (subfamília

*Trivirinae*) possuem apenas uma proteína envolvida no movimento viral (Martelli *et al.*, 2007). As ORFs 5 e 6 (subfamília *Quinvirinae*) ou 2 e 3 (subfamília *Trivirinae*) codificam respectivamente a proteína capsidial (CP) e uma proteína rica em cisteína (*cystein-rich protein*, CRP) que possui atividade de ligação a ácidos nucleicos (*nucleic acid-binding protein*, NABP) (Martelli *et al.*, 2007). A CRP de alguns betaflexivírus também possui a capacidade de suprimir o silenciamento gênico, conforme comprovado em estudos com *Potato virus M* (PVM, gênero *Carlavirus*) e *Grapevine virus A* (GVA, gênero *Vitivirus*) (Zhao *et al.*, 2006).

### **2.3. O gênero *Carlavirus***

O gênero *Carlavirus* é assim denominado devido ao membro *Carnation latent virus* (CLV) (Harrison *et al.*, 1971). Atualmente são reconhecidas 47 espécies, sendo o gênero com o maior número de espécies dentro da família *Betaflexiviridae* (Zanardo e Carvalho, 2017). As partículas virais possuem comprimento de 610-700 nm. Assim como nos demais gêneros da família *Betaflexiviridae*, o RNA viral é capeado na extremidade 5' e poliadenilado na extremidade 3' (King *et al.*, 2011).

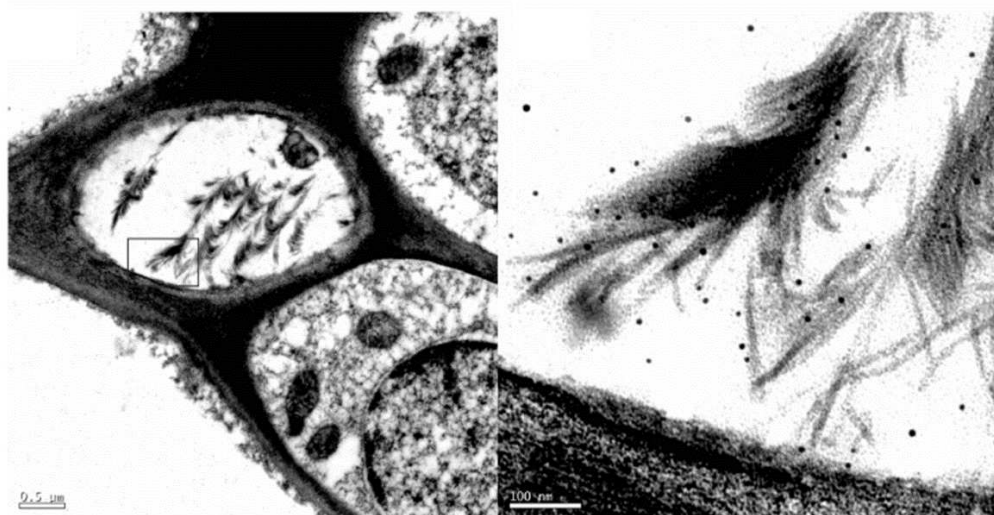
Cada membro do gênero *Carlavirus* geralmente possui um hospedeiro natural específico. São transmitidos de forma não-persistente por afídeos (King *et al.*, 2011), com exceção do *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) (Almeida *et al.*, 2005), *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) (Nagata *et al.*, 2005) e *Cucumber vein-clearing virus* (Menzel *et al.*, 2011), cuja transmissão é mediada por moscas-brancas do complexo *Bemisia tabaci*. A transmissão mecânica é possível para todas as espécies do gênero. Os sintomas causados nas plantas hospedeiras podem variar de brandos a severos dependendo das condições ambientais, da espécie ou estirpe de vírus e do cultivar infectado (Figura 3) (Zanardo, 2017; Zanardo e Carvalho, 2017). Há também diversos casos de hospedeiros assintomáticos (Martelli *et al.*, 2007).

Diversos membros do gênero *Carlavirus* já foram relatados no Brasil. O mais importante economicamente é o *Cowpea mild mottle virus*, relatado em feijão (Costa *et al.*, 1983) e soja (Almeida *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2005; Almeida, 2008; Gaspar *et al.*, 2008; Zanardo *et al.*, 2014a; Zanardo *et al.*, 2014b). Também foram relatados o *Potato virus S* (PVS) em batata (Gaspar *et al.*, 2008), o *Garlic common latent virus* (GCLV) em alho (Fajardo *et al.*, 2001), o *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) em melão (Nagata *et al.*, 2005) e o *Lily symptomless virus* (LSV) em lírio (Rivas, 2010).

#### **2.4. O *Cowpea mild mottle virus***

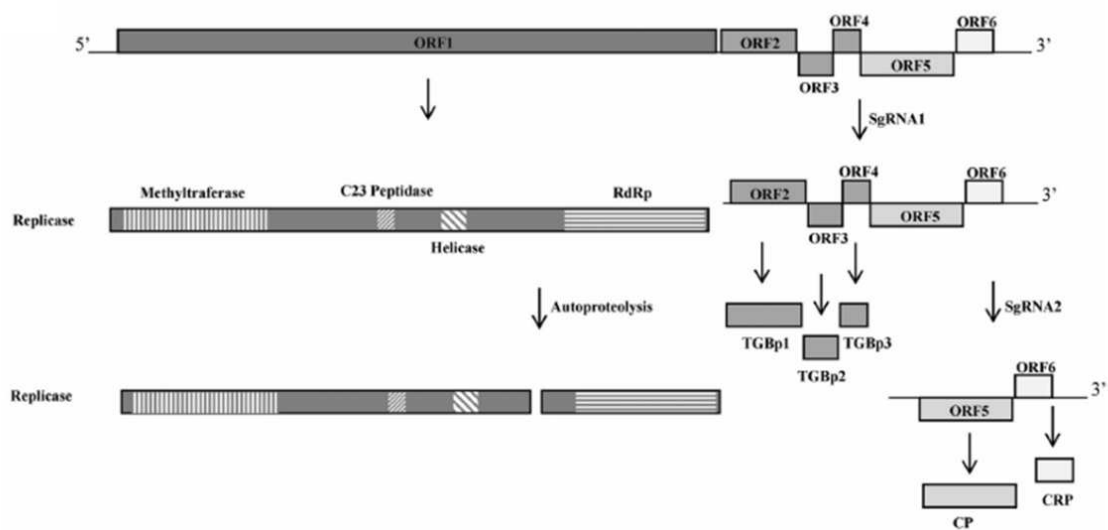
Uma importante virose causada por um carlavírus no Brasil é a necrose da haste da soja, cujo agente etiológico é o *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV). O CPMMV foi inicialmente descrito por Costa *et al.* (1983), como agente causal do "mosaico angular" em feijoeiro Jalo, e foi incluído no gênero *Carlavirus* a partir do trabalho de Iwaki *et al.* (1982), no qual foi constatado que algumas propriedades de um isolado de CPMMV da Tailândia eram similares àquelas descritas para os vírus desse gênero. O CPMMV é capaz de infectar diversas plantas de importância econômica, incluindo o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glycine max*) e o amendoim (*Arachis hypogaea*) (Figura 2) (Menzel *et al.*, 2010; Zanardo *et al.*, 2014a; Zanardo *et al.*, 2014b).

Assim como os demais carlavírus, o CPMMV possui genoma composto por uma molécula de RNA fita simples senso positivo capeada na extremidade 5' e poliadenilada na extremidade 3' (Zanardo e Carvalho, 2017). Medindo 600-650 x 10-15 nm, as partículas virais são encontradas na epiderme, mesofilo e parênquima foliares, formando agregados em forma de feixes e inclusões tipo escova (Zanardo e Carvalho, 2017) (Figura 1).



**Figura 1.** Micrografia eletrônica de transmissão de folhas de soja cv. CD206 infectada por CPMMV, aos 14 dias após inoculação mecânica, mostrando as inclusões em forma de escova. Reproduzido de Zanardo e Carvalho (2017).

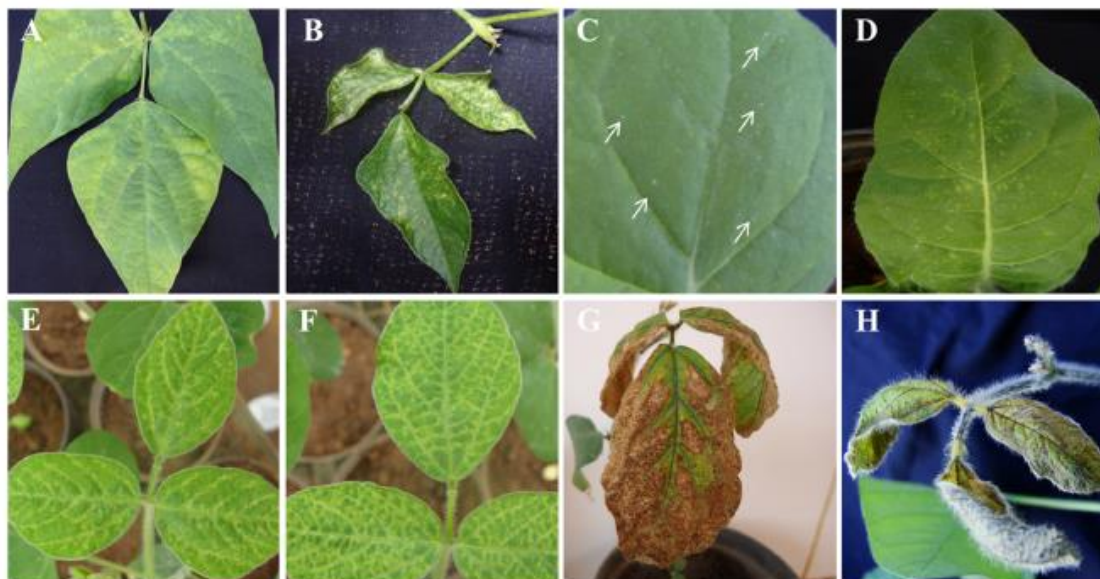
O genoma possui aproximadamente 8.200 nucleotídeos, e é organizado em seis ORFs. A ORF1 codifica a replicase viral (223 kDa) e apresenta quatro domínios conservados: metiltransferase, peptidase, RNA helicase e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). As ORFs 2, 3 e 4 formam o bloco triplo de genes (TGB1p, 25kDa; TGB2p, 12kDa; TGB3p, 7kDa) responsáveis pelo movimento das partículas virais. A ORF5 codifica a proteína capsidial (CP, 34 kDa) e a ORF6, uma proteína rica em cisteína (CRP, 15 kDa) com atividade de ligação a ácidos nucleicos (NABP). Dentre as seis ORFs, somente a ORF1 é traduzida a partir do RNA genômico, sendo as demais traduzidas por meio de RNAs subgenômicos (sg RNAs) (Zanardo e Carvalho, 2017) (Figura 2).



**Figura 2.** Organização genômica do CPMMV e estratégia utilizada para expressão de proteínas. A ORF1 é a única traduzida a partir do RNA genômico, gerando uma poliproteína que é autoclivada entre os domínios RNA helicase e RdRp, sendo removido um fragmento de 30-40 kDa. As demais proteínas são traduzidas por meio de RNAs subgenômicos (sgRNAs). O primeiro sgRNA é responsável pela tradução do TGB (ORFs 2, 3 e 4) e o segundo sgRNA pela tradução das ORFs que codificam CP (ORF 5) e CRP (ORF 6). Reproduzido de Zanardo e Carvalho (2017).

O CPMMV é transmitido de forma não-persistente pela mosca branca *Bemisia tabaci*, e infecta naturalmente apenas hospedeiros pertencentes à família Fabaceae, causando sintomas muito variáveis que dependem do hospedeiro, do isolado viral e das condições ambientais (Zanardo *et al.*, 2014a; Zanardo e Carvalho, 2017).

O CPMMV se tornou preocupante entre os agricultores durante a safra 2000/2001, quando a necrose da haste causou grandes perdas em cultivos de soja na região Centro-Oeste. Em anos posteriores sua ocorrência foi relatada em regiões produtoras a mais de 200 km do primeiro foco (Almeida *et al.*, 2003). Zanardo e Carvalho (2017) relataram que diferentes estirpes virais são capazes de causar sintomas variados em soja, e que mesmo entre isolados da mesma estirpe pode haver variação de sintomas, de brandos a severos (Figura 3).



**Figura 3.** Sintomas induzidos por isolados de *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) em diferentes hospedeiros. **A.** Mosaico em feijão comum cv. Jalo; **B.** Mosaico em caupi cv. B7 Gurguéia; **C.** Lesões locais (indicadas pelas setas brancas) em *Nicotiana benthamiana*; **D.** Lesões locais cloróticas em *N. debneyi*; **E, F.** Mosaico e clareamento de nervuras em soja cv. CD206; **G.** Necrose sistêmica em soja cv. CD206; **H.** Abortamento de broto, necrose foliar e da haste em soja cv. CD206. Reproduzido de Zanardo e Carvalho (2017).

Recentemente ocorreu o surgimento (ou ressurgimento) do CPMMV infectando feijão transgênico no Brasil. A ocorrência foi relatada em uma linhagem transgênica de feijão comum que foi liberada para produção comercial em 2011 (Faria *et al.*, 2016). Essa linhagem é resistente a outro vírus, o *Bean golden mosaic virus* (BGMV; gên. *Begomovirus*, fam. *Geminiviridae*), um dos principais patógenos do feijoeiro no Brasil. A linhagem transgênica foi liberada após quatro décadas de pesquisas visando resistência ao BGMV, porém com o surgimento do CPMMV apenas dois anos após o lançamento, a comercialização ainda não ocorreu. Isto enfatiza o risco de surgimento do CPMMV em outras situações, como outras plantas cultivadas ou em outras regiões geográficas (Zanardo e Carvalho, 2017).

## 2.5. Componentes do hospedeiro na replicação viral

Vírus de RNA possuem genomas pequenos que codificam um número limitado de proteínas, estabelecendo redes complexas de interações proteína-proteína, RNA-proteína e proteína-lipídeo com os componentes da célula hospedeira (Vidalain e Tangy, 2010). Essas interações levam à formação de complexos de replicação viral que produzem a progênie de RNA viral nas células hospedeiras (Nagy e Pogany, 2012).

As interações com o hospedeiro desencadeiam inúmeras alterações nas organelas celulares (formação de esférulas, vesículas e corpos vesiculares) que são necessárias para a replicação do genoma viral ou para o movimento célula-a-célula do vírus (Barajas *et al.*, 2006; Zanardo, 2017). Em particular, vírus de RNA positivo [(+)ssRNA] que infectam mamíferos e plantas montam seus complexos de replicação em membranas intracelulares em associação com a formação de vesículas ou outros rearranjos de membrana (Ahlquist *et al.*, 2003).

Supõe-se que a replicação dos membros da família *Betaflexivirus* seja citoplasmática (King *et al.*, 2011) e, possivelmente, associada ao retículo endoplasmático (RE), como ocorre com muitos outros vírus de (+)ssRNA (Chen e Ahlquist, 2000; Suhy *et al.*, 2000; Bamunusinghe *et al.*, 2009; Zanardo, 2017). Para um dos membros da família *Betaflexiviridae*, o *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV; gên. *Foveavirus*), foi demonstrado que o domínio metiltransferase da replicase viral é capaz de induzir corpos puntiformes próximos à rede do retículo endoplasmático em células foliares de *Nicotiana benthamiana* e em protoplastos de tabaco. Análises de bioinformática e de fracionamento de membranas subcelulares mostraram a associação da replicase com membranas celulares, embora a natureza da membrana seja desconhecida (Prosser *et al.*, 2015; Tarquini *et al.*, 2018).

## 2.6. Proteínas ERD4 e IMT interagem com a RdRp do CPMMV

Zanardo (2017) demonstrou, por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro*, que a replicase do CPMMV é capaz de interagir com duas proteínas de soja, a proteína tipo CSC1 ERD4 ("early responsive to dehydration stress" - GmERD4) e uma proteína da família das metiltransferases (inositol metiltransferase - GmIMT).

Os primeiros estudos a respeito dos genes *ERD* abordaram a participação destes em respostas a estresses abióticos, devido à sua capacidade de serem rapidamente induzidos pela desidratação. A caracterização funcional dos genes *ERD1* a *ERD16* demonstrou que eles exibem funções bioquímicas heterogêneas e diversificadas. As proteínas codificadas apresentam uma grande diversidade estrutural e funcional, com uma classe particular de proteínas atuando como conectores das vias de resposta ao estresse (Alves *et al.*, 2011b). Estas proteínas são citadas frequentemente na literatura como relacionadas a estresse hídrico.

O gene *ERD15* foi primeiramente descrito como um gene de resposta rápida à seca em *Arabidopsis*, que conectava o estresse do RE com um sinal de morte celular induzido por estresse osmótico (Alves *et al.*, 2011a; Alves *et al.*, 2011b). Kariola *et al.* (2006) relataram que *ERD15* interconecta respostas de estresse abiótico e biótico, demonstrando que o gene foi induzido por seca, frio e ataque de patógenos. Chen *et al.* (2017) observaram que a infecção pelo *Potato virus Y* em plantas de *Nicotiana tabacum* resistentes induz vários genes que codificam proteínas ERD. Este trabalho correlacionou a participação de genes *ERD* em resposta a estresse biótico.

Em torno de dezesseis DNAs complementares a resposta precoce a desidratação foram observados em *Arabidopsis thaliana*, incluindo ERD4 (Kiyosue *et al.*, 1994). Plantas transgênicas de *Arabidopsis* expressando constitutivamente o gene *ZmERD4* evidenciaram que este desempenha um papel importante nos estágios iniciais de adaptação da planta às condições de estresse, aumentando a tolerância à seca e ao estresse salino (Liu *et al.*, 2009). Zanardo

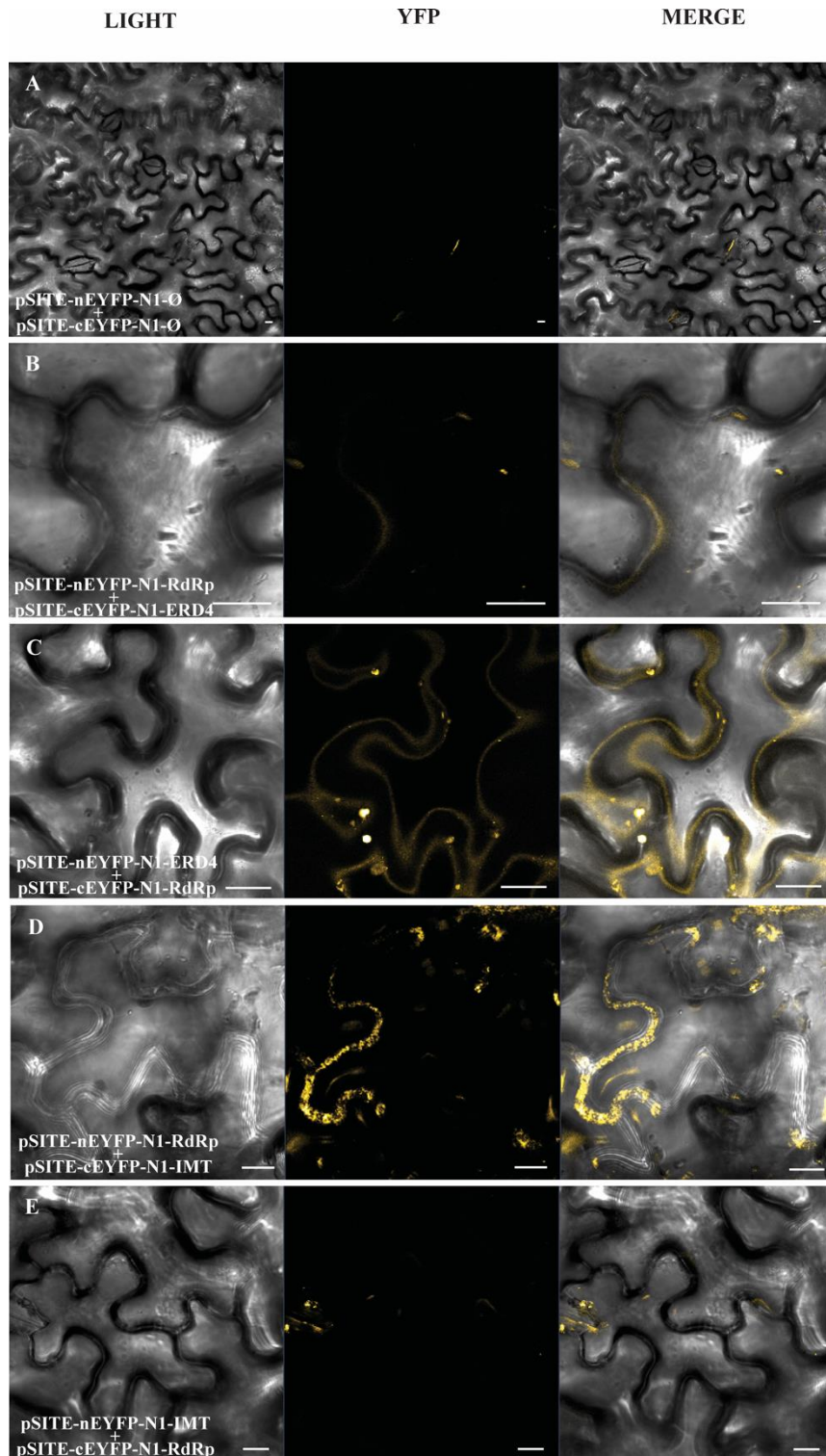
(2017) observou que GmERD4 é induzido mediante estresse biótico causado pela infecção por CPMMV e que esta proteína é capaz de interagir com o domínio RdRp de CPMMV (Figura 4).

A segunda proteína avaliada no presente estudo foi a Inositol Metiltransferase (*GmIMT*). Esta tem sido associado à metilação de mio-inositol formando O-metil inositol (D-ononitol) em plantas sob estresse abiótico (Ahn *et al.*, 2011). O gene *IMT* foi clonado a partir de *M. crystallinum* e também da variante de arroz selvagem *Porteresia coarctata*, e em ambos os casos a transcrição do gene foi induzida por estresse osmótico. Estudos subsequentes mostraram haver expressão alterada em resposta à salinidade, à seca e ao frio (Chiera *et al.*, 2006). A expressão constitutiva do gene *IMT* em tabaco mostrou aumentar a tolerância ao sal e à seca (Sheveleva *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 2011). O acúmulo de D-ononitol proporcionou a essas plantas uma proteção reforçada contra a seca e estresse salino. Ahn *et al.* (2011) verificaram que plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando *GmIMT* de soja também apresentaram melhor tolerância a estresse hídrico e, em menor escala, quando submetidas a elevadas concentrações de sais. Até o momento, independentemente do hospedeiro, a expressão do gene *IMT* tem sido sempre associada a estresses abióticos (Zanardo, 2017).

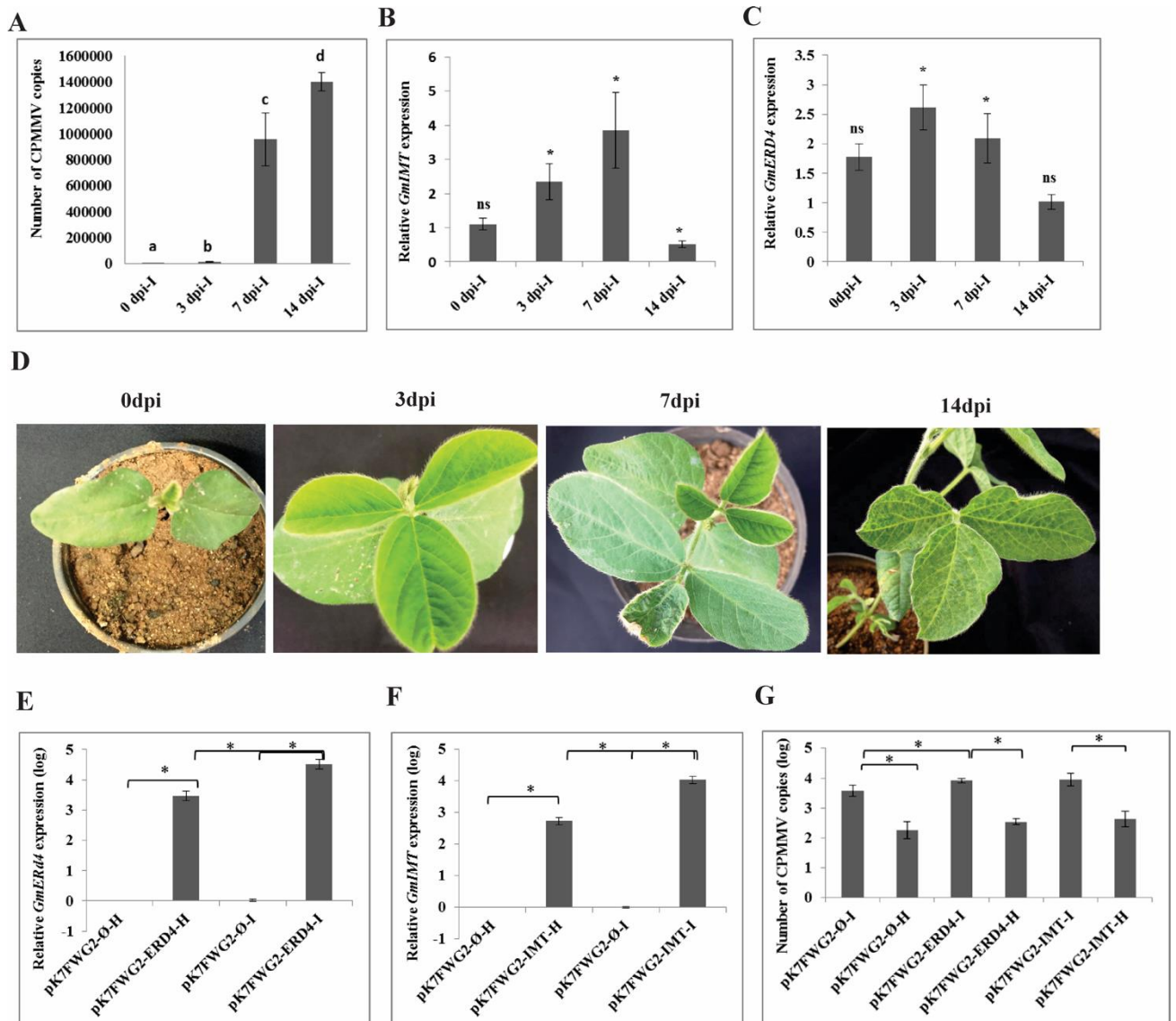
Zanardo (2017) demonstrou, por meio de ensaios de interação por duplo-híbrido de levedura e BiFC, que a proteína *GmIMT* é capaz de se associar à proteína de replicação do CPMMV (Figura 4). Além disso, demonstrou que *GmIMT* possui um domínio metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina e um domínio hélice-volta-hélice de ligação a DNA ("winged helix", WH) (Zanardo, 2017). O domínio WH é encontrado nos principais componentes dos sistemas de transcrição em eucariotos e procariontes, participando no estabelecimento de interações proteína-DNA e proteína-proteína. Este domínio está envolvido em diferentes vias celulares, desde a regulação da transcrição até o processamento do RNA (Teichmann *et al.*, 2012). Essas funções permitem especular o motivo da interação com *GmIMT* nas etapas de replicação do CPMMV.

Por meio de análises de bioinformática foi possível prever a localização subcelular do domínio da RdRp do CPMMV e das proteínas GmERD4 e GmIMT (Zanardo, 2017). O domínio RdRp induziu a formação de estruturas pontuais na membrana plasmática e na rede do RE, enquanto GmERD4 foi localizada no RE e GmIMT apresentou localização citoplasmática. Supõe-se que a replicação dos vírus pertencentes à família *Betaflexiviridae* seja citoplasmática (Adams e Kreuze, 2015) e possivelmente associada ao retículo endoplasmático (RE) (Chen e Ahlquist, 2000; Suhy *et al.*, 2000; Bamunusinghe *et al.*, 2009; Zanardo, 2017).

A análise da expressão de ambos os genes em plantas de soja infectadas com o CPMMV demonstrou que *GmERD4* e *GmIMT* foram induzidos aos 3 e 7 dias após a inoculação (dai) (Figura 5). Uma vez que isto foi observado, procedeu-se com a superexpressão de *GmERD4* e *GmIMT* em protoplastos de soja infectados com CPMMV e verificou-se que a superexpressão de *GmERD4* aumentou o acúmulo viral aos 7 dai (Figura 5). Além disso, observou-se que a proteína GmERD4 apresenta domínios de ligação a RNA, de forma que ela poderia estar associada à replicase para conferir estabilidade ao RNA viral nascente, garantindo sua proteção e direcionamento correto através do transporte vesicular celular. Já GmIMT atuaria no processo de metilação do RNA, e uma vez associada à replicase viral este processo seria evitado, impedindo a ativação do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (Zanardo, 2017).



**Figura 4.** Interação *in vivo* entre o domínio RdRp da replicase CPMMV e as proteínas GmERD4 e GmIMT, por meio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC); **A.** Co-infiltração de pSITE-nEYFP-N1-Ø e pSITE-cEYFP-N1-Ø (controle negativo); **B, C.** Co-infiltração de pSITE-nEYFP-N1 e pSITE-cEYFP-N1 em fusão com o domínio RdRp e GmERD4, nas combinações descritas abaixo das figuras; **D, E.** Co-infiltração de pSITE-nEYFP-N1 e pSITE-cEYFP-N1 em fusão com o domínio RdRp e GmIMT, nas combinações descritas abaixo das figuras. As imagens foram adquiridas a partir de folhas de *Nicotiana benthamiana* co-expressando as construções na presença do supressor de silenciamento p19 do *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), 72 h após a co-infiltração. Barras de escala, 10 µm. Reproduzido de Zanardo (2017).



**Figura 5.** Análise de expressão de *GmERD4* e *GmIMT* em plantas e protoplastos infectados pelo *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV). **A.** Acúmulo de CPMMV em plantas de soja cv. CD 206 aos 0, 3, 7 e 14 dias após a inoculação (dai); **B., C.** Expressão relativa de *GmERD4* e *GmIMT* em plantas de soja cv. CD206 aos 0, 3, 7 e 14 dpi; **D.** Sintomas induzidos pelo CPMMV aos 0, 3, 7 e 14 dpi em soja cv. CD206. Apenas aos 14 dpi foram observados sintomas típicos de infecção; **E., F.** Expressão relativa em protoplastos de soja saudáveis (H) e infectados (I) transformados com pK7FWG2-Ø, pK7FWG2-ERD4 ou pK7FWG2-IMT; **G.** Acúmulo de CPMMV aos 7 dpi em protoplastos de soja saudáveis (H) e infectados (I) superexpressando *GmERD4* e *GmIMT*. Todas as análises foram feitas usando três repetições e comparadas usando o teste *t* de Student em  $p < 0,05$ . ns, não significativo. \*, significativo. Reproduzido de Zanardo (2017).

## 2.7. Silenciamento gênico induzido por vírus

O silenciamento gênico induzido por vírus ("virus-induced gene silencing", VIGS) explora o silenciamento de RNA, um sistema imune inato das plantas para regulação da expressão gênica, defesa a transposons e a vírus (Baulcombe, 1999; Lange *et al.*, 2013). O silenciamento de RNA é desencadeado por RNAs de dupla fita (dsRNAs) que são reconhecidos e processados por proteínas da família Dicer em animais e DCL ("Dicer-like") em plantas, gerando os pequenos RNAs de interferência ("small interfering RNAs", siRNAs), variando de 21 a 25 nucleotídeos (nt) (Hutvagner *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2016). Os siRNAs se associam ao complexo de silenciamento induzido por RNA ("RNA-induced silencing complex", RISC), e este degrada mRNAs celulares de forma sequência-específica resultando na redução da expressão gênica ao nível pós-transcricional (Younis *et al.*, 2014). Intermediários de replicação formando estruturas de dsRNA são gerados durante o ciclo de diversos vírus, levando a degradação de RNAs virais. Assim, os vírus codificam proteínas capazes de suprimir o silenciamento, possibilitando o estabelecimento da infecção em hospedeiros compatíveis (Diaz-Pendon e Ding, 2008).

Em ensaios de VIGS, fragmentos em torno de 400 nt são selecionados a partir da sequência codificadora do gene de interesse, e são clonados em um vetor viral. A construção é inoculada na planta, permitindo que o vírus replique. A replicação viral dispara o mecanismo de silenciamento, gerando siRNAs correspondentes ao vírus e ao gene de interesse. Os siRNAs direcionam o silenciamento de mRNAs homólogos a eles, o que acarreta o silenciamento do vetor viral e também do gene de interesse. Esta técnica é altamente eficiente para reduzir de forma específica os níveis de expressão de genes endógenos (Angell e Baulcombe, 1999).

Em plantas, VIGS tem sido uma ferramenta importante para estudos de identificação e análise funcional de genes (Senthil-Kumar e Mysore, 2011). Em espécies de plantas não-modelo, a transformação genética é muitas vezes instável, trabalhosa e demorada, dificultando

a análise funcional de genes. O VIGS pode servir como uma alternativa para as coleções de mutantes ou plantas transgênicas, permitindo a caracterização de funções de genes em uma ampla gama de espécies de angiospermas, embora de maneira transitória (Lange *et al.*, 2013).

Os vetores VIGS mais amplamente utilizados são baseados no *Potato virus X* (PVX; gên. *Potexvirus*, fam. *Alphaflexiviridae*) e *Tobacco rattle virus* (TRV; gên. *Tobravirus*, fam. *Virgaviridae*), e suas aplicações têm sido estudadas principalmente em *N. benthamiana*, onde a resposta VIGS é geralmente mais forte e mais duradoura do que em outras plantas (Unver e Budak, 2009). Para soja, as respostas podem ser altamente variadas, justamente por se tratar de um hospedeiro com variações genéticas. Assim, nem todas as cultivares são suscetíveis aos vetores virais, e os fenótipos de infecção e silenciamento diferem dos que são comumente observados para *N. benthamiana* e *Arabidopsis*. Existem poucos exemplos de vetores virais que são adequados como vetores de VIGS para leguminosas. Estes incluem o *Pea early browning virus* (PEBV), *Bean pod mottle virus* (BPMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Apple latent spherical virus* (ALSV). O PEBV (gên. *Tobravirus*) foi utilizado com sucesso em *Pisum sativum* (ervilha), *Medicago truncatula* e *Lathyrus odorata*. Os vetores baseados no BPMV (gên. *Comovirus*, fam. *Secoviridae*), CMV (gên. *Cucumovirus*, fam. *Bromoviridae*) e ALSV (gên. *Cheravirus*, fam. *Secoviridae*) tem sido os mais comumente utilizados para silenciar genes ou para expressar proteínas heterólogas em soja (Díaz-Camino *et al.*, 2011).

No caso específico da soja, o processo de transformação ainda apresenta certas dificuldades. A fim de solucionar este problema, o vetor VIGS baseado no BPMV foi desenvolvido (Zhang e Ghabrial, 2006; Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). O BPMV possui um genoma de (+)ssRNA bissegmentado constituído por RNA1 (~ 6,0 kb) e RNA2 (~ 3,6 kb), que são encapsidados separadamente em partículas isométricas. O seu genoma é expresso por meio da síntese de poliproteínas que são posteriormente processadas. O RNA1 codifica cinco proteínas envolvidas no processo de replicação, enquanto o RNA2 codifica uma proteína de

movimento célula-a-célula (MP) e duas proteínas capsidiais (L-CP e S-CP). O vetor VIGS é denominado pGG7R2-V e deriva do RNA2. Para a inserção de sequências heterólogas, os sítios de reconhecimento das enzimas *Bam*HI e *Msc*I foram inseridos na região que codifica a MP e L-CP. Além disso, sítios de clivagem dessas mesmas enzimas de restrição foram criados, duplicando o local de clivagem entre MP e L-CP para incluir sequências heterólogas, garantindo o processamento adequado da poliproteína codificada pelo RNA2 (Kachroo e Ghabrial, 2012). Ao utilizar uma construção recombinante do RNA2 que continha uma porção do gene fitoeno dessaturase (*PDS*, que codifica uma enzima envolvida na biossíntese de pigmentos carotenoides), plantas de soja foram coinfetadas com o BPMV-RNA1, e este processo resultou em foto-oxidação (branqueamento) das plantas devido ao silenciamento do gene (Zhang e Ghabrial, 2006).

O gene *PDS* é frequentemente usado como controle positivo para confirmar que as condições foram adequadas para o silenciamento (Ding *et al.*, 2006; Igarashi *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Whitham *et al.*, 2017). Na soja já foi observado que há uma grande diversidade de fenótipos possíveis para o VIGS utilizando *PDS* como gene repórter em inúmeros vetores existentes para as mais diversas cultivares. Pode-se observar, por exemplo, sintomas de mosaico facilmente confundíveis com o fenótipo de infecção viral, foto-branqueamento como fenótipo característico, mas também sendo observadas plantas sem fenótipo aparente (Zhang e Ghabrial, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016; Whitham *et al.*, 2017; Gedling *et al.*, 2018).

Zhang *et al.* (2010) mostraram haver variação fenotípica em virtude da região do gene *GmPDS* (5'-UTR, região 5', região 3' e 3'-UTR) clonada no vetor BPMV. Além disso, os autores variaram a posição de inserção do gene no vetor BPMV. A clonagem da região 3'-UTR anti-senso causou branqueamento tipo mosaico, enquanto a inserção da 3'-UTR do gene *GmPDS*

causou pouca fotodegradação. A porção 5'-UTR nas orientações senso ou anti-senso causaram relativamente pouco foto-branqueamento sob as mesmas condições.

A técnica de VIGS neste trabalho foi aplicada para promover o silenciamento gênico em plantas de soja, com o intuito de averiguar se a interação entre as proteínas GmERD4 e GmIMT com a RdRp do CPMMV ocorre *in planta*.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a interação entre as proteínas GmERD4 e GmIMT com a RdRp do CPMMV *in planta*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- a. Padronizar um protocolo para VIGS em soja.
- b. Avaliar o silenciamento gênico dos genes *GmERD4* e *GmIMT* de soja.
- c. Avaliar o efeito do silenciamento gênico no acúmulo do CPMMV em plantas de soja.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal

Plantas de soja cv. CD206 foram germinadas e, após aproximadamente 10 dias, foram transferidas para câmara-de-crescimento com temperatura (22°C) e fotoperíodo (14 h) controlados. As plantas foram mantidas nestas condições por pelo menos quatro dias antes da inoculação mecânica.

### 4.2. Silenciamento dos genes *GmERD4* e *GmIMT*

Para a indução de silenciamento, um fragmento de aproximadamente 400 nt de cada gene foi amplificado por PCR a partir de cDNA de soja e clonado no RNA2 do vetor VIGS BPMV (pGG7R2-V), conforme descrito por Zhang e Ghabrial (2006), gerando as construções BPMV-GmERD4 e BPMV-GmIMT. Como controle fenotípico foi utilizada a construção BPMV-PDS, a qual consiste em um fragmento de 250 nt do gene *PDS* clonado no vetor pGG7R2-V.

Os plasmídeos recombinantes foram transformados em *E. coli* DH5 $\alpha$  por eletroporação (Sambrook e Russel, 2001). O DNA plasmidial de clones recombinantes foi purificado utilizando-se o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante, e sequenciado comercialmente (Macrogen).

Colônias de transformantes foram crescidas durante a noite (37°C, 250 rpm) em meio LB contendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. O DNA plasmidial foi extraído com o kit de mini-preparação citado acima e em seguida quantificado. Cerca de 5-10  $\mu$ g do produto obtido foram digeridas com enzimas de restrição (apenas *SalI* ou *SalI* e *NotI* em conjunto para o RNA1, apenas a *SalI* para o RNA2) a 37°C por 2 horas e purificado com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante. Por fim, o

DNA foi concentrado em centrífuga a vácuo e purificado para o uso na reação de transcrição *in vitro* utilizando-se o kit HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis (Ambion), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os vetores linearizados foram utilizados nas reações de transcrição, utilizando-se 100 mM de tampão 10x, 100 mM de ATP, 100 mM de CTP, 100 mM de UTP e 200 mM de GTP, 40 mM de "cap analog" e 2 mM de T7 RNA polimerase mix. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas. A integridade e o rendimento da transcrição *in vitro* foram avaliados em gel de agarose 1%.

Os transcritos do RNA1 e do RNA2 recombinante foram utilizados para a inoculação de folhas unifoliadas totalmente expandidas de soja CD206. As inoculações foram realizadas via extrato vegetal tamponado em fosfato de potássio 0,2 M pH 7,2 com 1% de bissulfito de sódio. As plantas foram mantidas em câmara-de-crescimento a 22°C e fotoperíodo de 14 h. O transcrito da construção BPMV-PDS foi inoculado da mesma forma em plantas de soja das cultivares BRSMT Pintado e CD206. As plantas sadias utilizadas como controle foram inoculadas apenas com tampão fosfato 0,2 M pH 7,2 com 1% de bissulfito de sódio. Aos 14 dias após a inoculação (dai) um trifólio de cada planta foi coletado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Em seguida foi realizada a extração de RNA total a partir de 100 mg de folhas, utilizando-se o RNAeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente foi realizada a verificação da quantidade e qualidade do RNA total extraído por meio de quantificação em Nanodrop 2000 (ThermoScientific) e eletroforese em gel de agarose. Um micrograma de RNA total foi tratado com duas unidades da enzima DNase I (Promega). O RNA tratado foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando-se oligo(dT) e a transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi analisados por RT-qPCR, utilizando

oligonucleotídeos específicos desenhados com o programa Primer Express (Applied Biosystems) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados na análise da expressão de genes por RT-qPCR.

<b>Oligonucleotídeo</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
GmIMTF	ATC TTC AGT GCA CAA GAA TCA GAG
GmIMTR	GTG TCG CGA AGG ATC CAC TT
GmERD4F	TCC CTC AAC TCG CAC TGA TTA TT
GmERD4R	GAC TTT CAG TTG GAA TGC CTT CA
GmHelicaseF	TAA CCC TAG CCC CTT CGC CT
GmHelicaseR	GCC TTG TCG TCT TCC TCC TCG

Após a confirmação do silenciamento, procedeu-se à inoculação de cinco plantas de soja cv. CD206 com cada uma das construções (BPMV-GmERD4 e BPMV-GmIMT). Um trifólio de cada planta foi coletado aos 14, 28 e 35 dai para avaliação do período em que as proteínas se mantiveram silenciadas. A extração e tratamento do RNA, síntese de cDNA e análise por RT-qPCR com oligonucleotídeos específicos foram realizados conforme descrito anteriormente por Zanardo *et al.* (2014b).

Uma vez observada a faixa temporal de silenciamento das proteínas-alvo, realizaram-se cinco repetições biológicas e duas réplicas técnicas do experimento para averiguar a associação dos dois genes com a carga viral do CPMMV. As construções BPMV-GmERD4 e BPMV-GmIMT foram inoculadas em plantas de soja CD206, e o silenciamento foi confirmado aos 14 dai (estágio V2). Ao emergir o próximo trifólio, ainda no estágio V2, essas plantas foram inoculadas com extrato vegetal contendo o isolado CPMMV:BR:MG:09:02 descrito por

Zanardo *et al.* (2014b). Trifólios dessas plantas foram coletados aos 5 e 14 dai. A extração e tratamento do RNA foram realizados conforme descrito acima, e a síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o oligonucleotídeo ORF6-CPMMV (5'-TAA AAC CAG GAA AAT AAC-3'). Os cDNAs gerados foram utilizados para quantificação absoluta da carga viral.

### 4.3. RT-PCR quantitativo (RT-qPCR)

A fim de verificar a expressão gênica e confirmação do silenciamento de BPMV-GmERD4 e BPMV-GmIMT, realizou-se a quantificação relativa utilizando-se oligonucleotídeos específicos (Tabela 1). Os oligonucleotídeos foram submetidos a um teste de concentração e eficiência. A eficiência de reação de cada par de oligonucleotídeos foi determinada conforme descrito por Pfaffl (2001) e Vandesompele *et al.* (2002), sendo de aproximadamente 100% (variando de 96-100%) para todos pares utilizados. Os oligonucleotídeos foram específicos e todas as reações foram realizadas em triplicata técnica para cada repetição biológica, em um termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) utilizando-se o reagente SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Em cada reação foram utilizados 100 ng de cDNA. Como controle endógeno foi utilizado o gene *GmHelicase*.

A carga viral do CPMMV foi determinada por quantificação absoluta, utilizando-se oligonucleotídeos específicos descritos por Zanardo (2017) (Tabela 2). Uma curva padrão foi obtida por regressão dos valores de Ct, utilizando-se  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^6$  cópias de um plasmídeo contendo a sequência codificadora da CP do CPMMV. A carga viral foi determinada por interpolação, na curva padrão, dos valores de Ct de cada amostra analisada (Rutledge e Cote, 2003).

Todas as reações foram realizadas em triplicata em um termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) utilizando-se o reagente SYBR Green PCR Master Mix (Applied

Biosystems) em um volume final de 10 µL por reação. Em cada reação foram utilizados 100 ng de cDNA.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados para análise da carga viral do CPMMV.

<b>Oligonucleotídeo</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
CPMMV CPF	ATA GTG AGA TGG CTG ATA AAC AAA AAC
CPMMV CPR	TTC AGC ATC AAT GTC TGG AAG

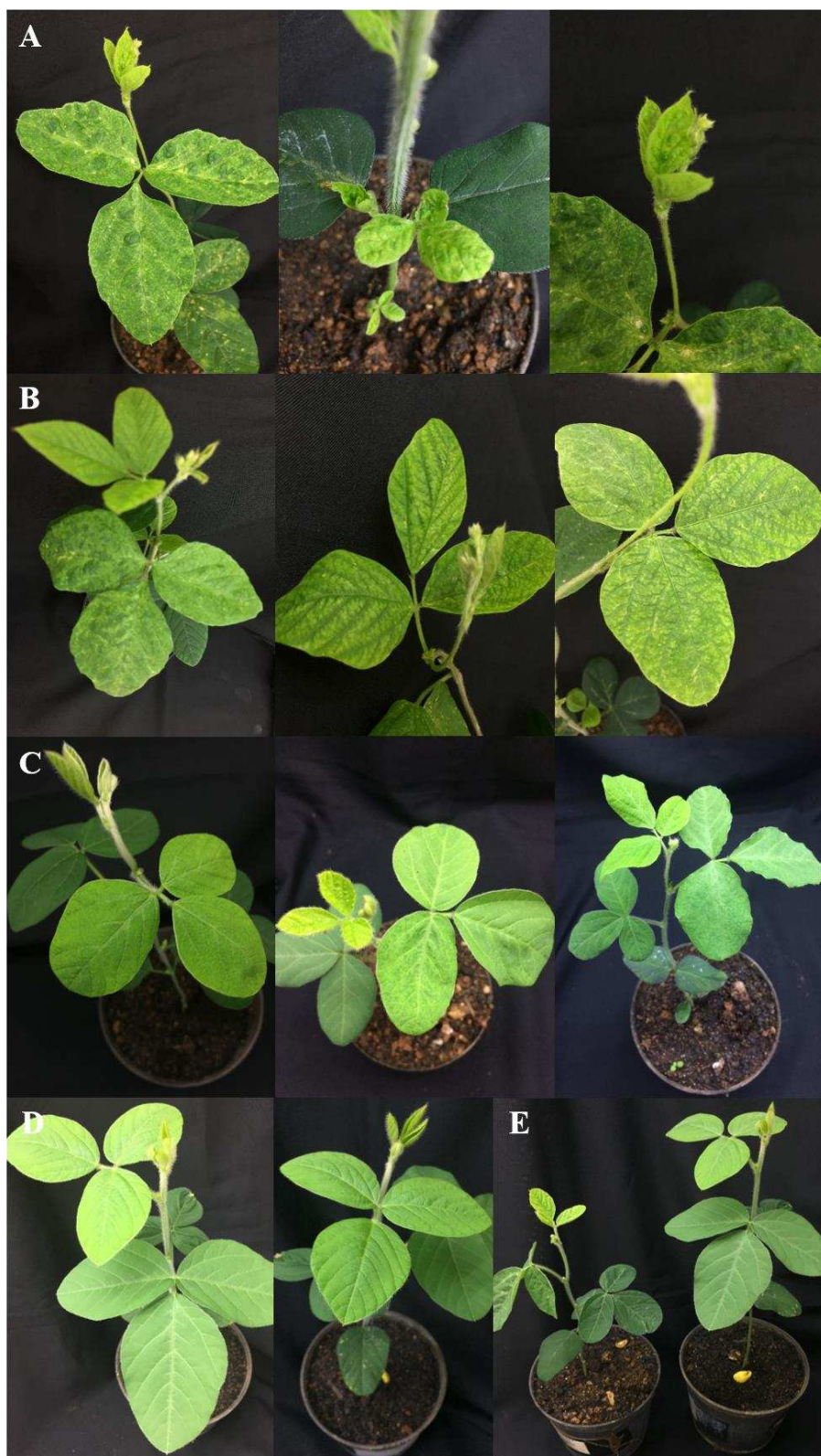
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Eficiência do VIGS utilizando o vetor BPMV em diferentes cultivares de soja

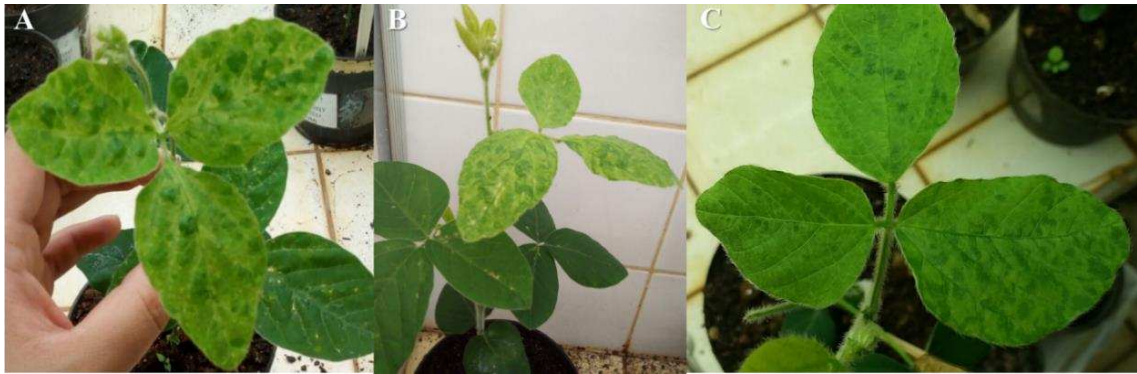
Para avaliar a melhor cultivar a ser utilizada no ensaio de VIGS foram selecionadas as cultivares BRSMT Pintado e CD206, ambas suscetíveis ao CPMMV, e verificada a eficiência do silenciamento. Ambas as cultivares foram inoculadas mecanicamente com a construção BPMV-GmPDS (Figura 6A, B). Como controle foi inoculado o vetor vazio (Figura 6C, D).

As plantas inoculadas com BPMV-GmPDS foram utilizadas como marcador fenotípico do silenciamento por meio da observação do fenótipo de foto-oxidação decorrente do silenciamento do gene *GmPDS*. O silenciamento iniciou-se aos 14 dai (Figura 6), e foi observado em todas as plantas inoculadas. Aos 21 dai, o silenciamento encontrava-se estabelecido em todas as plantas das duas cultivares e os sintomas permaneceram até os 35 dai (Figura 7). O fenótipo observado nestas plantas foi semelhante a um branqueamento tipo mosaico resultado do silenciamento (Figura 7A, B). Todas as plantas inoculadas apresentaram redução de crescimento em relação às plantas sadias (Figura 6E).

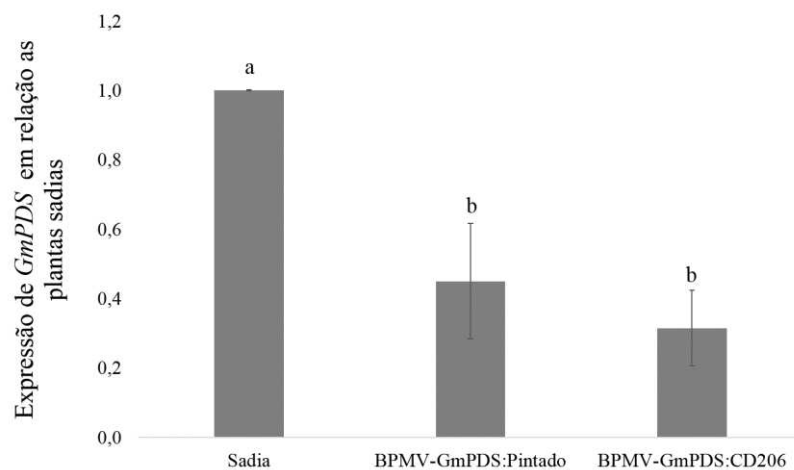
O trifólio mais jovem observado nas plantas aos 14 dai foi coletado para quantificação relativa do mRNA do gene *GmPDS*. Foi observada redução de cerca de 50% do acúmulo do mRNA na cultivar BRSMT Pintado e de 70% na cultivar CD206 em relação às plantas sadias (Figura 8). Ambas as cultivares foram infectadas pelo BPMV e em ambas ocorreu o silenciamento, não havendo diferença estatisticamente significativa quando comparadas. Dessa forma, ambas poderiam ser utilizadas para os ensaios posteriores. Selecionamos a cv. CD206 por se tratar da cultivar utilizada em todos os ensaios previamente realizados com o CPMMV e também por apresentar sintomas evidentes de infecção pelo CPMMV, enquanto a cultivar BRSMT Pintado é assintomática.



**Figura 6.** Fenótipo de plantas de soja inoculadas com o vetor VIGS BPMV-GmPDS aos 14 dias após a inoculação (daí). **A.** Plantas da cv. BRSMT Pintado; **B.** Plantas da cv. CD206; **C.** Plantas inoculadas com o vetor vazio; **D.** Plantas saudas (não-inoculadas); **E.** Redução do porte de plantas inoculadas com o vetor BPMV-GmPDS em relação às plantas saudas.



**Figura 7.** Fenótipo de plantas de soja inoculadas com o vetor VIGS BPMV-GmPDS aos 35 dias após a inoculação (dai). **A.** Planta da cultivar BRSMT Pintado; **B.** Planta da cultivar CD206; **C.** Planta inoculada com o vetor vazio.

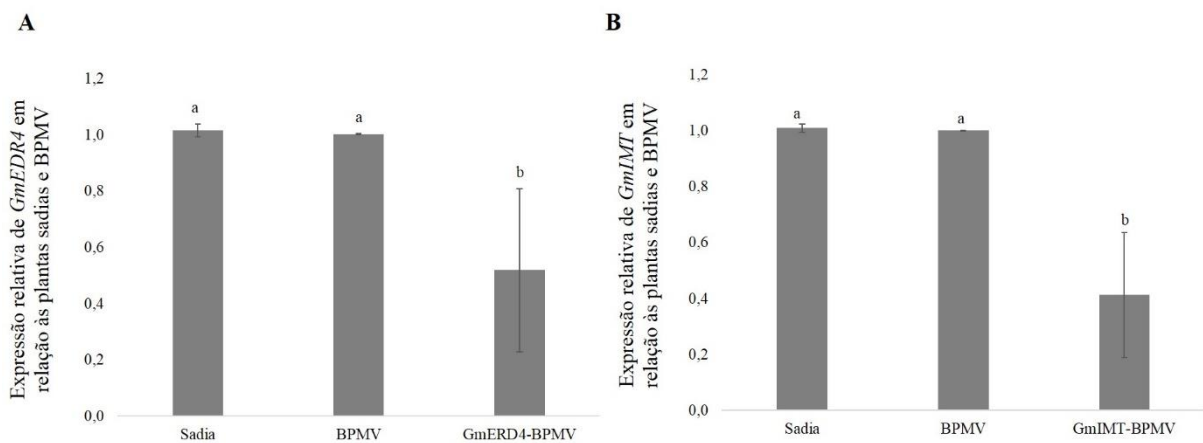


**Figura 8.** Expressão relativa do gene *GmPDS* em plantas de soja saudáveis e inoculadas com o vetor VIGS BPMV-GmPDS aos 14 dai. O experimento foi realizado com cinco réplicas biológicas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. As letras indicam diferenças significativas segundo o teste *t* de Student,  $p \leq 0,05$ .

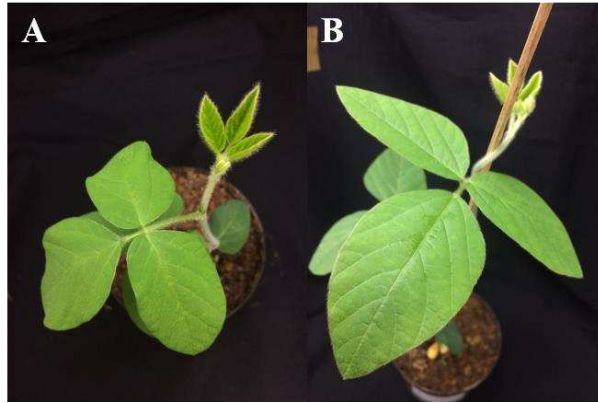
## 5.2. Silenciamento dos genes *GmERD4* e *GmIMT*

Após confirmar a eficiência do vetor VIGS utilizando a construção BPMV-GmPDS, foi realizada a inoculação mecânica das construções BPMV-GmERD4 e BPMV-GmIMT. Para avaliar o efeito do silenciamento, o trifólio mais jovem observado nas plantas aos 14 dai foi coletado para quantificação relativa dos níveis de expressão de *GmERD4* e *GmIMT* (Figura 9). A expressão de *GmERD4* e *GmIMT* foi comparada com plantas saudias e com plantas inoculadas com o vetor vazio, observando-se uma redução de 50% na expressão de *GmERD4* e de 60% na expressão de *GmIMT* em plantas inoculadas com as construções BPMV-GmERD4 e BPMV-GmIMT, respectivamente (Figura 9).

As plantas inoculadas apresentaram redução de crescimento em relação às plantas saudias, não sendo observada nenhuma outra variação fenotípica (Figura 10).

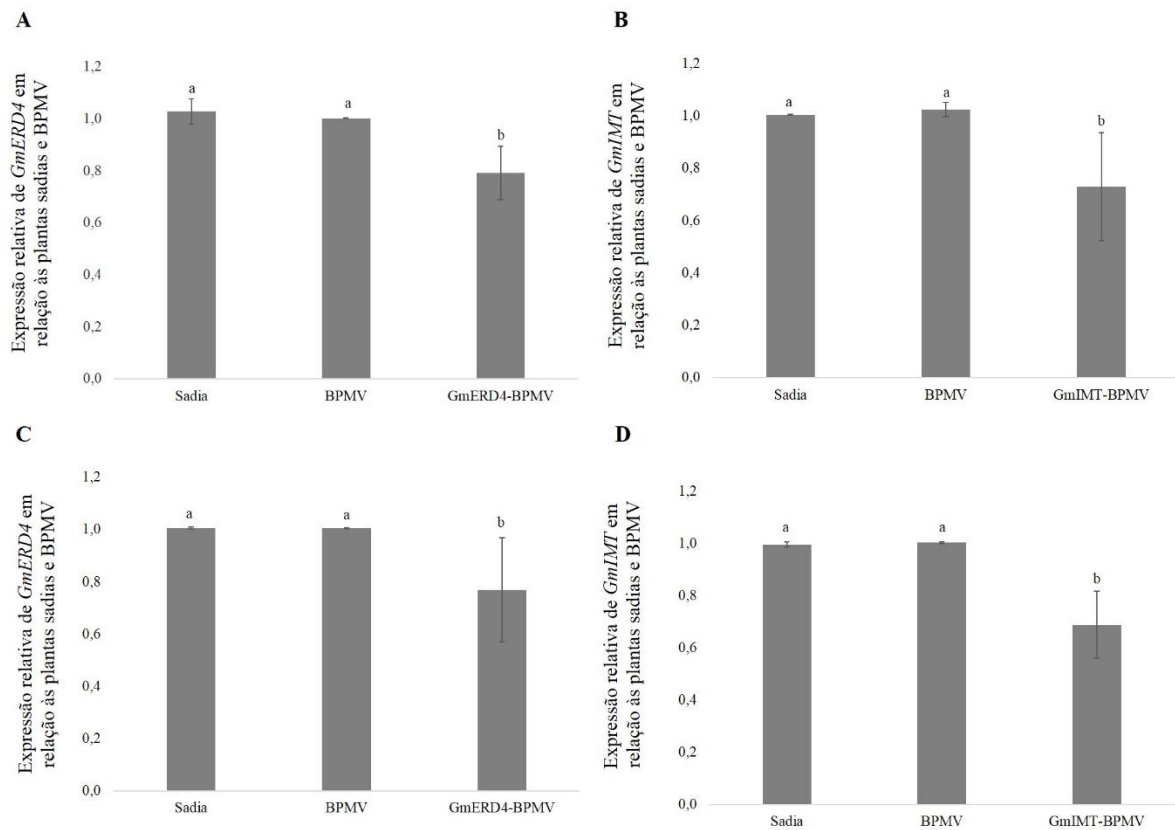


**Figura 9.** Silenciamento dos genes *GmERD4* (A) e *GmIMT* (B) em plantas de soja inoculadas com os vetores VIGS BPMV-GmERD4 e BPMV-GmIMT aos 14 dai. O experimento foi realizado com cinco réplicas biológicas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. As letras indicam diferenças significativas segundo o teste *t* de Student,  $p \leq 0,05$ .



**Figura 10.** Fenótipo de plantas de soja inoculadas com os vetores VIGS BPMV-GmERD4 (A) e BPMV-GmIMT (B) aos 14 dai.

Uma vez observada a redução da expressão dos mRNAs de interesse, foi avaliado o período de manutenção do silenciamento nestas plantas. Procedeu-se com a coleta dos trifólios mais jovens de todas as plantas aos 28 e 35 dai para avaliação da quantificação relativa dos níveis de expressão de *GmERD4* e *GmIMT* (Figura 11). A expressão nas plantas inoculadas com os vetores VIGS foi comparada com as das plantas saudias e inoculadas com o vetor vazio. Foi observada uma redução de cerca de 20% na expressão de *GmERD4* e de 25% na expressão de *GmIMT* aos 28 e 35 dai respectivamente (Figura 11). Portanto, mesmo após 35 dai foi possível detectar o silenciamento em plantas de soja da cv. CD206.



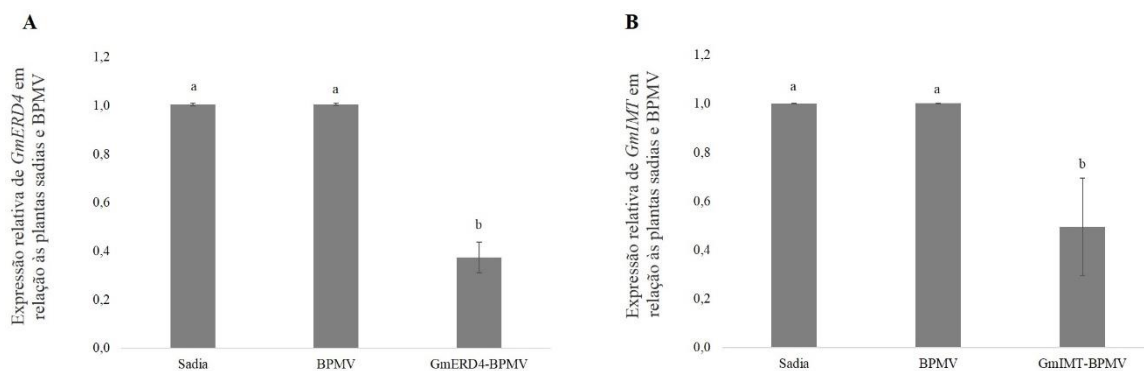
**Figura 11.** Expressão dos genes *GmERD4* e *GmIMT* em planta de soja inoculadas com os vetores VIGS BPMV-*GmERD4* e BPMV-*GmIMT*. **A, C.** Expressão do gene *GmERD4* aos 28 e 35 dai; **B, D.** Expressão do gene *GmIMT* aos 35 dai. O experimento foi realizado com cinco réplicas biológicas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. As letras indicam diferenças significativas segundo o teste de *t* de Student,  $p \leq 0,05$ .

### 5.3. A redução na expressão de *GmERD4* e *GmIMT* está relacionado a menor acúmulo do CPMMV nos estágios iniciais da infecção

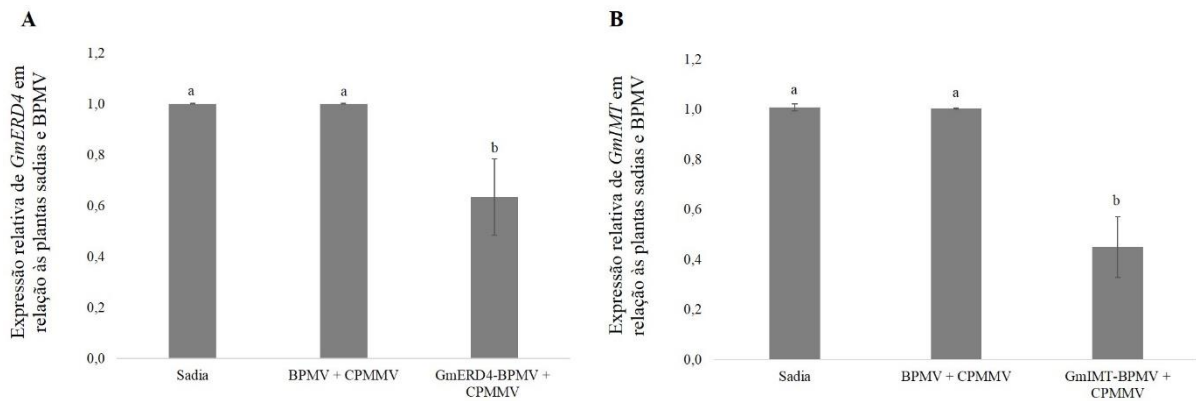
Para avaliar se as proteínas *GmERD4* e *GmIMT* são requeridas para o processo de infecção viral do CPMMV, plantas de soja foram inoculadas com as construções citadas anteriormente e aos 14 dai verificada a expressão relativa de ambos os genes (Figura 12). Foi observada uma redução de 80% na expressão de *GmERD4* e de 50% na expressão de *GmIMT* nas plantas inoculadas com os vetores BPMV-*GmERD4* e BPMV-*GmIMT*, respectivamente, em comparação com a expressão dos genes nas plantas saudias e nas plantas inoculadas com o

vetor vazio. Como no resultado anterior, as plantas inoculadas apresentaram redução de crescimento em relação às plantas saudias, não sendo observada nenhuma outra variação fenotípica.

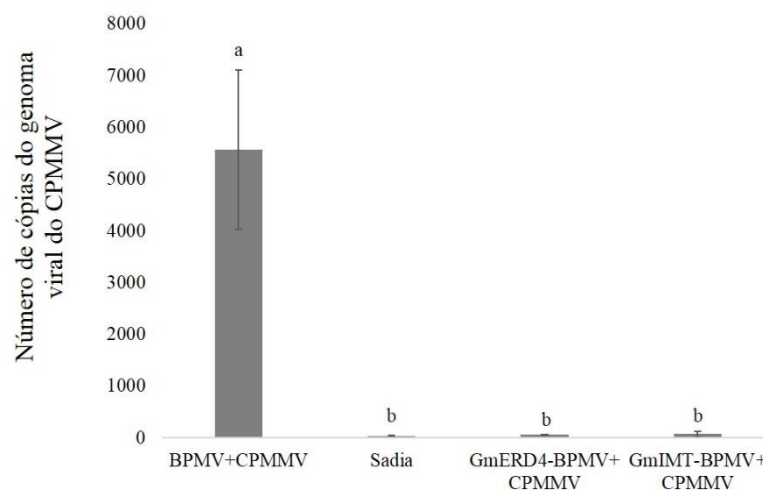
Uma vez confirmado o silenciamento procedeu-se com a inoculação do CPMMV no trifólio mais jovem e desenvolvido aos 21 dai das construções para o VIGS. No quinto dia após a inoculação viral (26 dai dos vetores VIGS) foi coletado um trifólio de cada tratamento e avaliada a expressão relativa dos genes *GmERD4* e *GmIMT* e o acúmulo do CPMMV (quantificação absoluta) (Figuras 13 e 14). O trifólio coletado é o mesmo no qual foi realizada a inoculação do CPMMV, desta forma os resultados obtidos são referente à infecção viral local. As expressões de *GmERD4* e *GmIMT* encontravam-se reduzidas em torno de 30% e 50% nas plantas inoculadas com os vetores BPMV-*GmERD4* e BPMV-*GmIMT*, respectivamente (Figura 13).



**Figura 12.** Expressão dos genes *GmERD4* e *GmIMT* em plantas de soja inoculadas com os vetores VIGS BPMV-*GmERD4* e BPMV-*GmIMT*. **A.** Expressão do gene *GmERD4* aos 14 dai; **B.** Expressão do gene *GmIMT* aos 14 dai. O experimento foi realizado com cinco réplicas biológicas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. As letras indicam diferenças significativas segundo o teste *t* de Student,  $p \leq 0,05$ .



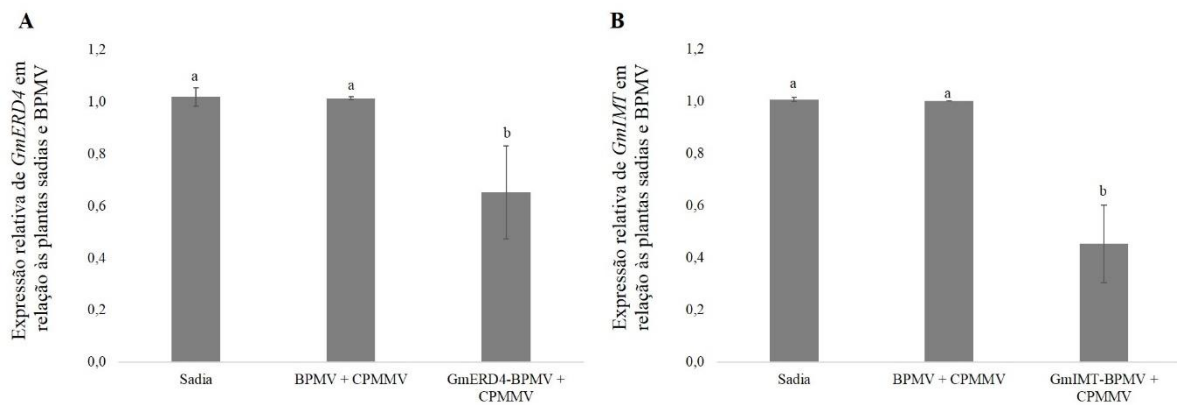
**Figura 13.** Expressão dos genes *GmERD4* (A) e *GmIMT* (B) em planta de soja cinco dias com o CPMMV (26 dai com as construções VIGS BPMV-*GmERD4* e BPMV-*GmIMT*). O experimento foi realizado com cinco réplicas biológicas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. As letras indicam diferenças significativas segundo o teste *t* de Student,  $p \leq 0,05$ .



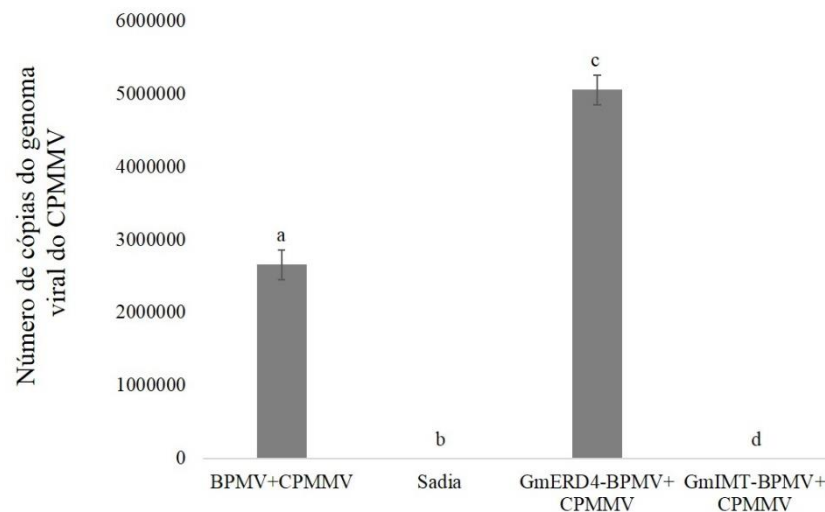
**Figura 24.** Acúmulo do CPMMV cinco dias após a inoculação do vírus em plantas previamente inoculadas para o VIGS (26 dai com os vetores VIGS BPMV-*GmERD4* e BPMV-*GmIMT*). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. As letras indicam diferenças significativas segundo o teste *t* de Student,  $p \leq 0,05$ .

O acúmulo do CPMMV foi avaliado aos 5 dai do vírus, e foi elevado nas plantas previamente inoculadas com o vetor BPMV vazio. Nas plantas previamente inoculadas com os vetores VIGS BPMV-GmERD4 e BPMV-GmIMT praticamente não houve acúmulo viral (Figura 14). Foram detectadas em média 5572 cópias do genoma viral em plantas inoculadas com o vetor vazio (não-silenciadas), 57 cópias em plantas com o gene *GmERD4* silenciado, e 72 cópias em plantas com o gene *GmIMT* silenciado. Isso correspondendo a uma redução de mais de 99% no acúmulo viral, demonstrando claramente que ambas as proteínas são essenciais para o acúmulo do CPMMV em plantas de soja.

O acúmulo do CPMMV e a expressão relativa dos genes *GmERD4* e *GmIMT* foram também avaliados aos 14 dai do vírus (Figuras 15 e 16). Diferente da análise anterior, nesta etapa foi avaliada a influência das proteínas na infecção sistêmica do CPMMV. Nesse ponto a expressão de *GmERD4* encontrava-se reduzida em torno de 30%, e a de *GmIMT* manteve a redução de 50% (Figura 15). O acúmulo do CPMMV aos 14 dai do vírus (35 dai dos vetores VIGS) foi elevado nas plantas previamente inoculadas com o vetor BPMV vazio e aumentou consideravelmente nas plantas silenciadas para *GmERD4* (Figura 16), o que não foi observado para as plantas silenciadas para *GmIMT*. A carga viral foi superior a 2.000.000 de cópias do genoma viral em plantas não silenciadas, e de cerca de 5.000.000 cópias nas plantas silenciadas para *GmERD4*. Não foi observado aumento no acúmulo viral em plantas silenciadas para *GmIMT* (Figura 16). Em conjunto, os resultados indicam que os genes *GmERD4* e *GmIMT* estão envolvidas no processo de infecção pelo CPMMV, corroborando os resultados observados por Zanardo (2017). Aparentemente *GmERD4* é essencial para os processos iniciais de infecção pelo CPMMV. Já *GmIMT* parece ser essencial ao longo de todo o processo infeccioso, uma vez que a redução de apenas 50% em sua expressão levou a uma redução de 99% no acúmulo do CPMMV.



**Figura 15.** Expressão dos genes *GmERD4* (A) e *GmIMT* (B) em planta de soja 14 dias após a inoculação (dai) com o CPMMV (35 dai com os vetores VIGS BPMV-*GmERD4* e BPMV-*GmIMT*). O experimento foi realizado com cinco réplicas biológicas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. As letras indicam diferenças significativas segundo o teste *t* de Student,  $p \leq 0,05$ .



**Figura 16.** Acúmulo do CPMMV 14 dias após inoculação do vírus em plantas previamente inoculadas para o VIGS (35 dai com os vetores VIGS BPMV-*GmERD4* e BPMV-*GmIMT*). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. As letras indicam diferenças significativas segundo o teste *t* de Student,  $p \leq 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

Para avaliação da funcionalidade do vetor de silenciamento em cultivares suscetíveis ao CPMMV, foi utilizada a construção BPMV-GmPDS, contendo um fragmento do gene que codifica a enzima fitoeno dessaturase (PDS), que gera um fenótipo de foto-oxidação quando silenciado. O fenótipo de silenciamento de plantas de soja inoculadas com o vetor BPMV-GmPDS foi estável ao longo da duração do experimento (35 dai). Foi também realizada a avaliação da expressão gênica por RT-qPCR e observado a nível molecular a redução da expressão do gene. O VIGS utilizando o vetor baseado no BPMV mostrou-se uma ferramenta eficiente para o estudo de funções gênicas na sojas cv. CD206 e BRSMT Pintado, corroborando resultados anteriores obtidos para outras cultivares (Lawrence e Pikaard, 2003; Zhang e Ghabrial, 2006).

Foram utilizadas duas cultivares, BRSMT Pintado e CD206 para avaliação do silenciamento de *GmPDS*. Já foi relatado que a cultivar de soja BRSMT Pintado, que é mais tolerante ao CPMMV, acumula mais vírus no estágio inicial da infecção do que a cultivar suscetível CD206, especialmente a baixas temperaturas, e que a cultivar suscetível apresenta sintomas mais evidentes da infecção viral (Mituti e Almeida, 2006). Esta característica da cultivar BRSMT Pintado torna-a interessante para avaliação futura da interação entre as proteínas GmERD4 e GmIMT com o CPMMV, uma vez que esta cultivar é tolerante ao vírus, o que poderia gerar resultados distintos aos observado em uma cultivar suscetível.

Como relatado, as plantas silenciadas para o gene *PDS* apresentaram fenótipo semelhante a um branqueamento tipo mosaico, conforme relatado anteriormente (Zhang e Ghabrial, 2006). Este sintoma poderia ser confundido com sintomas de infecção viral, mas os resultados aqui relatados demonstram que os sintomas da infecção apenas pelo vetor de silenciamento são mais brandos. Inúmeros autores citam a grande diversidade de fenótipos com o uso de VIGS em soja, incluindo os sintomas apresentados neste trabalho. Contudo, foi

verificada a redução do mRNA do gene *PDS* por RT-qPCR, observada também para os demais genes. Desta forma a redução na expressão gênica foi independente dos fenótipos.

Além disso, Zhang *et al.* (2010) mostraram haver variação fenotípica em função da região do gene *GmPDS* clonada no vetor BPMV. Os oligonucleotídeos utilizados para a clonagem neste trabalho foram desenhados a partir dos utilizados por Zhang e Ghabrial (2006), sendo referentes à região dos 300 primeiros nucleotídeos da ORF *GmPDS*, na porção inicial de tradução da proteína, o que deveria gerar sintomas mais brandos. Entretanto, o efeito do silenciamento do gene *GmPDS* em soja é dependente da cultivar.

Após a confirmação da eficiência do vetor BPMV para o silenciamento em soja, foi feita a avaliação da faixa temporal do VIGS para os genes alvos. Isso foi feito para que verificar se o silenciamento dos genes alvos se manteria estável por um período de tempo correspondente aos ensaios após a inoculação do CPMMV. Zhang e Ghabrial (2006) observaram que o fenótipo de silenciamento para o gene *PDS* em soja utilizando o vetor BPMV se manteve estável até 35 dai. Aqui, não foi avaliada a estabilidade do gene *PDS* por longos períodos por RT-qPCR, porém verificou-se que para *GmERD4* e *GmIMT*, mesmo na ausência de sintomas, a expressão do mRNA foi reduzida até 35 dai.

O gene *GmERD4* é induzido aos 3 e 7 dai em plantas de soja após a inoculação do CPMMV, e aos 14 dai observou-se uma redução na sua expressão (Zanardo, 2017). Portanto, para verificar a influência da redução da expressão de *GmERD4* no acúmulo do CPMMV, foi escolhido o tempo de 5 dai para a coleta da folha inoculada e de 14 dai para a coleta de folhas desenvolvidas posteriormente (o trifólio mais jovem). Desta forma, a condução do experimento avaliou o efeito na infecção local e na infecção sistêmica, demonstrando a importância de cada uma das proteínas nas diferentes etapas da infecção viral. De fato, ao avaliar-se a expressão de *GmERD4*, foi observada a redução do acúmulo viral aos 5 dai, o que não foi observado aos 14 dai.

Predições por bioinformática demonstraram que a proteína GmERD4 possui um domínio RSN1\_TM associado ao transporte de vesículas. Além disso, foi identificado um domínio citosólico PHM7\_cit, que contém um motivo de reconhecimento de RNA (RRM) comumente presente em proteínas de ligação a RNA (RBP's) (Zanardo, 2017). As proteínas RBP influenciam a estrutura e as interações dos RNAs e desempenham papéis críticos em sua biogênese, estabilidade, função, transporte e localização celular (Glisovic *et al.*, 2008). Assim, GmERD4 poderia associar-se ao domínio RdRp para conferir estabilidade ao RNA viral nascente, garantindo sua proteção e direcionamento correto durante o transporte vesicular celular, favorecendo assim a replicação do CPMMV em vesículas de replicação virais. Essa possibilidade é reforçada quando se associa aos resultados obtidos anteriormente por Zanardo (2017) com a redução do acúmulo viral em plantas silenciadas para o gene *GmERD4* observada neste trabalho. Assim, a superexpressão e o silenciamento em soja de *GmERD4* está diretamente relacionados ao aumento e redução do acúmulo viral do CPMMV, respectivamente, demonstrando que esta proteína é essencial para replicação, por se associar a RdRp e possivelmente conferir estabilidade ao RNA viral nascente.

Os resultados deste trabalho demonstraram que a redução da expressão de *GmIMT* afetou a replicação do CPMMV em todo o contexto da infecção viral. Uma vez que a proteína GmIMT possui domínio hélice-volta-hélice de ligação a DNA e que interage com a RdRp do CPMMV, a redução de sua expressão pode estar afetando a interação entre estas e portanto a regulação da transcrição do RNA viral, o que justifica o fato de que ao silenciá-la não tenha sido detectado o acúmulo viral tanto aos 5 dai como aos 14 dai do CPMMV. A existência de um domínio funcional de metilase também poderia explicar os resultados observados, pois pode-se sugerir que o silenciamento de *GmIMT* encaminhe o RNA viral para a degradação devido à ausência de metilação, justificando assim o baixo acúmulo viral em ambos os tempos avaliados.

Os processos de metilação nas células estão envolvidos em mecanismos fisiológicos. Os efeitos da metilação do "cap" viral foram estudados para vírus de diferentes famílias, concluindo-se que a metilação do "cap" é essencial para a estabilidade, tradução e evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Hamey e Wilkins, 2018). Uma vez que o CPMMV é um vírus de RNA e que todos os RNAs virais (genômico e subgenômicos) supostamente possuem um "cap" em suas extremidades 5', GmIMT poderia atuar na metilação do "cap" promovendo a estabilidade do RNA viral, e ao ser silenciada induziria o RNA para a degradação e redução do acúmulo viral em todo processo infeccioso.

A redução da expressão gênica de ambos os genes foi determinante no acúmulo do CPMMV nos estágios iniciais da infecção, confirmando o envolvimento de *GmERD4* e *GmIMT* no processo infeccioso, em especial na replicação viral. A relação entre o CPMMV e a proteína GmIMT é crucial nos estágios mais avançados da infecção viral (14 dai). Foi demonstrado também que a infecção viral induziu expressão de ambos os genes nos estágios iniciais da infecção (3 e 7 dai), e que *GmERD4* quando superexpressa favoreceu o acúmulo viral. Este trabalho é pioneiro ao demonstrar a interação de componentes do hospedeiro com o domínio RdRp de um betaflexivírus.

## 7. CONCLUSÕES

A utilização do vetor viral BPMV foi eficiente para induzir o silenciamento gênico dos genes *GmERD4* e *GmIMT*, o qual se manteve estável por até 35 dai. Plantas de soja cv. CD206 silenciadas para os genes causaram a redução do acúmulo viral do CPMMV aos 5 dai para *GmERD4* e 5 e 14 dai para *GmIMT*. Assim, conclui-se que as proteínas GmERD4 e GmIMT são essenciais para a replicação e consequente acúmulo do CPMMV em soja.

## 8. LITERATURA CITADA

- Adams, M.; Kreuze, J. Revision of family *Betaflexiviridae*, order *Tymovirales*. 2015. Disponível em: [https://talk.ictvonline.org/ICTV/proposals/2015.011a-adP.A.v2.Betaflexiviridae\\_rev.pdf](https://talk.ictvonline.org/ICTV/proposals/2015.011a-adP.A.v2.Betaflexiviridae_rev.pdf). Acesso em: 21/07/2018.
- Ahlquist, P.; Noueiry, A.O.; Lee, W.-M.; Kushner, D.B.; Dye, B.T. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. **Journal of Virology**, v. 77, p. 8181-8186, 2003.
- Ahn, C.; Park, U.; Park, P.B. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, p. 669-674, 2011.
- Almeida, Á.M.; Piuga, F.F.; Marin, S.R.; Kitajima, E.W.; Gaspar, J.O.; Oliveira, T.G.D.; Moraes, T.G.D. Detection and partial characterization of a carlavirus causing stem necrosis of soybean in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 191-194, 2005.
- Almeida, A.M.R. Viroses da soja no Brasil: sintomas, etiologia e controle. **Embrapa Soja, Série Documentos**, 2008.
- Almeida, A.M.R.; Piuga, F.F.; Kitajima, E.W.; Gaspar, J.O.; Valentin, N.; Benato, L.C.; Marin, S.R.; Binneck, E.; De Oliveira, T.; Belintani, P. Necrose da haste da soja. **Embrapa Soja. Documentos**, 2003.
- Alves, M.S.; Fontes, E.P.; Fietto, L.G. Early responsive to dehydration 15, a new transcription factor that integrates stress signaling pathways. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, p. 1993-1996, 2011a.
- Alves, M.S.; Reis, P.A.; Dadalto, S.P.; Faria, J.A.; Fontes, E.P.; Fietto, L.G. A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 20020-20030, 2011b.
- Angell, S.M.; Baulcombe, D. *Potato virus X* amplicon mediated silencing of nuclear genes. **Plant Journal**, v. 20, p. 357-362, 1999.
- Bamunusinghe, D.; Hemenway, C.L.; Nelson, R.S.; Sanderfoot, A.A.; Chang, M.Y.; Silva, M.A.; Payton, M.; Verchot-Lubicz, J. Analysis of potato virus X replicase and TGBp3 subcellular locations. **Virology**, v. 393, p. 272-285, 2009.
- Barajas, D.; Tenllado, F.; Diaz-Ruiz, J.R. Characterization of the recombinant forms arising from a *Potato virus X* chimeric virus infection under RNA silencing pressure. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 904-913, 2006.
- Baulcombe, D.C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 109-113, 1999.
- Chen, J.; Ahlquist, P. Brome mosaic virus polymerase-like protein 2a is directed to the endoplasmic reticulum by helicase-like viral protein 1a. **Journal of Virology**, v. 74, p. 4310-4318, 2000.
- Chen, S.; Li, F.; Liu, D.; Jiang, C.; Cui, L.; Shen, L.; Liu, G.; Yang, A. Dynamic expression analysis of early response genes induced by potato virus Y in PVY-resistant *Nicotiana tabacum*. **Plant Cell Reports**, v. 36, p. 297-311, 2017.
- Chiera, J.M.; Streeter, J.G.; Finer, J.J. Ononitol and pinitol production in transgenic soybean containing the inositol methyl transferase gene from *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Science**, v. 171, p. 647-654, 2006.
- Costa, A.; Gaspar, J.; Vega, J. Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um carlavirus transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 325-337, 1983.

- Díaz-Camino, C.; Annamalai, P.; Sanchez, F.; Kachroo, A.; Ghabrial, S.A. An effective virus-based gene silencing method for functional genomics studies in common bean. **Plant Methods**, v. 7, p. 16, 2011.
- Díaz-Pendon, J.A.; Ding, S.W. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 303-326, 2008.
- Ding, X.S.; Schneider, W.L.; Chaluvadi, S.R.; Mian, M.a.R.; Nelson, R.S. Characterization of a *Brome mosaic virus* strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 1229-1239, 2006.
- Dreher, T.W.; Miller, W.A. Translational control in positive strand RNA plant viruses. **Virology**, v. 344, p. 185-197, 2006.
- Embrapa, S. Soja em números (Safrá 2016/2017). 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 12/01/2018.
- Fajardo, T.V.M.; Nishijima, M.; Bisó, J.A.; Torres, A.C.; Ávila, A.C.; Resende, R.O. Garlic viral complex: identification of potyviruses and carlavirus in central Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 619-626, 2001.
- Faria, J.C.; Aragão, F.J.L.; Souza, T.L.P.O.; Quintela, E.D.; Kitajima, E.W.; Ribeiro, S.G. Golden mosaic of common beans in Brazil: management with a transgenic approach. **APS Features**, doi 10.1094/APSFeature-2016-10, 2016.
- Gaspar, J.; Belintani, P.; Almeida, A.; Kitajima, E. A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. **Journal of Virological Methods**, v. 148, p. 283-285, 2008.
- Gedling, C.; Ali, E.; Gunadi, A.; Finer, J.; Xie, K.; Liu, Y.; Yoshikawa, N.; Qu, F.; Dorrance, A. Improved apple latent spherical virus-induced gene silencing in multiple soybean genotypes through direct inoculation of agro-infiltrated *Nicotiana benthamiana* extract. **Plant Methods**, v. 14, p. 19, 2018.
- Glisovic, T.; Bachorik, J.L.; Yong, J.; Dreyfuss, G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. **FEBS Letters**, v. 582, p. 1977-1986, 2008.
- Hamey, J.J.; Wilkins, M.R. Methylation of Elongation Factor 1A: Where, who, and why? **Trends in Biochemical Sciences**, 2018.
- Harrison, B.D.; Finch, J.T.; Gibbs, A.J.; Hollings, M.; Shepherd, R.J.; Valenta, V.; Wetter, C. Sixteen groups of plant viruses. **Virology**, v. 45, p. 356-363, 1971.
- Henning, A.A.; Almeida, Á.M.R.; Godoy, C.V.; Seixas, C.D.S.; Yorinori, J.T.; Costamilan, L.M.; Ferreira, L.P.; Meyer, M.C.; Soares, R.M.; Dias, W.P. Manual de identificação de doenças de soja. **Embrapa Soja, Série Documentos**, 2014.
- Hutvagner, G.; Mclachlan, J.; Pasquinelli, A.E.; Balint, E.; Tuschl, T.; Zamore, P.D. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. **Science**, v. 293, p. 837-838, 2001.
- Hyodo, K.; Okuno, T. Host factors used by positive-strand RNA plant viruses for genome replication. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, p. 123-135, 2014.
- Ictv. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2016. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: 16/02/2018.
- Igarashi, A.; Yamagata, K.; Sugai, T.; Takahashi, Y.; Sugawara, E.; Tamura, A.; Yaegashi, H.; Yamagishi, N.; Takahashi, T.; Isogai, M.; Takahashi, H.; Yoshikawa, N. Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. **Virology**, v. 386, p. 407-416, 2009.

- Iwaki, M.; Thongmeearkom, P.; Prommin, M.; Honda, Y.; Hibi, T. Whitefly transmission and some properties of cowpea mild mottle virus on soybean in Thailand. **Plant Disease**, v. 66, p. 365-368, 1982.
- Kachroo, A.; Ghabrial, S. Virus-induced gene silencing in soybean. pp. 287-297, *In: Watson, J.M. e Wang, M.-B. (Ed.). Antiviral Resistance in Plants. Methods in Molecular Biology*, v. 894. Totowa, NJ: Humana Press, 2012.
- Kariola, T.; Brader, G.; Helenius, E.; Li, J.; Heino, P.; Palva, E.T. EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15, a negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 142, p. 1559-1573, 2006.
- Kim, K.H.; Lim, S.; Kang, Y.J.; Yoon, M.Y.; Nam, M.; Jun, T.H.; Seo, M.-J.; Baek, S.-B.; Lee, J.-H.; Moon, J.-K. Optimization of a virus-induced gene silencing system with *Soybean yellow common mosaic virus* for gene function studies in soybeans. **Plant Pathology Journal**, v. 32, p. 112, 2016.
- King, A.M.; Lefkowitz, E.; Adams, M.J.; Carstens, E.B. **Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. New York: Elsevier Academic Press, 2011.
- Kiyosue, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana*: identification of three ERDs as HSP cognate genes. **Plant Molecular Biology**, v. 25, p. 791-798, 1994.
- Lange, M.; Yellina, A.L.; Orashakova, S.; Becker, A. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems. pp. 1-14, *In: Becker, A. (Ed.). Virus-Induced Gene Silencing. Methods in Molecular Biology*, v. 975. Totowa, NJ: Humana Press, 2013.
- Lawrence, R.J.; Pikaard, C.S. Transgene-induced RNA interference: a strategy for overcoming gene redundancy in polyploids to generate loss-of-function mutations. **Plant Journal**, v. 36, p. 114-121, 2003.
- Liu, Y.; Li, H.; Shi, Y.; Song, Y.; Wang, T.; Li, Y. A maize early responsive to dehydration gene, ZmERD4, provides enhanced drought and salt tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 27, p. 542, 2009.
- Martelli, G.P.; Adams, M.J.; Kreuze, J.F.; Dolja, V.V. Family *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 73-100, 2007.
- Meng, Y.; Moscou, M.J.; Wise, R.P. Blufensin1 negatively impacts basal defense in response to barley powdery mildew. **Plant Physiology**, v. 149, p. 271-285, 2009.
- Menzel, W.; Abang, M.M.; Winter, S. Characterization of cucumber vein-clearing virus, a whitefly (*Bemisia tabaci* G.)-transmitted carlavirus. **Archives of Virology**, v. 156, p. 2309-2311, 2011.
- Menzel, W.; Winter, S.; Vetten, H. Complete nucleotide sequence of the type isolate of *Cowpea mild mottle virus* from Ghana. **Archives of Virology**, v. 155, p. 2069-2073, 2010.
- Mituti, T.; Almeida, A. Tolerância ao *Cowpea mild mottle virus* e sua concentração relativa em soja. *In: Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, (Resumos)*. Londrina: Embrapa Soja, 2006.
- Nagata, T.; Alves, D.; Inoue-Nagata, A.; Tian, T.-Y.; Kitajima, E.; Cardoso, J.; Avila, A. A novel melon flexivirus transmitted by whitefly. **Archives of Virology**, v. 150, p. 379-387, 2005.
- Nagy, P.D.; Pogany, J. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 137, 2012.
- Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. e45, 2001.
- Prosser, S.W.; Xiao, H.; Li, C.; Nelson, R.S.; Meng, B. Subcellular localization and membrane association of the replicase protein of grapevine rupestris stem pitting-associated virus, family *Betaflexiviridae*. **Journal of General Virology**, v. 96, p. 921-932, 2015.

- Rivas, E.B. Lily symptomless virus no Brasil. **Documento Técnico**, v. 4, p. 1-5, 2010.
- Rutledge, R.G.; Cote, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. e93, 2003.
- Sambrook, J.; Russel, D. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3<sup>a</sup> ed.)**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344
- Senthil-Kumar, M.; Mysore, K.S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 656-665, 2011.
- Sheveleva, E.; Chmara, W.; Bohnert, H.J.; Jensen, R.G. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1211-1219, 1997.
- Simon, A.E.; Miller, W.A. 3' cap-independent translation enhancers of plant viruses. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 21-42, 2013.
- Suhy, D.A.; Giddings, T.H.; Kirkegaard, K. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. **Journal of Virology**, v. 74, p. 8953-8965, 2000.
- Tarquini, G.; Ermacora, P.; Bianchi, G.L.; De Amicis, F.; Pagliari, L.; Martini, M.; Loschi, A.; Saldarelli, P.; Loi, N.; Musetti, R. Localization and subcellular association of Grapevine Pinot Gris virus in grapevine leaf tissues. **Protoplasma**, v. 255, p. 923-935, 2018.
- Teichmann, M.; Dumay-Odelot, H.; Fribourg, S. Structural and functional aspects of winged-helix domains at the core of transcription initiation complexes. **Transcription**, v. 3, p. 2-7, 2012.
- Unver, T.; Budak, H. Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2009, 2009.
- Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, p. RESEARCH0034, 2002.
- Vidalain, P.-O.; Tangy, F. Virus-host protein interactions in RNA viruses. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 1134-1143, 2010.
- Whitham, S.A.; Lincoln, L.M.; Chowda-Reddy, R.; Dittman, J.D.; O'rourke, J.A.; Graham, M.A. Virus-induced gene silencing and transient gene expression in soybean (*Glycine max*) using *Bean pod mottle virus* infectious clones. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 1, p. 263-283, 2017.
- Xie, Z.; Johansen, L.K.; Gustafson, A.M.; Kasschau, K.D.; Lellis, A.D.; Zilberman, D.; Jacobsen, S.E.; Carrington, J.C. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. **PLoS Biology**, v. 2, p. E104, 2004.
- Younis, A.; Siddique, M.I.; Kim, C.-K.; Lim, K.-B. RNA interference (RNAi) induced gene silencing: a promising approach of hi-tech plant breeding. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 1150, 2014.
- Zanardo, L.G. **New insights of Cowpea mild mottle virus (CPMMV) infection in soybean: The involvement of viral replicase in symptom induction and its interaction with host factors**. Tese D.Sc. (Doutorado em Genética e Melhoramento). Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.
- Zanardo, L.G.; Carvalho, C.M. *Cowpea mild mottle virus (Carlavirus, Betaflexiviridae)*: a review. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 417-430, 2017.
- Zanardo, L.G.; Silva, F.N.; Bicalho, A.a.C.; Castillo-Urquiza, G.P.; Lima, A.T.M.; Almeida, A.M.R.; Zerbini, F.M.; Carvalho, C.M. Molecular and biological characterization of *Cowpea mild mottle virus* isolates infecting soybean in Brazil and evidence of recombination. **Plant Pathology**, v. 63, p. 456-465, 2014a.

- Zanardo, L.G.; Silva, F.N.; Lima, A.T.M.; Milanesi, D.F.; Castilho-Urquiza, G.P.; Almeida, A.M.R.; Zerbini, F.M.; Carvalho, C.M. Molecular variability of *Cowpea mild mottle virus* infecting soybean in Brazil. **Archives of Virology**, v. 159, p. 727-737, 2014b.
- Zhang, C.; Bradshaw, J.D.; Whitham, S.A.; Hill, J.H. The development of an efficient multipurpose bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. **Plant Physiology**, v. 153, p. 52-65, 2010.
- Zhang, C.; Yang, C.L.; Whitham, S.A.; Hill, J.H. Development and Use of an Efficient DNA-Based Viral Gene Silencing Vector for Soybean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, p. 123-131, 2009.
- Zhang, C.Q.; Ghabrial, S.A. Development of Bean pod mottle virus-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. **Virology**, v. 344, p. 401-411, 2006.
- Zhang, X.; Zhu, Y.; Wu, H.; Guo, H. Post-transcriptional gene silencing in plants: a double-edged sword. **Science China Life Sciences**, v. 59, p. 271-276, 2016.
- Zhao, M.M.; An, D.R.; Zhao, J.; Huang, G.H.; He, Z.H.; Chen, J.Y. Transiently expressed short hairpin RNA targeting 126 kDa protein of tobacco mosaic virus interferes with virus infection. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 38, p. 22-28, 2006.