Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Análise da expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* em resposta ao *Citrus leprosis virus C* e ao seu vetor *Brevipalpus phoenicis*

Gabriella Dias Arena

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2014

Gabriella Dias Arena
Bacharel em Biotecnologia

Análise da expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* em resposta ao *Citrus leprosis virus C* e ao seu vetor *Brevipalpus phoenicis*

Orientador:
Dra. **JULIANA DE FREITAS ASTÚA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Arena, Gabriella Dias
Análise da expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* em resposta ao *Citrus leprosis virus C* e ao seu vetor *Brevipalpus phoenicis* / Gabriella Dias Arena. - - Piracicaba, 2014.
143 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.
Bibliografia.

1. CiLV-C 2. Planta modelo 3. *A. thaliana*, RT-qPCR 4. Interação planta-patógeno-vetor 5. Vias de defesa 6. Cilevirus I. Título

CDD 634.3
A681a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos.

À ESALQ e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC e ao Dr. Marcos Antônio Machado, pela disponibilização da infraestrutura necessária à realização deste trabalho.

À Dra. Juliana de Freitas Astúa, pela orientação, por todo o ensinamento e apoio desde o meu início na pesquisa científica e por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Pedro Ramos, pela ajuda imensurável em todas as etapas deste trabalho, por tantos ensinamentos diários e por sempre me fazer dar o melhor de mim.

Ao. Prof Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela oportunidade de ingressar no Programa e pelos ensinamentos em interação planta-patógeno.

À Dra. Maria Andréia Nunes, pelas conversas e imenso auxílio na instalação dos experimentos biológicos.

Ao Dr. Marcelo Ribeiro-Alves, pelo auxílio essencial à elaboração do experimento biológico, avaliação dos dados de RT-qPCR e análises estatísticas.

A todo o pessoal do Grupo Leprose, pela amizade e contribuições valiosas em todos os anos de convivência em grupo.

À Michèle Breton, pelo desenho dos primers e ajuda nas análises de RT-qPCR

À Valéria Mafra, pelo auxílio na avaliação de genes normalizadores.

À todos os queridos amigos do Centro de Citricultura, por tantas alegrias e auxílios, pelos momentos maravilhosos e por tornarem tudo muito mais fácil.

Às minhas amigas-irmãs da República Gaia, pelo acolhimento e amizade indescritível durante todos esses anos.

À minha família, pelo amor, paciência e apoio constante em todos as minhas decisões, sempre me dando forças para dar um novo passo.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

"Como o programador de xadrez, os genes tem de instruir as suas máquinas de sobrevivência, não com detalhes específicos, mas com estratégias e artimanhas gerais da arte de viver"

Richard Dawkins, O Gene Egoísta

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 Leprose dos citros 17
2.1.1 Histórico e panorama atual 17
2.1.2 Vírus causador da leprose dos citros 19
2.1.2.1 Outros vírus associados à leprose dos citros 21
2.1.3 Espécies hospedeiras do *Citrus leprosis virus C* 23
2.1.4 Ácaros vetores da leprose dos citros 25
2.2 Mecanismos de defesa das plantas 28
2.2.1 Vias de sinalização hormonais 31
2.2.1.1 Ácido salicílico 32
2.2.1.2 Ácido jasmônico 33
2.2.1.3 Etileno 35
2.2.1.4 Resistência sistêmica 36
2.2.2 Silenciamento de RNA 39
2.2.2.1 Supressores de silenciamento de RNA 41
2.2.3 Interação planta-patógeno-vetor no patossistema leprose 42
2.3 *Arabidopsis thaliana* como modelo para estudos de interações planta-patógeno 43
2.4 qPCR como ferramenta em estudos de expressão gênica 45
2.4.1 Normalização dos dados obtidos mediante a técnica de qPCR 46
3 OBJETIVO GERAL 49
4 MATERIAL E MÉTODOS 51
4.1 Multiplicação e manutenção de ácaros *B. phoenicis* 51
4.2 Cultivo e manutenção de plantas de *A. thaliana* 51
4.3 Teste de eficiência de inoculação do CiLV-C mediante ácaros virulíferos 52
4.4 Instalação do experimento de *time course* para a análise da interação ácaros/CiLV-C/*A. thaliana* 52
4.5 Extração de RNA e síntese de cDNA 53
4.6 Detecção do CiLV-C mediante RT-qPCR 54

4.7 Seleção dos genes para as análises de trancriptômica durante a interação ácaros/CiLV-C/ *A. thaliana* 55
4.7.1 Seleção e validação de primers 55
4.7.2 Avaliação de genes normalizadores..... 57
4.8 Análises de expressão gênica por RT-qPCR 58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 61
5.1 Populações de ácaros *B. phoenicis* 61
5.2 Eficiência de inoculação de CiLV-C em *A. thaliana*..... 61
5.3 Experimento para a avaliação da interação ácaros/CiLV-C/*A. thaliana* 63
5.4 Qualidade do RNA extraído das plantas 64
5.5 Presença de CiLV-C nas plantas infestadas com ácaros virulíferos 65
5.6 Seleção dos genes marcadores de respostas de defesa..... 66
5.7 Seleção e validação de primers específicos para os genes marcadores..... 66
5.8 Avaliação de genes normalizadores para análises de RT-qPCR..... 67
5.9 Avaliação da resposta de *Arabidospis thaliana* à infestação com ácaros avirulíferos..... 71
5.9.1 Via de SA 71
5.9.2 Vias de JA/ET..... 79
5.9.3 Silenciamento de RNA 85
5.9.4 Considerações finais sobre a interação *B. phoenicis*/*A. thaliana* 89
5.10 Avaliação da resposta de *Arabidospis thaliana* à infestação com ácaros virulíferos..... 91
5.10.1 Via de SA 91
5.10.2 Vias de JA/ET..... 97
5.10.3 Silenciamento de RNA 100
5.10.4 Considerações finais sobre a interação CiLV-C/*A. thaliana* 105
5.11 Considerações sobre as análises de expressão gênica por RT-qPCR..... 109
6 CONCLUSÕES 111
REFERÊNCIAS..... 113

RESUMO

Análise da expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* em resposta ao *Citrus leprosis virus C* e ao seu vetor *Brevipalpus phoenicis*

A leprose dos citros, principal doença viral que afeta a citricultura no Brasil, é causada pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C, gênero *Cilevirus*). CiLV-C possui um genoma bipartido de RNA de fita simples, polaridade positiva, que codifica para seis proteínas. O vírus é transmitido de planta a planta por ácaros *Brevipalpus phoenicis* e pode infectar mais de 40 espécies vegetais, produzindo lesões localizadas cloróticas ou necróticas ao redor do sítio de inoculação pelo ácaro. Invariavelmente, o patógeno não realiza movimento sistêmico em nenhuma de suas hospedeiras conhecidas. Para se revelar os mecanismos moleculares que determinam a atípica interação vírus/ácaro/planta, as atividades das principais vias de defesa foram avaliadas durante a infestação de *A. thaliana* com ácaros avirulíferos e virulíferos para o CiLV-C. A expressão de 19 genes marcadores associados às respostas de defesa do hospedeiro foi verificada mediante PCR quantitativo (RT-qPCR) em um experimento de *time course* (6, 12 e 24 horas após a infestação, e no momento do aparecimento dos sintomas de leprose). As análises demostraram que os genes envolvidos na via do ácido salicílico (SA) foram induzidos durante a interação com o ácaro e com o vírus. O perfil de expressão dos genes desta via durante a infestação com ácaros virulíferos foi similar ao observado com ácaros avirulíferos, porém a resposta da planta a ambos os estímulos foi mais intensa. Ademais, ambas as vias do ácido jasmônico e etileno foram ativadas durante a interação com o ácaro e reprimidas ao longo da infecção com o vírus, sugerindo uma interferência antagonística mediada pela via do SA. O mecanismo de silenciamento de RNA foi regulado de maneira diferencial em resposta à interação com ácaros avirulíferos e virulíferos. Diante da infecção viral, em tempos iniciais da infecção, as plantas responderam com a ativação de uma primeira linha de defesa mediada por AGO1, e depois alternaram para uma segunda linha de defesa mediada por AGO2. Os resultados indicam a ativação de um processo multifatorial em resposta ao CiLV-C e ao ácaro *B. phoenicis* em *A. thaliana*.

Palavras-chave: CiLV-C; Planta modelo; *A. thaliana*, RT-qPCR; Interação planta-patógeno-vetor; Vias de defesa; Cilevirus

ABSTRACT

Gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* in response to *Citrus leprosis virus C* and its vector *Brevipalpus phoenicis*

Citrus leprosis, the main viral disease affecting citrus orchards in Brazil, is caused by *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C, genus *Cilevirus*). CiLV-C has a bipartite genome of singled stranded positive RNA, which encodes six proteins. CiLV-C is plant-to-plant transmitted by *Brevipalpus phoenicis* mites and can infect more than 40 plant species, invariably producing localized chlorotic or necrotic lesions around the site of feeding of the viruliferous mites. Viral long distance movement in its hosts is not accomplished. To unveil the mechanisms determining the unique characteristic of the virus/mite/plant interaction, activities of main plant defense pathways were evaluated during aviruliferous and CiLV-C viruliferous mite infestation in *Arabidopsis thaliana.* The expression of 19 marker genes involved in defense responses along a time course experiment (6, 12 and 24 hours after infestation, and after appearance of leprosis symptoms) was assessed by RT-qPCR. Analyses showed that genes involved in the salicylic acid (SA) pathway were up-regulated during plant interaction with mite and virus. The SA pathway expression profile observed at the infestation by viruliferous mites resembled those observed for the aviruliferous mites, but plant response to both stimuli was stronger. Both the jasmonic acid and ethylene pathways were activated during mite/plant interaction and were repressed at the course of infection with CiLV-C, suggesting an antagonistic effect mediated by the activated SA pathway. Gene silencing mechanism was differentially regulated in response to both aviruliferous and viruliferous mites. Upon viral infection, plants responded with the activation of an AGO1-mediated first defense line, in early times of infection; and then switched to an AGO2-mediated defense. Results indicate the activation of a multifactorial process in response to CiLV-C and *B. phoenicis* mites in *A. thaliana*.

Keywords: CiLV-C; Model plant; *A. thaliana*, RT-qPCR; Plant-pathogen-vector interaction; Defense pathways, Cilevirus

1 INTRODUÇÃO

A citricultura é tida como um dos principais setores do agronegócio brasileiro, destacando-se no cenário mundial principalmente em função da produção e comercialização de suco de laranja concentrado congelado. O país detém cerca de metade da produção mundial de tal produto, destinado majoritariamente ao mercado externo, gerando um faturamento de U$ 1,5 bilhão a US$ 2,5 bilhões por ano (NEVES et al., 2010). Atualmente são produzidas mais de 16 milhões de toneladas da fruta em uma área de cerca de 740 mil ha, sendo o Estado de São Paulo o principal produtor, responsável por 73% da produção nacional (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014).

No entanto, a produtividade citrícola nacional ainda é relativamente baixa, em parte em função das pragas e doenças que acometem a cultura, gerando altos custos de ordem fitossanitária: apenas na última década, pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de cerca de 40 milhões de árvores (NEVES et al., 2010). Considerada a principal doença viral dos citros no Brasil, a leprose destaca-se neste contexto, gerando gastos anuais de até U$80 milhões em pulverização de talhões com acaricidas para controle do ácaro vetor, ainda a forma mais efetiva de controle da doença (BASTIANEL et al.., 2010). A importância da leprose tem aumentado tanto no âmbito nacional, tendo se disseminado por todos os estados produtores de citros do país, quanto mundial, uma vez que já foi relatada na maioria dos países da América do Sul e Central e, mais recentemente, no México (IZQUIERDO et al.., 2011). A chegada da leprose ao hemisfério Norte tem preocupado países onde a citricultura é uma atividade econômica relevante, como os EUA, fazendo com que a doença seja considerada uma ameaça à indústria citrícola local.

A leprose dos citros é causada pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), transmitido pelo ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae). A sintomatologia típica é caracterizada por lesões cloróticas ou necróticas localizadas em folhas, frutos e ramos. Sintomas mais severos podem incluir desfolha, seca de ramos, queda prematura de frutos e até mesmo a morte de plantas altamente suscetíveis (RODRIGUES et al.., 2001; BASSANEZI et al.., 2002; BASTIANEL et al.., 2009; 2010).

O CiLV-C infecta várias espécies do gênero *Citrus*, sendo as laranjas doces (*C. sinensis* L. Osbeck) altamente suscetíveis, constituindo a principal espécie afetada pela doença. Até o início dos anos 2000, o CiLV-C era considerado um vírus com gama de hospedeiras restrita a citros (Rodrigues et al.., 2003). No entanto, relatos posteriores tem mostrado que esse patógeno é capaz de infectar espécies vegetais distintas, como as hospedeiras naturais *Swinglea glutinosa* (LEÓN et al.., 2008) e *Commelina benghalensis* (NUNES et al.., 2012a), além de inúmeras hospedeiras experimentais (GARITA et al.., 2014), dentre elas a planta-modelo *Arabidopsis thaliana* (ARENA et al.., 2013). Apesar da ampla gama de hospedeiras, todas elas parecem apresentar o mesmo padrão de resposta à infecção, visto que o vírus não as invade sistemicamente, permanecendo sempre restrito às áreas lesionadas.

Inicialmente considerado um possível membro da família *Rhabdoviridae* por apresentar partículas morfologicamente semelhantes a esses vírus, após a comparação de sua sequência completa com as demais depositadas no GenBank, o CiLV-C mostrou clara ausência de similaridade com rhabdovírus típicos e maior similaridade – de apenas duas ORFs - com vírus da família *Furoviridae* e *Tobamoviridae* (LOCALI-FABRIS et al.., 2006; PASCON et al.., 2006). As demais ORFs não apresentaram similaridade com nenhuma sequência do GenBank. Além disso, propriedades únicas do CiLV-C, como diferenças na transmissão, morfologia de partículas e efeitos citopáticos induzidos no hospedeiro levaram à criação de um novo gênero denominado *Cilevirus*, tendo o CiLV-C como membro tipo (LOCALI-FABRIS et al.., 2012).

A leprose é, portanto, considerada uma doença viral atípica, por ser causada por um vírus incomum e que não invade o hospedeiro sistemicamente, e com grande importância econômica, o que desperta o interesse por um entendimento dos processos envolvidos na resposta à sua infecção. Apesar disso, há pouca ou nenhuma informação na literatura acerca de tais processos. Embora estudos sobre a resposta de diferentes espécies e híbridos à doença tenham sido conduzidos ao longo da última década, utilizando genótipos de citros no campo ou em casa de vegetação (BASTIANEL et al.., 2008b; FREITAS-ASTÚA et al.., 2008, 2009), apenas recentemente maior ênfase tem sido dada ao entendimento da interação íntima entre o vírus e seu hospedeiro. Neste contexto, foram conduzidos estudos das alterações morfo-anatômicas das lesões em diferentes tecidos vegetais infectados

(MARQUES et al.., 2007, 2010), da expressão gênica diferencial da interação compatível, através da resposta de laranja doce à inoculação pelo vírus (FREITAS-ASTÚA et al.., 2007), e da herança genética da resistência através de mapeamento genético (BASTIANEL et al.., 2009). Esforços posteriores buscaram estudar a resposta global de genótipos resistente e suscetível de citros ao CiLV-C através de análises de microarranjos (KUBO, 2011). No entanto, em função das inúmeras variáveis inerentes ao patossistema, tais como o número de partículas virais encontradas no vetor e as taxas de aquisição e inoculação das mesmas, dados de expressão gênica da interação citros - CiLV-C frequentemente apresentam certa inconsistência, prejudicando a validação dos mesmos. Ademais, a análise dos dados é limitada em função do pouco conhecimento das interações envolvendo citros e seus patógenos e do pouco conhecimento sobre o genoma dos citros, sequenciado recentemente (XU et al., 2013).

Assim, considerou-se de grande utilidade a realização de um estudo que pudesse confirmar e complementar os resultados obtidos, utilizando-se de um hospedeiro facilmente manipulável, com genoma completamente sequenciado e curado, e amplamente utilizado em estudos de interação com patógenos. Neste sentido, a planta modelo *A. thaliana* apresenta-se como uma alternativa, de modo que seu uso facilitaria a identificação de genes do hospedeiro envolvidos na resposta da planta à doença. A melhor compreensão destas respostas poderia levar a um manejo mais adequado da doença e ao estabelecimento de novas estratégias de controle.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a resposta de *A. thaliana* à infecção pelo CiLV-C, através da análise da dinâmica de expressão de genes marcadores das principais vias de resposta de defesa. Para tanto, foi utilizada a técnica de RT-qPCR. Trata-se de um estudo inédito, uma vez que nunca antes foi avaliada a resposta molecular de uma planta-modelo, apenas recentemente relatada como hospedeira do vírus, ao CiLV-C.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leprose dos citros

2.1.1 Histórico e panorama atual

O primeiro relato da doença ocorreu em 1907, na Flórida, EUA (FAWCETT; BURGER, 1911), onde foi nomeada de *scally bark* ou *nail head rust*, devido aos sintomas típicos induzidos em frutos e ramos, e posteriormente de leprose dos citros (FAWCETT; LEE, 1926). Inicialmente, a etiologia da doença foi atribuída ao fungo *Cladosporium herbarium* var. *citriculum* Faw. (FAWCETT; BURGER, 1911). Estima-se que a leprose tenha provocado perdas de 75% da produção de citros em meados da década de 1920; no entanto, desde o final década de 1960, a doença desapareceu dos EUA, possivelmente devido ao uso intenso de enxofre como acaricida e a ocorrência de sucessivas geadas, que em conjunto teriam eliminado as populações virulíferas de ácaros vetores (CHILDERS et al.., 2003b).

Na América do Sul, a doença foi identificada pela primeira vez em 1920 no Paraguai, onde recebeu a denominação de *lepra explosiva*, e foi associada ao fungo *Amylirosa aurantiorum* Speg. (SPEGAZZINI, 1920). No Brasil, a leprose foi encontrada em São Paulo em 1931 (BITANCOURT, 1934); no entanto, a abundância de lesões nas folhas (muito raras na Flórida) atrasou a identificação da doença, que foi chamada de varíola. Apenas dois anos mais tarde observou-se que se tratava da mesma doença encontrada nos EUA (BITANCOURT, 1955). Bitancourt (1955) foi o primeiro a sugerir que a doença era causada por um vírus, devido às lesões circulares localizadas, tipicamente causadas por este tipo de patógeno. No entanto, atualmente há fortes evidências de que a leprose identificada no Brasil é distinta daquela presente no hemisfério Norte em meados do século 20 (KITAJIMA et al., 2011).

Apenas a partir de meados de 1940 foi verificada a relação da doença com a presença de ácaros do gênero *Brevipalpus*, sendo estes das espécies *B. obovatus* Donnadieu na Argentina (FREZZI, 1940; VERGANI, 1945), *B. californicus* Banks nos EUA (KNORR, 1950) e *B. phoenicis* Geijskes no Brasil (MUSSUMECI; ROSSETI, 1963). No entanto, inicialmente acreditava-se que as lesões eram causadas por uma toxina presente na saliva dos ácaros (FREZZI, 1940; VERGANI, 1945). A etiologia viral da doença só foi demonstrada na década de 1970, pela visualização de

partículas virais em folhas de laranja doce sintomáticas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (KITAJIMA et al.., 1972), sendo em seguida confirmada pela transmissão da doença para novos tecidos por enxertia (CHAGAS; ROSSETI, 1984). Finalmente, sintomas típicos de leprose foram obtidos por inoculação mecânica, provando que a doença era causada por um vírus (COLARICCIO et al., 1995).

Atualmente, a leprose ocorre na maioria dos países da América do Sul e Central e recentemente foi identificada no México (IZQUIERDO et al., 2011) (Figura 1). A chegada da leprose à América do Norte traz aos EUA a preocupação de que seus pomares sejam reinfectados. Existe ainda uma ameaça potencial para outras regiões produtoras de citros devido à ampla distribuição do vetor (SALINAS-VARGAS et al.., 2013). Relatos antigos mencionam a presença da doença na Ásia (China, Índia, Ceilão, Japão, Filipinas, Java) e África (Egito e África do Sul) (FAWCET, 1936; BITTANCOURT, 1955; CHOUDHARI; MALI, 1978), porém não houve comprovações posteriores.

A leprose afeta quase todo o território brasileiro, estando presente em todas as regiões produtoras de citros do país (Figura 1). É considerada a doença viral de maior importância da citricultura nacional em função dos altos custos dos acaricidas empregados para seu controle (FUKUDA, 2012).

Figura 1 – Distribuição da leprose dos citros no continente americano e Brasil (retirado de Bastianel et al. 2010). Em cinza, estão demarcados os estados brasileiros e demais países com relatos de leprose dos citros

2.1.2 Vírus causador da leprose dos citros

A leprose dos citros típica e prevalente é causada pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), cujas partículas baciliformes e curtas, apresentando largura de 60 a 70 nm e comprimento de 120 a 150 nm, são semelhantes aos virions da família *Rhabdoviridae*. Elas são encontradas isoladas ou agrupadas no lúmen do retículo endoplasmático e seus viroplasmas ocorrem como inclusões citoplasmáticas elétron densas e vacuoladas, de forma e dimensões variadas (KITAJIMA et al., 2003) (Figura 2).

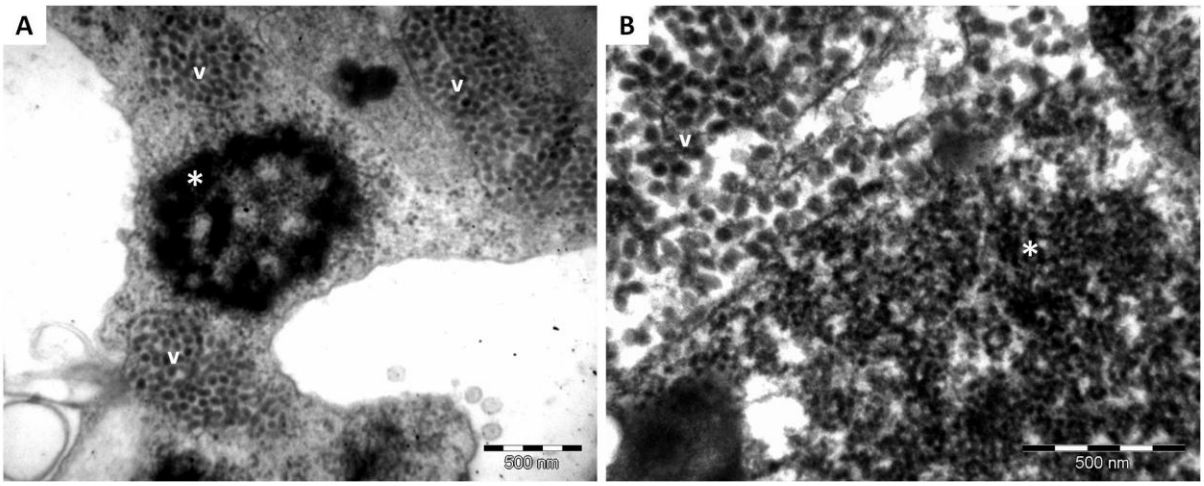

Figura 2 – Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando secções de células do parênquima foliar obtidas de lesões causadas por CiLV-C em *Citrus sinensis* (A) e *Arabidopsis thaliana* (B), identificando a presença de grupos de virions (v) e viroplasma (*) (retirado de ARENA et al.., 2013)

O CiLV-C apresenta genoma bipartido de RNAs de fita simples (ssRNA) de sentido positivo. Ambas as moléculas contêm estrutura *cap* na extremidade 5´ e cauda poli-A na extremidade 3`. O RNA1 (8745 nt) apresenta duas ORFs, correspondentes a uma proteína de 286 kDa e outra de 29 kDa, e o RNA2 (4986 nt) apresenta quatro ORFs, correspondentes às proteínas de 15, 61, 32 e 24 kDA (Figura 3). A proteína de 286 kDa do RNA1 é uma poliproteína possivelmente envolvida na replicação do vírus, que contém quatro domínios conservados: metiltransferase, protease, helicase e polimerase. A proteína de 32 kDa do RNA2 está aparentemente envolvida no movimento célula-a-célula do vírus. As demais

ORFs não apresentam função conhecida (LOCALI-FABRIS et al.., 2006; PASCON et al.., 2006).

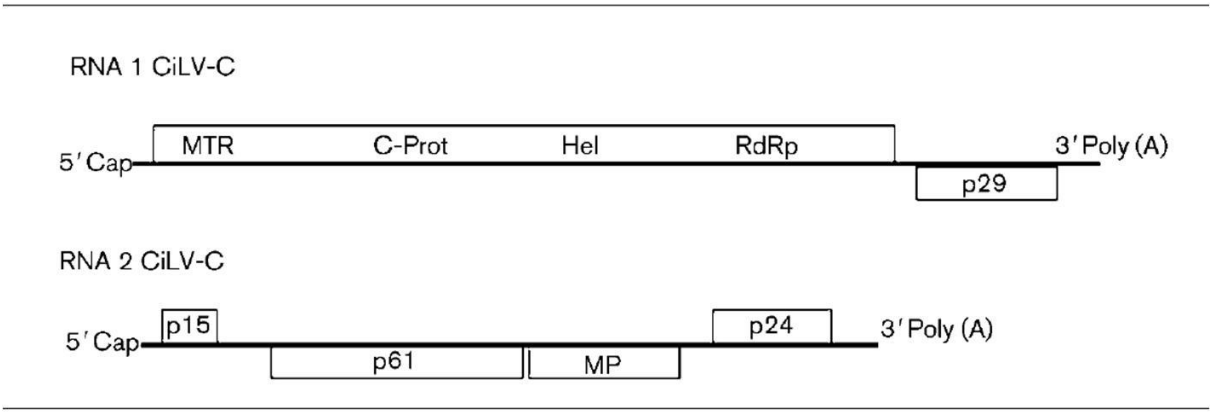

Figura 3 – Organização e estrutura genômica do CiLV-C, proposta por Locali-Fabris et al.. (2006). As ORFs estão indicadas por retângulos e representadas, de acordo com a localização em diferentes quadros de leitura, acima (+1) ou abaixo (+3). Domínios funcionais foram atribuídos de acordo com as sequências traduzidas: MTR, metil-transferase; C-Prot, cisteína protease; Hel, helicase; RdRp, RNA polimerase dependente de RNA; MP, proteína de movimento. As sequências traduzidas com função não identificada estão representadas por sua massa molecular aproximada (em kDa)

Inicialmente, devido à morfologia das suas partículas e local de acúmulo nas células infectadas, o CiLV-C foi considerado um membro tentativo da família *Rhabdoviridae* (JACKSON et al., 2005). No entanto, de acordo com a chave de classificação do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV), todos os rhabdovírus compartilham não apenas a estrutura de partículas, mas também a estratégia de replicação, a organização genômica (com genoma monopartido) e a composição bioquímica [ssRNA (de sentido negativo)]. Além do CiLV-C apresentar genoma bipartido e ssRNA de sentido positivo, seu sequenciamento revelou uma completa falta de similaridade com rhabdovírus típicos, o que definitivamente o exclui desta família. Análises filogenéticas mostraram maior similiaridade deste com outros vírus de ssRNA e sentido positivo, como aqueles pertencentes às familias *Furoviridae* e *Tobamoviridae,* entre outros (LOCALI et al., 2003; LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006). Esta similaridade, porém, é de apenas duas ORFs (replicase e proteína de movimento), sendo que nenhuma das demais apresenta domínios conservados ou similaridade com sequências depositadas nos bancos de dados, sugerindo uma alta especificidade das proteínas de função desconhecida do vírus.

Tais dados demonstraram não ser possível classificar o CiLV-C taxonomicamente dentro de qualquer gênero ou família existentes (LOCALI-FABRIS et al., 2006).

Além disso, outras características tornam o CiLV-C um vírus atípico. Uma delas é sua transmissão por ácaros tenuipalpídeos *Brevipalpus* spp., visto que poucos fitovírus são transmitidos por ácaros, sendo a maioria deles transmitidos por ácaros eriofídios. Em adição, o vírus não se espalha sistemicamente em nenhuma de suas hospedeiras conhecidas, causando apenas lesões localizadas onde ocorre o acúmulo das partículas.

O conjunto de propriedades únicas do CiLV-C – morfologia de partículas, efeitos citopáticos induzidos no hospedeiro, sequência distinta e particularidades na sua transmissão – foram a base para propor a criação de um novo gênero denominado *Cilevirus*, tendo o CiLV-C como membro tipo (LOCALI-FABRIS et al.., 2006). O gênero foi aceito recentemente pelo ICTV e inclui outros membros tentativos baciliformes, citoplasmáticos, transmitidos por *Brevipalpus* spp. e que compartilham similaridade de sequências com o CiLV-C (LOCALI-FABRIS et al., 2012).

2.1.2.1 Outros vírus associados à leprose dos citros

Embora a leprose típica e prevalente seja causada pelo CiLV-C, existem relatos de outros vírus capazes de induzir sintomas similares à doença. Inicialmente considerados isolados do vírus da leprose, atualmente Citrus leprosis virus nuclear type (CiLV-N) e Citrus leprosis virus Cytoplasmatic type 2 (CiLV-C2) representam novas espécies tentativas de fitovírus e *Hibiscus green spot virus* (HGSV) acaba de ser aceito pelo ICTV como nova espécie e membro-tipo do gênero *Higresvirus* (MELZER et al.., 2012; Figura 4).

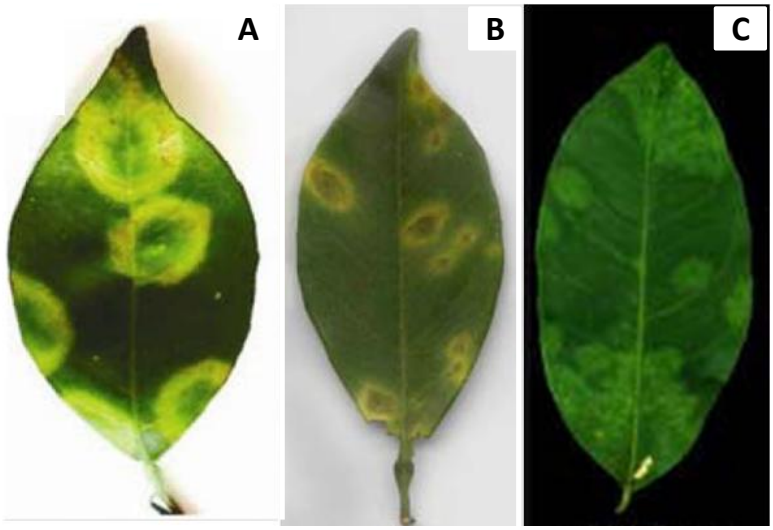

Figura 4 – Sintomas similares aos da leprose dos citros, causados por CiLV-C2 (A) e CiLV-N (B) em *C.sinensis* e HGSV (C) em *C. volkameriana*. Figuras retiradas de Roy et al.. (2013a); Bastianel et al.. (2010) e Melzer et al. (2012)

Descrito há mais de 40 anos, o mais conhecido deles é o CiLV-N (KITAJIMA et al.., 1972). Diferente do CiLV-C, seus virions não são encapsidados, apresentam dimensões de 40-50 nm de largura e 100-110 nm de comprimento e se acumulam no núcleo das células infectadas, gerando configurações conhecidas como “rodas de carroça” (KITAJIMA et al.., 2011). Os sintomas se assemelham aos provocados pelo CiLV-C, mas tendem a ser menores e caracterizados por um centro necrótico e halo clorótico. Seu genoma é bipartido, apresenta seis ORFs, e uma similaridade superior a 90% com o genoma de *Orchid fleck virus* (OFV), o que sugere que o CiLV-N seja uma linhagem de OFV capaz de infectar plantas cítricas (ROY et al.., 2013b) e o inclui como um provável membro do gênero Dichorhavirus, recentemente proposto ao ICTV (DIETZGEN et al.., 2013). No Brasil, a infecção pelo CiLV-N é pouco frequente, estando associada a pomares não comerciais de regiões frias e altitude elevada (BASTIANEL et al.., 2010). Além do Brasil, há relatos da presença de CiLV-N apenas no Panamá (DOMINGUEZ et al., 2001) e no México (ALANÍS-MARTÍNEZ et al.., 2013), e supostamente esta foi a doença relatada nos EUA que desapareceu na década de 1960 (KITAJIMA et al.., 2011).

O CiLV-C2, encontrado recentemente em plantas de laranja doce na Colômbia (ROY et al.., 2013a), apresenta virions semelhantes ao CiLV-C e uma identidade de sequências de cerca de 50% com o mesmo. Seu genoma é bipartido e sua organização é semelhante à do CiLV-C, exceto pela presença de uma longa região 3` não traduzida (3`-UTR) e uma ORF extra no RNA2. Possivelmente, o CiLV-

C2 será classificado como uma nova espécie do gênero *Cilevirus* (ROY et al.., 2013a). No Havaí também foi identificado um isolado com características moleculares semelhantes ao CiLV-C2, porém infectando plantas de hibisco e não de citros (MELZER et al.., 2013).

Por fim, o HGSV, frequentemente encontrado em plantas de *Hibiscus arnottianus*, foi identificado em *Citrus volkameriana* no Havaí (MELZER et al.., 2012). De maneira semelhante ao CiLV-C, seus virions são baciliformes e se acumulam no citoplasma das células infectadas. O genoma do HGSV é tripartido e apresenta oito ORFs; entre elas, o domínio que codifica para a RdRp apresenta similaridade com o domínio correspondente do CiLV-C. Quanto à sua classificação taxonômica, o HGSV é membro-tipo do gênero *Higrevirus*, recentemente aceito pelo ICTV (MELZER et al.., 2012; ICTV, 2014).

2.1.3 Espécies hospedeiras do *Citrus leprosis virus C*

Naturalmente, o CiLV-C infecta várias espécies dentro gênero *Citrus*, embora com diferentes graus de susceptibilidade: as laranjas doces são altamente suscetíveis, as tangerinas (*C. reshni* Tanaka, *C. reticulata* Blanco, *C. deliciosa* Tenore) apresentam-se como intermediárias, enquanto os limões (*C. limon* L. Osbeck) e as limas (*C. aurantifolia* Christmann Swingle) são considerados resistentes (BASTIANEL et al.., 2009, 2010). Nos últimos anos, foram encontradas as primeiras hospedeiras naturais do CiLV-C fora do gênero *Citrus*: a rutácea *Swinglea glutinosa*, frequentemente usada como cerca-viva na Colômbia (LEÓN et al., 2008) e, posteriormente, a trapoeraba (*Commelina benghalensis*), uma monocotiledônea invasora comum em pomares de citros no Brasil (NUNES et al.., 2012a).

Experimentalmente, outras espécies vegetais distintas têm sido relatadas como hospedeiras do vírus. Através de inoculação mecânica, a leprose pode ser transmitida a *Gomphrena globosa, Chenopodium amaranthicolor* e *C. quinoa* (COLARICCIO et al.., 1995). Através da infecção por ácaros virulíferos, a transmissão é eficiente para pelo menos 40 espécies vegetais (NUNES et al.., 2012b; GARITA et al., 2014), dentre elas a planta-modelo *A. thaliana* (ARENA et al., 2013).

Em diferentes níveis, a doença manifesta-se pelo aparecimento de lesões cloróticas e/ou necróticas localizadas na região de alimentação do ácaro vetor em

frutos, folhas e ramos (Figura 5, Quadros A, B e C). As lesões, lisas ou salientes, são tipicamente circulares, mas podem apresentar morfologia alongada, especialmente quando ocorrem próximas às nervuras foliares. Dependendo do número de lesões e sua época de aparecimento, os sintomas podem gerar desfolha, seca de ramos e queda prematura de frutos, promovendo redução drástica na produção (Figura 5, Quadro D). Sintomas mais severos podem surgir em decorrência de grandes infestações de ácaros virulíferos, podendo levar à diminuição da vida útil e até à morte de plantas altamente suscetíveis (RODRIGUES et al.., 2001; BASSANEZI et al.., 2002; BASTIANEL et al.., 2009; 2010).

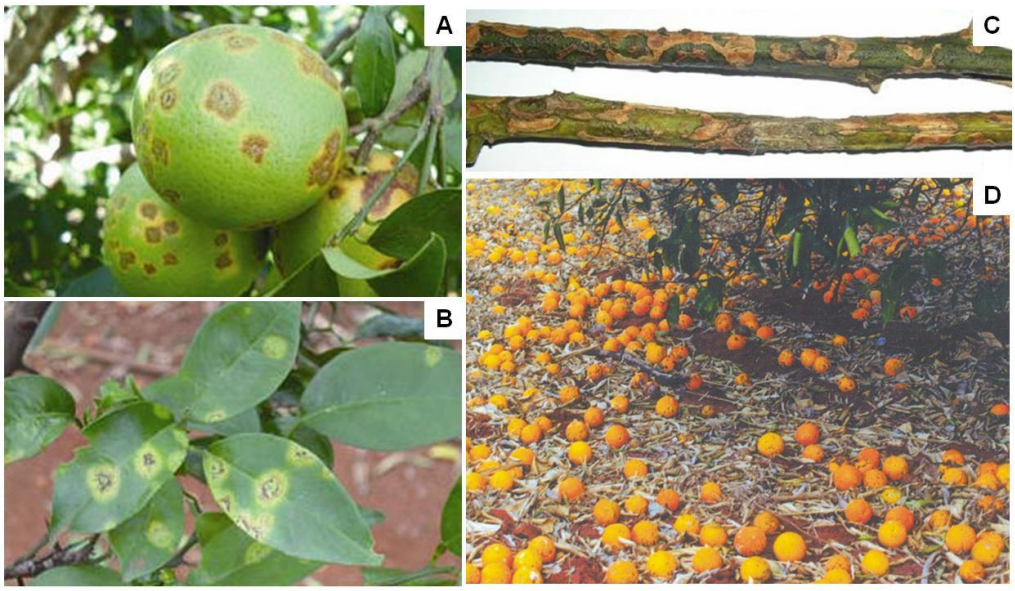

Figura 5 – Sintomas típicos de leprose em frutos (A), folhas (B) e ramos (C) (retirado de BASTIANEL et al.., 2010), com acentuada queda prematura de frutos (D)

O tempo para o aparecimento de uma lesão depende da espécie vegetal, variedade e estado fenológico da planta. No caso da laranja doce, principal espécie de interesse agrícola afetada pela doença, o período entre a infestação com ácaros virulíferos e o aparecimento de sintomas varia de 17 a 60 dias, sendo que a maior parte dos sintomas aparece de 20-30 dias após a infestação (COLARICCIO et al., 1995; RODRIGUES, 1995; BASSANEZI; LARANJEIRA, 2007). Em *A. thaliana* (Figura 6), o período de aparecimento de sintomas é reduzido para 5 a 10 dias após a infestação (ARENA et al.., 2013), mas o padrão de resposta à infecção, com o vírus permanecendo restrito às áreas lesionadas, é o mesmo.

Figura 6 – Plantas de *A. thaliana* com lesões localizadas características de leprose

2.1.4 Ácaros vetores da leprose dos citros

Os ácaros pertencentes ao gênero *Brevipalpus* são considerados os mais economicamente importantes dentro da familia Tenuipalpidae, principalmente por serem vetores de fitovírus (BASTIANEL et al., 2006, RODRIGUES; CHILDERS, 2013). Tais vírus, denominados vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBs) incluem, além daqueles associados à leprose dos citros, Coffee ringspot virus (CoRSV), Orchid fleck virus (OFV), Passion fruit green spot virus (PFGSV), dentre outros, sendo que todos induzem ao aparecimento de sintomas localizados semelhantes aos da leprose. Embora duas outras espécies dentro do gênero *Brevipalpus* tenham sido também relatadas como vetoras do CiLV-C - *B. obovatus* e *B. californicus* - o ácaro *B. phoenicis* (Figura 7) é considerado o vetor mais importante e comumente encontrado nos campos citrícolas.

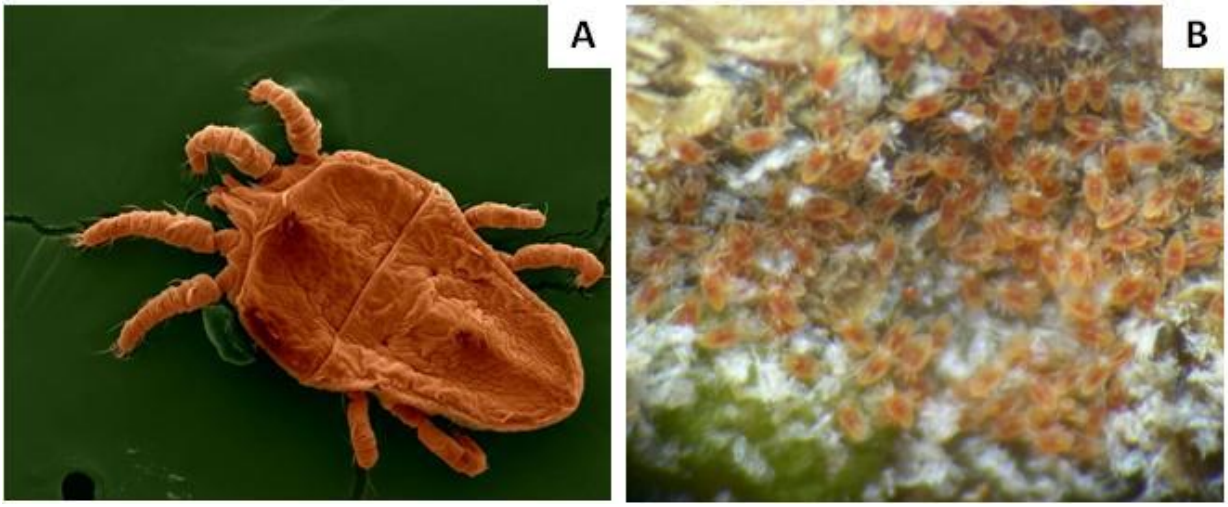

Figura 7 - Ácaros *Brevipalpus phoenicis*. A) Imagens obtidas em microscopia eletrônica. Foto: Bruna Cunha. B) Criação de ácaros em frutos de laranja-doce

Os ácaros *B. phoenicis* são organismos haplóides, com apenas dois cromossomos, que se reproduzem através de partenogênese telítoca, na qual as fêmeas originam fêmeas sem a necessidade de fertilização. A feminilização está associada à presença de uma bactéria endossimbionte (*Cardinium sp*) que bloqueia a formação da glândula androgênica do ácaro, impedindo a produção de hormônio andrógeno durante os primeiros estágios de desenvolvimento do indivíduo (WEEKS et al., 2001). Como consequência, uma proporção muito baixa de machos (em torno de 1%) é encontrada nas populações. Por viver inteiramente em um estado haplóide, enquanto nos demais organismos superiores o estado diplóide predomina, o *B. phoenicis* apresenta-se como de grande interesse ao estudo das vantagens e desvantagens associadas à haploidia em um organismo superior. Fitófago, o *B. phoenicis* é uma praga principal de muitas culturas economicamente importantes (como citrus, café, mamão e maracujá), seja devido a dano direto ou indireto em função da transmissão de fitovírus (CHILDERS; DERRICK, 2003; CHILDERS et al., 2003a).

Devido à sua localização restrita à extensão da lesão, o CiLV-C é totalmente dependente da eficiência do vetor, o que amplia consideravelmente a importância do ácaro na epidemiologia da doença. Em condições naturais, o vírus é disseminado dentro da planta e entre plantas somente mediante alimentação do ácaro vetor em tecidos infectados.

Em adição à sua característica única de haploidia e sua capacidade de transmitir dezenas de vírus de plantas, o *B. phoenicis* apresenta grande importância por ser uma espécie cosmopolita, sendo encontrado em regiões tropicais e subtropicais ao redor de todo o mundo, e polífaga, possuindo cerca de 486 espécies vegetais hospedeiras, pertencentes a 118 gêneros de 64 famílias distintas (CHILDERS et al.., 2003c; RODRIGUES et al., 2013). Dentre elas, encontram-se várias espécies do gênero *Citrus,* além de espécies frequentemente encontrados em pomares de citros, como plantas invasoras ou utilizadas como quebra-ventos. Além de esta ampla gama de hospedeiras alternativas auxiliar na manutenção e incremento das populações de ácaros, existe a possibilidade de comportarem-se também como hospedeiras do vírus, ampliando sobremaneira a probabilidade de disseminação da leprose (MAIA; OLIVEIRA, 2005; NUNES et al.., 2012b).

Os processos de aquisição e inoculação do vírus pelo *B. phoenicis* ocorrem mediante alimentação em substratos contaminados. O ácaro inicia seu processo de alimentação com a perfuração da célula pelo seu estilete retrátil e injeção de saliva para uma pré-digestão do conteúdo celular, seguidas da retração do estilete e posterior ingestão do conteúdo celular extravasado. Assim, a aquisição ocorre durante a ingestão do conteúdo celular contendo o vírus e a inoculação através da injeção de saliva previamente contaminada (RODRIGUES, 1995).

Estudos da eficiência de transmissão do CiLV-C por *B. phoenicis* em laranja doce mostram que os períodos mínimos necessários para a aquisição e inoculação do vírus são de quatro horas e uma hora após as infestações, respectivamente (BASTIANEL et al.., 2008a). Resultados similares foram obtidos em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), no qual os períodos necessários para ambos os processos, aquisição e inoculação, foram de quatro horas (GARITA et al.., 2013).

Durante seu ciclo biológico, o ácaro apresenta os estádios de ovo, larva, protoninfa, deutoninfa e adulto. Todas as fases ativas dos ácaros são capazes de adquirir e inocular o CiLV-C e, uma vez que o ácaro tenha adquirido o vírus na fase larval, ele será capaz de transmiti-lo para a planta por toda a sua vida (OLIVEIRA, 1986). Por ser caracterizada por um período de aquisição com duração de horas a dias e apresentar passagem transestadial do vírus, a interação entre CiLV-C e *B. phoenicis* é considerada do tipo persistente, na qual o vetor é capaz de inocular o vírus após a aquisição por um longo período de tempo.

Dois tipos de transmissão persistente são descritos na literatura: propagativa, na qual ocorre a replicação do vírus no vetor, sendo caracterizada por um período de latência longo (semanas) e possibilidade de transmissão transovariana, e circulativa (não-propagativa), na qual não ocorre replicação do vírus no vetor, apresentando um período de latência curto (horas a dias) e ausência de transmissão transovariana (HULL, 2002). Inicialmente, acreditava-se que a interação entre CiLV-C e *B. phoenicis* seria do tipo persistente propagativa, em função do trabalho de Rodrigues et al.. (1997), no qual foram detectadas partículas do vírus em tecidos do ácaro, e da atribuição deste tipo de transmissão à interação entre vetores e rhabdovirus, grupo no qual o CiLV-C foi tentativamente incluído. No entanto, estudos subsequentes indicaram que a detecção do CiLV-C por aqueles autores teria sido equivocada (as partículas observadas seriam na realidade material paracristalino encontrado no interior de grânulos da gema do ovo, ainda em formação dentro da fêmea)

(KITAJIMA et al., 2008), e o sequenciamento do CiLV-C mostrou que o vírus não faz parte da família *Rhabdoviridae*, como antes suposto (LOCALI-FABRIS et al.., 2006). Ademais, surgiram inúmeras evidências contariando esta hipótese e apontando para uma relação persistente-circulativa: ausência de transmissão transovariana do vírus das fêmeas adultas para seus ovos, de forma que cada larva eclodida precisa se alimentar de tecidos infectados para adquirir o virus e transmiti-lo (NOVELLI et al.., 2007), capacidade de larvas com poucos dias de vida e de alimentação transmitirem a leprose, ausência de viroplasma no interior do ácaro e ocorrência de virions apenas em regiões extra-celulares (KITAJIMA et al.., 2008), e diminuição do título viral ao longo do tempo em ácaros que se alimentaram em tecido infectado (NICOLINI et al.., 2007). Em conjunto, todos estes dados sugerem fortemente que o CiLV-C apenas circula no interior do ácaro, sem contudo replicar-se, e assim a relação vírus/vetor seria do tipo persistente-circulativa.

2.2 Mecanismos de defesa das plantas

Na natureza, as plantas interagem intimamente com patógenos e herbívoros de inúmeros tipos, os quais apresentam estilos de vida distintos e estratégias de infecção e alimentação variadas. Para se proteger contra esta ampla gama de agressores em potencial, as plantas apresentam barreiras de defesa pré-formadas (como cera, paredes celulares e tricomas), as quais previnem ou atenuam a invasão por patógenos ou ataques de herbívoros. Muitos destes agressores, no entanto, obtêm sucesso em superar a defesa pré-invasiva. Visando limitar ataques dos mesmos, as plantas podem recrutar mecanismos de defesa pós-invasivos, correspondentes a respostas ativas desencadeadas a partir do reconhecimento do patógeno ou herbívoro. Dois tipos de resposta ativa são identificadas em plantas: a defesa basal, que ocorre tipicamente nas membranas celulares e é desencadeada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos/microrganismos (*pathogen/ microbe-associated molecular patterns* - PAMPs/ MAMPs), aos herbívoros (*herbivore-associated molecular patterns* – HAMPs) ou a danos à célula hospedeira (*damage-associated molecular patterns* – DAMPs) e a defesa mediada por genes de resistência (*resistance genes* - R), que ocorre dentro das células e é desencadeada pelo reconhecimento de efetores (JONES; DANGL, 2006; WU; BALDWIN, 2010; HENRY et al.., 2012).

Ao tentarem promover seus ataques, patógenos e herbívoros encontram como primeira barreira a defesa basal, na qual a planta reconhece moléculas estruturais amplamente conservadas, os PAMPs/MAMPs (tais como fragmentos de quitina, flagelina e fator de elongação), HAMPs (tais como os FACs - *fatty acid aminoacid conjugates*, conjugados de ácidos graxos e aminoácidos produzidos por modificaçoes de componentes da planta dentro do inseto, identificados em secreções orais dos mesmos) e DAMPs (tais como a sistemina, molécula endógena liberada após dano na célula vegetal). O reconhecimento destes elicitores é mediado por proteínas hospedeiras transmembrana que atuam como receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognized receptors* - PRRs), as quais, no caso da percepção de patógenos, são frequentemente formadas por uma proteína kinase intracelular e uma cadeia LRR extracelular. Como consequência ao reconhecimento, é elicitada uma resposta de defesa, a qual envolve uma cascata de sinalização mediada por proteínas MAPkinases e culmina em uma reprogramação transcricional para a expressão de genes de defesa. Esta primeira linha de defesa é denominada PTI (*pattern-triggered immunity)* (JONES; DANGL, 2006; WU; BALDWIN, 2010; HENRY et al.., 2012).

Para desarmar este sistema, patógenos e herbívoros adaptados adquiriram durante a co-evolução com suas plantas hospedeiras fatores de virulência, denominados efetores, que são despejados dentro das células hospedeiras, suprimindo a PTI. Como resultado da ação de efetores, a planta passa a ser suscetível, o que caracterizada uma suscetibilidade desencadeada por efetor, denominada ETS (*effector-triggered susceptibility*) (JONES; DANGL, 2006; HOGENHOUT; BOS, 2011).

Como contra-ataque, as plantas podem apresentar genes R, que geram proteinas citoplasmáticas capazes de reconhecer esses efetores ou o efeito dos mesmos sobre as células hospedeiras, ativando uma resposta imune secundária, acelarada e amplificada. Esta segunda linha de defesa é denominada ETI (*effector-triggered immunity)* (JONES; DANGL, 2006; HOGENHOUT; BOS, 2011).

A natureza das respostas de defesa que são ativadas durante a PTI ou ETI mostram grande sobreposição (THOMMA et al.., 2011). Defesas contra patógenos incluem fortificação da parede celular através da síntese de calose ou lignina (que podem inibir a penetração do patógeno), a produção de metabólitos secundários antimicrobianos como as fitoalexinas, e a acumulação de proteínas PR como as

quitinases e glucanases, que degradam paredes celulares. Defesas contra herbívoros podem ser indiretas, como a liberação de voláteis que atraem predadores, ou diretas, que incluem metabólitos secundários com efeitos tóxicos ou inibitórios à alimentação e proteínas de defesa, como os inibidores de proteases, que resultam em deficiências que afetam o crescimento e desenvolvimento do herbívoro (WU; BALDWIN, 2010). Tipicamente, porém não necessariamente, a ETI resulta em uma explosão de espécies reativas de oxigênio que culminam em uma resposta de hipersensibilidade (*hypersensitive response* - HR), caracterizada por uma morte celular rápida e localizada no sítio de infecção, ativada pela planta com o intuito de conter o avanço do patógeno e impedir que ele a colonize (ZURBRIGGEN et al., 2010). A HR, como se pode supor, é efetiva contra patógenos biotróficos ou hemibiotróficos, capazes de crescer apenas em tecido hospedeiro vivo, mas não contra necrotróficos, que matam o tecido hospedeiro durante sua colonização (GLAZEBROOK, 2005). O papel da HR na resistência contra herbívoros ainda não está esclarecido (BOS; HOGENHOUT, 2012).

Em função da co-evolução com seus hospedeiros, patógenos e herbívoros bem adaptados podem superar a ETI através de mutações em genes que codificam efetores, de forma que eles não sejam mais reconhecidos pela planta, ou da implementação de um efetor diferente que suprima a ETI previamente elicitada por outro. Por consequência, os patógenos apresentam uma ampla gama de efetores, altamente diversos em sequência e função molecular. As proteínas R cognatas, ao contrário, são estruturalmente conservadas, sendo que a maioria delas contém domínios centrais de ligação a nucleotídeos (NBS – *nucleotide binding site*), C-terminais formados por repetições ricas em leucina (LRR – *leucin rich repeats*) e N-terminais variáveis, sendo comuns os do tipo *coiled-coil* (CC) e *toll and human interleukin receptor* (TIR) (MEYERS et al., 2003). O reconhecimento pelas proteínas R pode ser do efetor em si (modelo receptor-ligante), na qual ocorre uma interação direta entre efetor e proteína R cognata, ou da ação do efetor sobre as células hospedeiras (modelo guarda), no qual a proteína R monitora perturbações em outra proteína hospedeira alvo de efetores de patógenos. A percepção de perturbações nas próprias moléculas hospedeiras é predominante no sistema imune vegetal, em detrimento à percepção direta de moléculas dos patógenos. Ademais, apesar do grande número de efetores, estes apresentam como alvos alguns poucos componentes centrais dos processos de defesa, metabolismo e sinalização. Por esta

razão, poucos genes R são suficientes para proteger as plantas contra uma ampla gama de efetores (DE YOUNG; INNES, 2007).

Em continuidade à rivalidade entre agressor e hospedeiro, a pressão de seleção por patógenos ou herbívoros adaptados pode levar ao surgimento de novos genes R em plantas para que a ETI seja restabelecida, e assim por diante. Em última instância, o resultado final desta batalha depende do balanço entre a habilidade do agressor em suprimir o sistema imune da planta e a capacidade da planta em reconhecer o agressor e ativar defesas efetivas (JONES; DANGL, 2006).

2.2.1 Vias de sinalização hormonais

Todo o processo de tradução dos eventos de reconhecimento do patógeno ou herbívoro na ativação de respostas de defesa é regulado por vias de sinalização mediadas pela ação de fitormônios, sendo as mais comuns as vias do ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) (Figura 8). Tais hormônios acumulam em resposta à infecção por patógeno ou dano gerado por herbívoro, resultando na ativação de genes de defesa. Tipicamente, agentes que não causam danos expressivos nas células, como patógenos biotróficos e herbívoros sugadores, ativam a via do ácido salicílico, enquanto aqueles que provocam danos mais drásticos, como patógenos necrotróficos e herbívoros mastigadores, ativam as vias do ácido jasmônico e etileno (WU; BALDWIN, 2010). As vias de SA, JA e ET estão amplamente interconectadas, sendo que, no geral, as vias de JA e ET interagem entre si de maneira sinergística e a via do SA atua de maneira antagonística a estas duas (PIETERSE et al.., 2009). Este *crosstalk* entre as vias ocorre como uma estratégia da planta para direcionar sua resposta de defesa contra um agressor específico (PIETERSE et al., 2009).

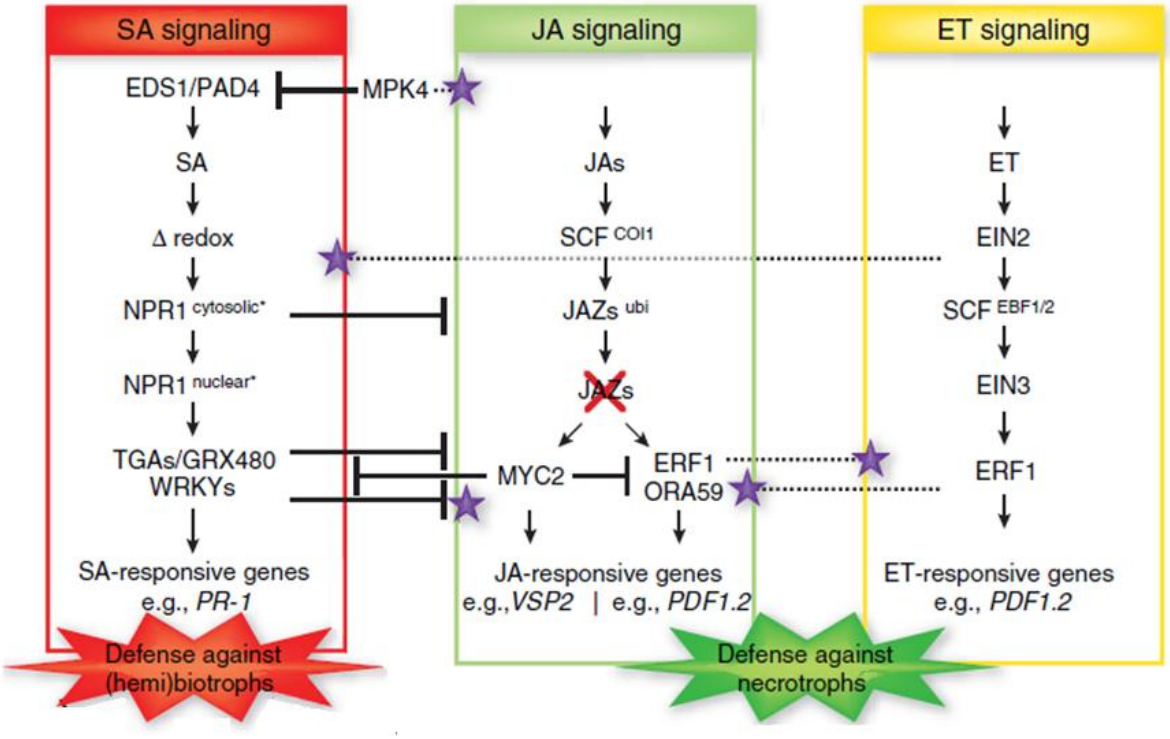

Figura 8 – Principais vias de sinalização hormonais associadas às resposta de defesa das plantas (retirado de PIETERSE et al., 2009)

2.2.1.1 Ácido salicílico

O SA é um metabólito secundário produzido por ampla gama de organismos e essencial na resposta de defesa das plantas a patógenos biotróficos e herbívoros sugadores (GRANT; LAMB, 2006; WU; BALDWIN, 2010).

Duas vias distintas estão envolvidas na biosíntese do SA. Uma delas é mediada pela proteína cloroplástica ICS1 (*isochorismate synthase*), que converte corismato a isocorismato e, por fim, SA. A outra é mediada pela PAL (*phenylalanine ammonia lyase*), que converte fenilalanina a ácido cinâmico, o qual sofre hidroxilação para ácido coumárico com subsequente oxidação para produzir SA (BOATWRIGHT; PAJEROWSKA-MUKHTAR, 2013). A primeira via parece desempenhar um papel majoritário na produção de SA em respostas de defesa, visto que 90% do SA acumulado durante infecções de patógenos é produzido pela ICS1 (WILDERMUTH et al., 2001; FU ; DONG, 2013).

O SA é reconhecido pelas plantas através de receptores como a proteína NPR1 (*non-expressor of PR genes 1*), principal regulador da via *downstream* a SA (BOATWRIGHT; PAJEROWSKA-MUKHTAR, 2013). Em condições basais, a NPR1 encontra-se no citoplasma sob a forma de oligômero através de ligações

intermoleculares dissulfito (WU et al.., 2012). Na presença de um elicitor, proteínas sinalizadoras, tais como o complexo formado por EDS1 (*enhanced disease susceptibility 1*) e PAD4 (*phytoalexin deficient 4*), estimulam a biossíntese de SA pela ICS1 no cloroplasto. O SA produzido é transportado ao citoplasma pela proteína EDS5 *(enhanced disease susceptibility 5)* (SERRANO et al., 2013), onde o acréscimo nos níveis do hormônio gera uma alteração no potencial de oxidorredução. Esta alteração desencadeia a redução das ligações dissulfito que unem os monômeros de NPR1 por proteínas tioredoxinas, provocando a monomerização de NPR1 (MOU et al., 2003; TADA et al.., 2008). Os monômeros de NPR1 entram no núcleo através dos poros nucleares, onde atuam como co-ativadores de fatores de transcrição, induzindo a expressão de genes de defesa (BOATWRIGHT; PAJEROWSKA-MUKHTAR, 2013).

Fatores de transcrição comumente associados à via de SA e alvos diretos da NPR1 são os TGA (GATZ, 2013) e WRKY (RUSHTON et al., 2010). Entre os genes de defesa induzidos, os mais comuns são os da classe PR (*pathogenesis-related genes*), dos quais muitos codificam proteínas com atividade antimicrobiana (VAN LOON et al., 2006b).

2.2.1.2 Ácido jasmônico

O JA é uma molécula originada a partir do ácido linolênico encontrado em membranas e tem sido amplamente relacionado às respostas defensivas contra ferimentos, ataques de insetos mastigadores e organismos necrotróficos em plantas (REYMOND et al*.,* 2000; BARI; JONES, 2009; WU; BALDWIN, 2010). A via do JA inicia-se a partir da liberação do ácido linolênico dos fosfolipídeos de membrana pela ação da fosfolipase A, sendo então convertido em OPDA (*12-oxo-phytodienoic acid*) nos cloroplastos por uma série de reações catalizadas sequencialmente pelas enzimas LOX (*13-lipoxygenase*), AOS (*allene oxide synthase*) e AOC (*allene oxide cyclase*). O OPDA gerado é transportado para os peroxissomos, onde é primeiramente reduzido, passando por três ciclos de β-oxidação para produzir o JA. O JA produzido é modificado no citosol para produzir diversos derivados, que são biologicamente ativos (KAZAN; MANNERS, 2008). Dentre eles, os que modulam a resposta da planta a estresses bióticos são metil-jasmonato (MeJA), jasmonil-isoleucina (JA-Ile) e outros conjugados de JA a aminoácidos (JACs), sintetizados,

respectivamente, pelas enzima JMT (*JA-carboxymethyl transferase*), JAR1 (*jasmonate resistant 1*) e outras enzimas conjugadoras relacionadas. O JA-Ile é a molécula que ativa a maior parte das respostas mediadas pela via (HOWE; JANDER, 2008; WASTERNACK; HAUSE, 2013).

O JA-Ile é reconhecido pela proteína COI1 (*coronatine-insensitive 1*), componente de um complexo ubiquitina ligase tipo E3 denominado SCF (s*kip-cullin-Fbox*). Proteínas JAZ (*jasmonate ZIM-domain*) atuam como substratos de COI1 e interagem com fatores de transcrição que controlam a expressão de genes associados a via, reprimindo-os. Em condições basais, as proteínas JAZ regulam negativamente a expressão de genes responsivos ao JA. Na presença de um elicitor, ocorre o acúmulo de JA e sua conjugação a Ile pela proteína *JA-conjugate synthase* JAR1 (STASWICK; TIRYAKI, 2004). O JA-Ile ativo associa-se a COI1, induzindo à ubiquitinação das proteinas JAZ pelo complexo SCF e consequente degradação das mesmas pelo proteassomo 26S (CHINI et al.., 2007; THINES et al.., 2007). Como consequência, os fatores de transcrição até então reprimidos são liberados, levando à indução de genes de defesa associados à via (CHINI et al.., 2007). Ao contrário do JA-Ile, o MeJA não é capaz de promover a interação entre COI1 e proteínas JAZ (THINES et al.., 2007), o que indica que a atividade biológica deste composto requer a conversão a um JAC bioativo ou que ele promove uma interação de COI1 com diferentes substratos de JAZ (HOWER; JANDER, 2008).

Após a liberação do estado de repressão pelas proteínas JAZ, a via do JA é dividida em dois braços. Um deles é mediado por fatores de transcrição do tipo MYC (como o MYC2), co-regulado pelo hormônio ácido abscísico (ABA) e induz a expressão do gene marcador *VSP2* (*vegetative storage protein 2*). O outro braço é mediado por fatores de transcrição do tipo ERF (como o ERF1 ou ORA59), co-regulado por ET e induz a expressão do gene marcador *PDF1.2* (*plant defensin 1.2*). O braço MYC2 representa a resposta principal a herbivoria e reprime o braço ERF, normalmente ativado em resposta a necrotróficos (VERHAGE et al., 2011; WASTERNACK; HAUSE, 2013).

Defesas diretas da via de JA são mediadas por compostos fitoquímicos como inibidores de proteases e polifenoloxidases, os quais reprimem o crescimento, alimentação e reprodução do invasor, além de algumas proteínas PR de parede celular. Além destas, defesas indiretas são induzidas comumente, tais como a

produção de voláteis que atraem predadores de herbívoros (HOWE; JANDER, 2008; WU; BALDWIN, 2010).

2.2.1.3 Etileno

O ET é um hormônio sintetizado a partir do composto *S-adenosyl-methionine* (SAM), presente no ciclo da metionina (BUCHANAN, 2000), que atua em conjunto com o JA para regular a defesa contra patógenos necrotróficos (VAN LOON et al., 2006a). A biossíntese do ET ocorre a partir da conversão de SAM em *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid* (ACC) pela enzima ACS (*ACC synthase*), seguida da conversão a etileno pela enzima ACO (*ACC oxidase*) (VAN LOON et al., 2006a).

A percepção do ET pela planta ocorre por receptores localizados na membrana, a exemplo do ETR1 (*ethylene response 1*), os quais exercem papéis de reguladores negativos da resposta ao ET. Em condições basais, os receptores suprimem a resposta ao ET através da ativação do regulador negativo CTR1 (*constitutive triple response 1*). Quando ocorre o acúmulo de ET volátil, este se associa aos domínios transmembrana dos receptores, levando à liberação do estado de repressão da via exercido pelo CTR1. Como consequência, é ativado um regulador positivo da resposta ao ET, EIN2 (*ethylene insensitive 2*), que então desencadeia a via de sinalização para uma ativação de fatores de transcrição responsivos ao ET, tais como o EIN3 (*ethylene insensitive 3*). Os fatores de transcrição, por sua vez, induzem a expressão de genes de defesa responsivos ao ET (VAN LOON et al., 2006a; GIMENEZ-IBANEZ; SOLANO, 2013).

Dependendo do agressor, pode ocorrer uma ativação conjunta das vias de JA e ET. Na presença do estímulo, inicia-se uma cascata de eventos de sinalização que envolve a síntese de ambos os hormônios simultaneamente. Esta ativação dupla dirige a expressão de fatores de transcrição ERF, responsáveis por integrar a comunicação entre ambas as vias regulando a expressão de genes de resposta de defesa como o *PDF1.2* (PRÉ et al., 2008). Por outro lado, esta situação é frequente, mas não obrigatória. Alguns patógenos podem induzir a ativação de apenas uma destas duas vias, levando a respostas específicas a ET ou a JA (LORENZO et al., 2003).

2.2.1.4 Resistência sistêmica

Uma vez ativadas as respostas de defesa locais no sítio de infecção, frequentemente é desencadeada uma resposta imune secundária em regiões distantes das infectadas. Este fenômeno é conhecido como resistência sistêmica adquirida (SAR - *systemic acquired resistance*) e caracterizado por um estado de resistência duradouro (podendo durar semanas ou meses) e de amplo espectro (efetivo contra uma vasta gama de patógenos). Como consequência da SAR, plantas desafiadas por um patógeno podem desenvolver uma defesa acelerada e amplificada contra infecções subsequentes por este e outros patógenos (DURRANT; DONG, 2004; SPOEL; DONG, 2012; PIETERSE et al.., 2009; FU; DONG, 2013; SHAH et al., 2014).

A SAR é tipicamente induzida após a morte celular de HR por ETI (SPOEL; Dong, 2012), embora a indução por PTI já tenha sido reportada (MISHINA; ZEIER, 2007). A SAR envolve a via do SA, estando associada a aumentos nos níveis deste hormônio localmente no sítio de infecção e sistemicamente em tecidos não-infectados (SHAH et al.., 2014). Assim, após o ataque por um patógeno avirulento, além de um aumento local dos níveis de SA e consequente indução de respostas locais de defesa, ocorre o espalhamento de um sinal através da planta, a qual induz o acúmulo de SA e consequentemente a expressão de genes de defesa em locais não-infectados (FU; DONG, 2013). A natureza desta massiva reprogramação transcricional envolve a ativação do regulador NPR1 e sua interação com fatores de transcrição TGA, culminando principalmente no acúmulo sistêmico de proteínas PR (SPOEL; DONG, 2012; SHAH et al.., 2014). O estabelecimento de SAR corresponde ao tempo necessário para o acúmulo coordenado de proteínas PR e SA por toda a planta (MALECK et al., 2000; FU; DONG, 2013).

A inabilidade da planta em acumular SA, por exemplo através da expressão constitutiva da enzima salicilato hidroxilase (nahG) que degrada este hormônio convertendo-o em catecol, resulta na perda da expressão de genes *PR* e no enfraquecimento de SAR. Da mesma maneira, aplicações exógenas de SA ou seus análogos sintéticos INA (ácido 2,6-dicloroisonicotínico) e BTH (benzotiadiazole) podem restabelecer a SAR (DURRANT; DONG, 2004; FU; DONG, 2013). Estas observações, em conjunto com o acúmulo de SA no floema ao início da SAR, sugeriram que o sinal móvel que se desloca por toda a planta fosse o próprio SA. No

entanto, experimentos com plantas de tabaco formadas por um porta-enxerto expressando nahG e uma copa selvagem mostraram que a inoculação de um patógeno no porta-enxerto incapaz de acumular SA desencadeia SAR na copa, indicando que o sinal móvel não é o SA (VERNOOIJ et al., 1994). Trabalhos posteriores com tabaco atribuíram este papel ao MeSA (*methyl salicylate*), precursor do AS, acumulado no floema após a ativação da SAR (PARK et al., 2007). Em folhas inoculadas, ocorre o acúmulo de SA, que é convertido em MeSA pela enzima MeSA esterase SAMT1 (*SA methyl transferase 1*) e desloca-se para outros tecidos não infectados, onde então é novamente convertido em SA pela enzima SABP2 (*SA binding protein 2*) (PARK et al., 2007). Por consequência, ocorre o acúmulo de AS em locais infectados e não-infectados, o que caracteriza a SAR.

Entretanto, de forma contrária ao que acontece em tabaco, o MeSA é dispensável para a indução da SAR em *A. thaliana* (ATTARAN et al., 2009), na qual outros sinais de SAR foram identificados, tais como ácido azelaico (JUNG et al.., 2009), glicerol-3-fosfato (CHANDA et al*.,* 2011), *dehydroabietinal* (CHATURVEDI et al.., 2012) e um lipídeo desconhecido transportado pela proteína DIR1 (MALDONADO et al.., 2002; YU et al.., 2013). Aparentemente, a composição do sinal imune móvel necessário para a SAR depende da espécie de planta e do tipo de interação planta-patógeno. Além disso, trabalhos recentes fortemente sugerem que a SAR ocorra em função de um movimento cooperativo de todos estes sinais móveis. Como exemplo, mutantes *dir1-1* apresentam uma elevada produção de MeSA e são incapazes de desenvolver resistência induzida por ácido azelaico e G3P (DEMPSEY; KLESSIG, 2012). Tomados juntos, todos estes dados indicam que existem múltiplos sinais imunes móveis, os quais coordenam as atividades uns dos outros e cooperativamente estabelecem a imunidade sistêmica, apropriada ao tipo de patógeno agressor (DEMPSEY; KLESSIG, 2012).

A manutenção de atividades imunes constitutivas seria prejudicial ao hospedeiro (HEIDEL e*t al*., 2004), pois implica na alocação de recursos para a defesa em detrimento ao demais processos biológicos da planta. Sendo assim, as plantas mantém uma memória imune através de um processo denominado *priming*. A indução da SAR engloba um processo de *priming* (FU; DONG, 2013), resultando em um estado sensibilizado que permite que as celulas respondam rápido e com maior amplitude a ataques secundários de patógenos. Interessantemente, trabalhos recentes mostram que, uma vez induzida, a memória imune configurada pela SAR

pode durar não apenas semanas ou meses, como também ser transmitida às gerações subsequentes (LUNA et al, 2012). Como exemplo, a exposição de plantas parentais de Arabidopsis a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Pst/avrPt2* e ácido β-amino butírico causa na próxima geração uma indução mais forte e rápida de genes de defesa, além de uma resistência aumentada a *Pst* e a um patógeno não relacionado, *Hyaloperonospora arabidopsidis* (LUNA et al., 2012; SLAUGHTER et al., 2012; FU; DONG et al., 2013). Atualmente, especula-se que o *priming*, e sua passagem transgeracional, resulte do acúmulo celular de componentes de sinalização em estado latente (ativados apenas após a exposição a um ataque secundário de patógeno) (BECKERS et al., 2009), modificações epigenéticas (remodelando a cromatina de regiões promotoras de genes de defesa em tecidos sistêmicos, o que potencializa a expressão dos mesmos após o ataque de patógenos) (JASKIEWICZ et al., 2011) e mudanças na arquitetura cromossômica (facilitando a reprogramação transcricional de genes associados à defesa) (SONG et al., 2011). No entanto, a investigação dos mecanismos moleculares por trás desta memória imune é recente, e portanto eles ainda não estão bem esclarecidos.

De maneira fenotipicamente similar à SAR, uma imunidade sistêmica de amplo espectro, denominada resistência sistêmica induzida (ISR – *induced systemic resistance*), pode ocorrer em folhas não atacadas mediante ativação das vias de sinalização de JA/ET. Inicialmente, a ISR foi identificada sendo induzida por microrganismos do solo benéficos à planta, tais como fungos micorrízicos e rizobactérias promotoras do crescimento (PGPR - *plant growth-promoting rhizobacteria*) (VAN WEES et al., 2008; PINEDA et al., 2010). A produção de JA em folhas lesionadas locais e a percepção do JA em folhas distantes é necessária na ISR, o que indica que o próprio JA ou compostos induzidos pelo mesmo correspondem aos sinais móveis que deslocam-se às folhas sistêmicas e elicitam as defesas (LI et al., 2002; WU; BALDWIN, 2010). Ambas, SAR e ISR, são controladas pela proteína NPR1 (VAN WEES et al., 2008). No entanto, enquanto a SAR é predominantemente efetiva contra patógenos biotróficos sensíveis a defesas mediadas por SA, a ISR mostra-se efetiva contra patógenos necrotróficos e herbívoros sensíveis a defesas mediadas por JA e ET (VAN OOSTEN et al., 2008; PIETERSE et al., 2009).

A principal diferença entre os dois tipos de resistência sistêmica recai sobre a resposta bioquímica elicitada na planta. Em contraste à SAR, a ISR não está

associada a uma ativação direta de genes *PR*, mas unicamente a um *priming* para a expressão amplificada de genes de defesa (PIETERSE et al., 2009). De fato, no contexto da ISR, mudanças sistêmicas na expressao gênica são relativamente moderadas ou indetectáveis (VAN WEES et al., 2008). Como exemplo, a alimentação de *Pieris rapae* em folhas de Arabidopsis induz níveis similares da expressão de MYC2 em folhas locais danificadas e sistêmicas não danificadas. No entanto, em folhas sistêmicas isto não leva à uma completa indução da via de JA, tendo em vista os baixos níveis de expressão do gene *VSP2* (responsivo a MYC2) e à falta da supressão dos genes *ORA59* e *PDF1.2* (mediada pelo MYC2), ao contrário do que ocorre em folhas danificadas (VOS et al., 2013).

2.2.2 Silenciamento de RNA

Quando se trata de respostas de defesa a vírus, em adição às vias clássicas de sinalização, um mecanismo frequententemente ativado é o silenciamento de RNA. O silenciamento de RNA corresponde a um mecanismo eucarioto de controle da expressão gênica por meio de pequenos RNAs reguladores, denominados interferentes, e é disparado pela presença de um RNA dupla-fita (dsRNA) ou de uma fita estruturada. Este mecanismo é notavelmente eficiente pois, uma vez ativado, gera-se um *primming* contra qualquer espécie de RNA compartilhando homologia de sequência com as moléculas ativadoras. Através do silenciamento, os RNAs interferentes exercem papel essencial não apenas sobre a defesa anti-viral, mas sobre processos biológicos distintos, como a regulação do desenvolvimento ou o remodelamento de cromatina (PADMANABHAN et al.., 2009).

As moléculas de RNA interferente se dividem em duas classes, de acordo com sua origem: microRNAs (miRNA) e pequenos RNAs interferentes (siRNA). Os miRNA são produzidos a partir de moléculas de RNA precursoras de dsRNA contendo um grampo, as quais são codificadas por genes *MIR*, portanto de origem endógena. Tais genes normalmente se situam em regiões intergênicas ou íntrons de genes e não codificam proteínas, exercendo unicamente função de regulação gênica. Os siRNAs, por sua vez, são produzidos a partir de moléculas de dsRNA precursoras distintas, cuja formação frequentemente requer RNA polimerases dependentes de RNA (RDR), podendo ter origem endógena (como transposons, RNAs aberrantes e nat-siRNA) ou exógena (como vírus ou transgenes). No caso dos

vírus de RNA, as moléculas de dsRNA ativadoras da produção de siRNAs são formadas durante a sua replicação ou podem ser os própios genomas em regiões altamente estruturadas (VOINNET, 2001; PUMPLIN; VOINNET, 2013)

A via de silenciamento inicia-se, portanto, a partir do ácumulo de dsRNA, proveniente das diferentes origens, e dispara um mecanismo de destruição de mRNAs. Uma endonuclease RNAse III não-específica, denominada Dicer (DCL), reconhece estas longas moléculas de dsRNA e as cliva em pequenas moléculas de RNA interferente, geralmente dentre 20 e 25 nucleotídeos. Tais moléculas são estabilizadas pela proteína HEN1, uma metiltransferase que catalisa a metilação das mesmas. Os fragmentos de siRNA são recrutados por complexos RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), os quais apresentam como componente central proteínas Argonautas (AGO). Estes siRNA bifilamentares são desenrolados, de modo que uma fita permanece associada ao complexo como um siRNA unifilamentar. O complexo RISC reconhece RNAs complementares ao RNA fita simples a ele acoplado, ocorrendo um fenômeno de hibridização. Ocorrida a hibridização, pode ocorrer a clivagem deste RNA (quando há um pareamento perfeito) ou inibição da tradução (quando não há um pareamento perfeito). Os pequenos RNAs reguladores podem ainda se espalhar por toda a planta, via plasmodesmos (comunicação célula-a-celula) e floema (transporte a longa-distância), tornando o silenciamento um processo sistêmico (SEO et al., 2013; PUMPLIN; VOINNET, 2013).

A planta-modelo *A. thaliana* codifica quatro proteínas DCL, dez AGO e três RDR, que participam em quatro diferentes vias de silenciamento de RNA (MOLNAR et al., 2011, POULSEN et al., 2013). Em Arabidopsis, já foram relatados os papéis na defesa antiviral das proteínas DCL1, DCL2, DCL3 DCL4, AGO1, AGO2, AGO4, AGO7, RDR1, RDR2 e RDR6 (SEO et al., 2013).

O silenciamento de RNA é o mecanismo por trás da chamada proteção cruzada, espécie de vacinação na qual a inoculação profilática de uma forma atenuada do vírus é usada para controlar doenças virais em plantas. Desta forma, muitas infecções em plantas previnem o acúmulo de linhagens virais proximamente relacionadas ao vírus que as infectou primeiro, pois vírus com homologia de sequência podem ser co-silenciados. Este sistema de defesa destaca-se em sua habilidade de se adaptar a qualquer vírus, pois sua especificidade não é geneticamente programada pelo hospedeiro, mas sim ditada pela sequência

genômica do próprio vírus invasor (VOINNET, 2001). Em função da sistemicidade do silenciamento, este sistema destaca-se também pela sua capacidade de propagar-se a partes distantes da planta. O silenciamento gênico contra vírus pode ainda ser eficientemente estimulado através da expressão heteróloga de grampos de RNA em plantas transgênicas de numerosas espécies (SAURABH et al., 2014).

2.2.2.1 Supressores de silenciamento de RNA

Caso o silenciamento de RNA fosse sempre efetivo, não haveriam viroses de plantas. A simples observação de que vírus infectam plantas indica que eles desenvolveram uma maneira de suprimir este mecanismo: os supressores virais de silenciamento de RNA (*Viral suppressors* of *RNA silencing* - VSRs). Da mesma maneira que o silenciamento pode promover a proteção cruzada, a supressão do silenciamento pode levar a um efeito sinergístico na co-infecção com dois vírus, no qual um segundo vírus, normalmente pouco ou não-infectivo, torna-se capaz de infectar a planta, multiplicando-se neste hospedeiro e causando uma acentuação dos sintomas provocados pelo primeiro. Esta sinergia ocorre devido à atuação do VSR de um vírus sobre o silenciamento sofrido por outro (VOINNET, 2001).

Muitos VSRs têm sido identificados em fitovírus pertencentes a quase todas as famílias (BIVALKAR-MEHLA et al., 2011) e atuando em diferentes etapas do silenciamento através de diversos mecanismos, o que indica uma convergência evolutiva (PUMPLIN; VOINNET, 2013). Como exemplos, a proteína V2 do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) impede a formação de siRNA, a L2 dos begomovírus suprime a via de metilação do DNA, a 2b do *Cucumber mosaic virus* (CMV) inibe a ação catalítica do RISC, a HC-Pro dos potyvirus afeta um processo autônomo celular necessário para a manutenção do silenciamento e a p25 do *Potato virus X* (PVX) afeta a sinalização sistêmica (DÍAZ-PENDÓN; WING, 2008; VOINNET, 2001; PUMPLIN; VOINNET, 2013). Independentemente de sua função, quase todos os VSRs caracterizados até o momento exercem um papel crítico no movimento a longa-distância de seus vírus (VOINNET, 2001).

Existem três possibilidades associadas ao papel dos VSRs no movimento viral: supressão intracelular do silenciamento, permitindo acúmulo suficiente de genoma viral para que a propagação ocorra de uma célula a outra, e portanto o movimento do vírus seria uma consequência indireta deste acúmulo; inibição do

silenciamento em células que estão prestes a serem invadidas, com o supressor de silenciamento atuando de uma maneira não autônoma à célula; e prevenção do sinal de silenciamento através do movimento do VSRs de uma célula infectada para uma não-infectada, de uma maneira anterior à infecção viral (VOINNET, 2001).

Com a inserção dos VSRs no contexto de ataque e contra-ataque entre vírus e seus hospedeiros, é possível observar um paralelo entre o processo de ativação e supressão do silenciamento de um lado e o esquema clássico de resistência por PTI e ETI do outro. Alguns autores propõem que estes dois processos são de fato manifestações de um fenômeno similar, se não idêntico (SANSREGRET et al., 2013). Neste contexto, os dsRNAs virais atuam como PAMPs ou VAMPs (*virus-associated molecular patterns*), por constituírem um produto obrigatório na replicação de vírus de RNA, a maquinaria de silenciamento (formada pela DCL e RISC) forma a primeira linha de defesa que reconhece estes padrões, a PTI, e os VSRs constituem os efetores que suprimem essa defesa. Por consequência, podem haver proteínas hospedeiras R, ainda não identificadas, que reconheceriam a presença destes efetores, desencadeando respostas típicas de ETI, incluindo a HR (PUMPLIN; VOINNET, 2013; SANSREGRET et al., 2013).

2.2.3 Interação planta-patógeno-vetor no patossistema leprose

Apesar de a leprose dos citros ser conhecida por décadas e apresentar grande importância fitossanitária, o conhecimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade viral e resposta da planta à doença ainda é limitado.

As lesões provocadas pelo vírus, localizadas e não sistêmicas, se assemelham até certo ponto a respostas de hipersensibilidade (HR) observadas em interações incompatíveis (ausência de doença), porém com desdobramento mais lento, uma vez que a HR normalmente se manifesta em poucos dias. No entanto, ainda não existem evidências de que esta hipótese seja verdadeira. Análises de cortes histológicos de lesões de leprose mostram a sua similaridade com as observadas em tecidos com HR (MARQUES et al., 2007; 2010). Por outro lado, análises da expressão gênica diferencial de plantas de laranja Pêra desafiadas ou não com CiLV-C através de bibliotecas de EST, mostram mudanças significativas no perfil de expressão de uma série de genes, principalmente aqueles envolvidos em energia e metabolismo, mas não similaridade marcante com as respostas

normalmente associadas à HR, verificando que possivelmente esta interação seja do tipo compatível (presença de doença) (FREITAS-ASTÚA et al., 2007).

Existe ainda a possibilidade de que algum mecanismo de inibição da movimentação viral esteja envolvido na resposta da planta à doença. O CiLV-C permanece restrito ao movimento célula-a-célula em torno do sítio de infecção e não atinge o floema, sendo possível encontrar partículas virais nas células da epiderme e parênquima, mas nunca na região vascular (EW KITAJIMA, dados não publicados). Estudos da resposta global de genótipos resistente e suscetível de citros ao CiLV-C através de análises de microarranjos encontraram vários genes diferencialmente expressos. Dentre eles, foi identificada a indução do gene *AGO2* (*argonauta 2)*, o qual codifica um proteína-chave da via de silenciamento de RNA, indicando uma possível atuação deste mecanismo na resposta ao vírus (KUBO, 2011). Diversos trabalhos relatam o papel do silenciamento em restringir o movimento viral, principalmente em regiões próximas ao floema (VUORINEN et al., 2011; MARATHE et al.., 2000). Assim, existe a hipótese de que o CiLV-C não tenha supressor de silenciamento, ou tenha um supressor fraco, o que resultaria na sua incapacidade de entrar no floema e, consequentemente, invadir o hospedeiro sistemicamente.

Ademais, em função do modo de transmissão do CiLV-C, e considerando a total dependência pelo vetor para disseminação do vírus na natureza, especula-se que a resposta das plantas à leprose englobe tanto respostas clássicas a patógenos quanto às injúrias causadas pela alimentação do ácaro.

Observa-se, portanto, que as interações entre vírus, vetor e planta ainda não estão totalmente esclarecidas. O conhecimento das alterações transcricionais do hospedeiro como resultado destas interações torna-se crucial à compreensão do patossistema e essencial ao estabelecimento de estratégias de controle mais sustentáveis, a exemplo da superexpressão de genes envolvidos em pontos-chave das respostas de defesa.

2.3 *Arabidopsis thaliana* como modelo para estudos de interações planta-patógeno

Para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na imunidade das plantas, *A. thaliana* tem se mostrado uma excelente espécie modelo. De fato, em muitas interações de Arabidopsis com agentes patogênicos, os papéis dos

hormônios na regulação desta imunidade e os mecanismos por trás da mesma têm sido demonstrados (PIETERSE et al.., 2009). Um número crescente de estudos tem relatado Arabidopsis como hospedeira para vírus de plantas de todos os tipos, incluindo o CiLV-C (ARENA et al.., 2013), e a planta tem se tornado cada vez mais útil como modelo para o estudo de interações planta-vírus compatíveis e incompatíveis (CARR; WHITHAM, 2007). Neste sentido, inúmeros trabalhos de transcriptoma envolvendo Arabidopsis e doenças virais têm sido realizados, revelando alterações significativas na expressão de genes durante o processo de infecção (ASCENCIO-IBANEZ et al., 2008; BRADER et al., 2007; CHEN et al., 2002; GOLEM; CULVER, 2003; HUANG et al*.,* 2005; ISHIHARA et al., 2004; LOVE et al., 2007; MARATHE et al., 2004; POSTNIKOVA; NEMCHINOV, 2012; RALHAN et al., 2012; TRINKS et al., 2005; WHITHAM et al*.,* 2003; YANG et al., 2007).

Embora tenha sido promovida como ferramenta genética nos anos 70 (RÉDEI, 1975), a consolidação do uso de Arabidopsis como modelo ocorreu a partir do ano 2000, quando a sequência do seu genoma foi obtida (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000). Desde então, promoveram-se grandes avanços na compreensão de essencialmente todos os aspectos da fisiologia das plantas cultivadas e amplo desenvolvimento na pesquisa agrícola. No campo das interações planta-patógeno, a Arabidopsis foi destacada como modelo no início dos anos 80 (BALAZS; LEBEURIER, 1981) e tem contribuído imensamente à revelação dos mecanismos por trás da resistência e susceptibilidade às doenças (CARR; WHITHAM, 2007).

Dentre as vantagens que tornam Arabidopsis um sistema modelo ideal estão um banco curado de sequências, garantindo a qualidade de anotação, e a sua utilização em inúmeros estudos de interação planta-patógeno já publicados, para fins de comparação ou inferências dos resultados com outros patossistemas. Além disso, a instalação de grandes experimentos é facilitada, devido ao seu pequeno porte, simplicidade de cultivo, facilidade de manipulação, reprodução rápida, ciclo de vida curto, grande produção de sementes e modo de reprodução autógama (DELATORRE; SILVA, 2008). Excelente modelo para análises genéticas, a Arabidopsis possui ainda genoma bastante reduzido e alta densidade gênica (cerca de 85% do seu genoma é composto por genes propriamente ditos, havendo pouca repetição de DNA não-codificante). Isso faz com que o sequenciamento, isolamento e, por consequência, o entendimento das funções de cada gene em *A. thaliana*

possa ser realizado com maior rapidez e menor custo (DELATORRE; SILVA, 2008). Ademais, é possível a transformação genética de Arabidopsis através de *Agrobacterium tumefaciens* de uma maneira prática e eficiente (CLOUGH; BENT, 1998), facilitando o estudo funcional dos genes, enquanto a maioria das espécies cultivadas apresenta grandes dificuldades para transformação (LABRA et al., 2004; DELATORRE; SILVA, 2008). Em relação ao estudo da leprose dos citros na modelo *A. thaliana*, existe ainda a vantagem adicional do curto período de manifestação de sintomas. Enquanto em citros as lesões da doença aparecem em torno de 30 dias após a infestação com ácaros virulíferos, em Arabidopsis este período é de cerca de 7 dias (ARENA et al., 2013).

As vias de defesa parecem ser conservadas na maioria das espécies de plantas, uma vez que genes homólogos em sequência e função têm sido identificados em uma variedade de espécies (FEBRES et al., 2009). Como implicação prática, é possível que resultados encontrados para sistemas modelo como Arabidopsis possam ser aplicados a culturas menos estudadas e agronomicamente importantes como citros, nas quais determinadas abordagens genéticas não seriam factíveis ou práticas. Em última análise, é útil aplicar o conhecimento fundamental obtido através do uso da planta modelo para desenvolver métodos de controlar diferentes doenças virais em outras espécies. Nota-se, portanto, o grande potencial de utilização de Arabidopsis no estudo de doenças de espécies cultivadas, e torna-se interessante a realização de um estudo de interação envolvendo Arabidopsis e o CiLV-C.

2.4 qPCR como ferramenta em estudos de expressão gênica

As recentes e contínuas descobertas em sistemas modelos como Arabidopsis têm aprimorado amplamente nosso entendimento das bases moleculares de defesa das plantas e como as vias de defesa operam e interagem. Em adição, o advento das genômicas tem facilitado comparações entre sistemas modelos e culturas menos estudadas. Assim, os avanços na genética molecular têm aberto novas perspectivas para elucidar a relação entre os genes e seus fenótipos correspondentes, trazendo novas técnicas e ferramentas que permitem a identificação de genes envolvidos em respostas de suscetibilidade e resistência a doenças (FEBRES et al., 2009).

Destaca-se a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) como estratégia para a análise do perfil de expressão de genes de interesse em determinada condição experimental. A técnica de RT-qPCR tem como base o processo de transcrição reversa seguido da reação em cadeia da DNA polimerase com a incorporação de moléculas fluorescentes, as quais podem ser quantificadas durante a cinética da reação (em “tempo real”). Vários fluoróforos têm sido utilizados para este fim, como sondas hidrolíticas, sondas de hibridização, sondas-primer, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) e corantes intercalantes (KUBISTA et al.., 2006). Entretanto, este último tem sido o mais utilizado em função de seu baixo custo relativo, fácil uso e alta sensibilidade. Através da emissão de sinal fluorescente proporcional à quantidade de produtos de amplificação formados, estes são monitorados a cada ciclo de reação, permitindo sua detecção rápida e específica (NOLAN; BUSTIN, 2002).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é atualmente o método mais comum para a caracterização de padrões de expressão gênica, podendo quantificar a expressão de RNAs mensageiros até mesmo em baixos níveis e permitindo a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação. A técnica apresenta, portanto, alta precisão, especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade na análise de transcritos, além de ser rápida e relativamente barata (GINZINGER, 2002; RAJEEVAN et al., 2001; WALKER, 2002). Diante de suas vantagens, análises de expressão gênica realizadas por meio de RT-qPCR têm sido cada vez mais numerosas, representando uma de suas principais aplicações. No campo de interações planta-patógeno, o número de publicações envolvendo quantificação da expressão gênica através de RT-qPCR é imenso e crescente. Neste contexto, pode-se encontrar diversos exemplos de interações sendo avaliadas deste modo (SCHENK et al., 2003; ŠAŠEK et al., 2012; STURBOIS et al., 2012).

2.4.1 Normalização dos dados obtidos mediante a técnica de qPCR

Embora a RT-qPCR permita quantificar de forma confiável padrões espaciais e temporais da expressão de um gene, é necessário controlar variações não-específicas aos tratamentos entre as amostras (tais como erros de pipetagem, quantidade e integridade de RNA ou eficiência da transcrição reversa) a fim de que comparações precisas possam ser realizadas entre diferentes amostras testadas e

assim seja garantida a reprodutibilidade dos dados (BUSTIN et al., 2009). Este controle é atingido por meio da normalização dos valores de expressão gênica obtidos por RT-qPCR através do uso de genes que se mantenham estáveis nas condições a serem comparadas, denominados genes de referência (CZECHOWSKI et al., 2005).

Tradicionalmente, os genes mais frequentemente utilizados para fins de normalização incluem os *housekeeping genes*, ou seja, genes requeridos para processos celulares básicos, como manutenção da estrutura celular ou metabolismo primário, e portanto tidos como sujeitos a pouca ou nenhuma variação em sua expressão. No entanto, os níveis de transcritos de muitos genes *housekeeping* tradicionais frequentemente não são estáveis, de forma que seu uso pode comprometer análises posteriores de expressão gênica. Não existe, portanto, um gene de referência universal: um gene com estabilidade de expressão bem validada pode não apresentar a mesma estabilidade quando avaliado em outras condições experimentais, espécies ou tecidos. O uso de um gene de referência instável pode representar um impacto significativo nos resultados obtidos, levando a interpretações errôneas de dados e subsequentes conclusões equivocadas (HUGGETT et al., 2005; GUÉNIN et al., 2009; GUTIERREZ et al., 2008). Deste modo, antes das análises de expressão de genes-alvo em experimentos de RT-qPCR, é essencial a escolha de genes de referência adequados para fins de normalização de dados. Esta seleção representa uma importância adicional em experimentos de quantificação de transcritos no contexto de infecções virais, visto que os vírus podem interferir significativamente com vias do hospedeiro, cujos componentes frequentemente incluem genes de referência tradicionais (WATSON et al., 2007).

Muitos estudos têm sido conduzidos com o intuito de se determinar genes de referência válidos entre várias espécies de plantas, estágios de desenvolvimento e estresses. Para *A. thaliana*, Czechowski et al. (2005) realizaram um estudo geral, no qual verificaram os níveis de transcritos de genes previamente identificados como estáveis em uma coleção de dados públicos de expressão, obtidos a partir de diferentes tecidos de plantas em diferentes estágios de desenvolvimento, submetidas a diferentes condições de estresses bióticos e abióticos. Como resultado, foram validados dezoito novos genes de referência para estudos de expressão gênica em *A. thaliana*, dentre eles *TIP41-like family protein* (*TIP41*), *SAND family protein* (*SAND*) e *PPR family protein* (*PPR*). No contexto de infecções

virais, Lilly et al. (2011) avaliaram a estabilidade de genes candidatos em plantas de *A. thaliana* infectadas com cinco diferentes vírus individualmente, tendo identificado, dentre os genes mais estáveis, *F-box family protein* (*F-BOX*), *elongation factor 1-α* (*EF1-α*) e *SAND*. Mafra et al. (2012) identificaram genes de referência, dentre eles *F-BOX*, *SAND* e *glyceraldehyde-3-phosphate* (*GAPDH*), adequados para estudos em espécies de citros infectadas com patógenos distintos, incluindo o CiLV-C. No entanto, não existem estudos de genes de referência em plantas de *A. thaliana* desafiadas com o vírus da leprose dos citros C. Sabendo-se que a estabilidade gênica oscila de acordo com as variações de vírus e espécies hospedeiras (LILLY et al., 2011; MASCIA et al., 2010), fez-se necessária uma validação de genes de referência adequados antes de se proceder a análises de expressão em plantas de *A. thaliana* infectadas com leprose dos citros.

3 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil de expressão de genes marcadores das diferentes vias de defesa ao longo de um *time course* em *Arabidopsis thaliana* em resposta ao vírus da leprose dos citros C.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Multiplicação e manutenção de ácaros *B. phoenicis*

Ácaros avirulíferos provenientes de uma população mantida em frutos sadios de laranja doce são multiplicados rotineiramente no Laboratório de Acarologia do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”.

Para obtenção de população virulífera, ácaros avirulíferos foram submetidos a um período de sete dias para aquisição do vírus, sendo transferidos para frutos de laranja doce com lesões de leprose. A fim de proporcionar uma melhor colonização pelos ácaros, as laranjas foram previamente preparadas com uma mistura de farinha de trigo, areia fina peneirada e gesso (1:2:1), além de água (RODRIGUES et al., 2007). Para obtenção da população avirulífera, os ácaros avirulíferos foram transferidos para frutos, também previamente preparados com a mesma mistura, de lima ácida “Tahiti”, imune ao vírus, garantindo assim a ausência do vírus nos ácaros. Desta forma, foram mantidas continuamente duas populações de ácaros: uma avirulífera (multiplicada sobre frutos de lima, sadios) e outra virulífera (multiplicada sobre frutos sintomáticos de laranja doce, servindo como fonte de inóculo do CiLV-C). Antes da instalação dos experimentos de infestação em *A. thaliana*, ambas as populações de ácaros foram testadas por RT-PCR com primers que amplificam parte do gene da proteína de movimento de CiLV-C (LOCALI et al., 2003) com o intuito de confirmar se os ácaros continham ou não o vírus.

4.2 Cultivo e manutenção de plantas de *A. thaliana*

Foram utilizadas plantas de *A. thaliana* do ecótipo Columbia (Col-0), previamente identificado como suscetível ao vírus da leprose (ARENA et al., 2013). As sementes, obtidas no TAIR (The Ohio State University, EUA), foram esterilizadas através de lavagem em etanol 70% por 5 minutos e tratamento em hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos sob agitação, seguido de três lavagens com água mili-Q estéril. Para a quebra de dormência, visando uma maior sincronia no processo de germinação, as sementes recém-esterilizadas foram mantidas em câmara fria a 4°C no escuro por 4 dias. Passado este período, ao tubo contendo as sementes foi adicionada uma solução estéril de ágar 0,1% e as sementes embebidas nesta

solução foram pipetadas em vasos contendo substrato estéril, formado por uma mistura de terra adubada acrescida de vermiculita (proporção de 2:1). Os vasos foram cobertos por filme plástico, a fim de criar uma câmara úmida que favorecesse o crescimento das plantas, e incubados em câmara de crescimento (Adaptis 1000, CONVIRON) a uma temperatura de 22 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro. Após duas semanas, a cobertura plástica foi retirada e as plantas individualizadas em cada vaso.

Todas as plantas foram incubadas nestas condições por quatro semanas. Passado este período, as plantas apresentando as mesmas características morfológicas foram selecionadas para os experimentos de infestação com ácaros.

4.3 Teste de eficiência de inoculação do CiLV-C mediante ácaros virulíferos

Foi realizado um teste prévio de eficiência de transmissão do CiLV-C pelo vetor para seleção do tempo inicial do *time course*. Neste teste, ácaros *B. phoenicis* virulíferos foram transferidos para plantas de *A. thaliana* Col-0, sendo mantidos nas mesmas por dois tempos distintos: 4 e 6 horas após a infestação (hai). Passados estes períodos, os ácaros foram retirados das plantas e estas foram mantidas incubadas a uma temperatura de 22 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro. Outras plantas foram mantidas infestadas com ácaros virulíferos, como controle de inoculação do vírus. Cada tratamento (4 hai, 6 hai e controle) contou com 10 repetições e cada planta foi infestada com cinco ácaros. Vale ressaltar que 4 horas é considerado o tempo mínimo para a inoculação do vírus pelo ácaro em citros.

As plantas foram avaliadas diariamente com o intuito de se observar o desenvolvimento de sintomas. A presença do CiLV-C em plantas sintomáticas foi comprovada por RT-PCR (LOCALI et al., 2003).

4.4 Instalação do experimento de *time course* para a análise da interação ácaros/CiLV-C/*A. thaliana*

O experimento biológico principal, instalado para as análises de expressão gênica, contou com três tratamentos: plantas infestadas com ácaros virulíferos (V), plantas infestadas com ácaros avirulíferos (AV) e plantas sadias, não infestadas (S). Para cada tratamento, foram utilizadas 20 plantas. Os tratamentos de infestação

contaram com 15 ácaros por planta, sendo depositados cinco ácaros em cada uma das três folhas infestadas. Além disso, foram mantidas outras seis plantas infestadas com ácaros virulíferos e deixadas até o aparecimento dos sintomas, como controle da inoculação viral.

Foram instalados, em câmara de crescimento com as condições controladas anteriormente descritas, quatro experimentos com este desenho, sendo um para cada tempo do *time course*: 6 hai, 12 hai, 24 hai, e sintomas. O tempo inicial de 6 hai foi definido após o teste prévio de eficiência de transmissão do vírus pelo vetor. Os tempos 12 hai e 24 hai foram selecionados como os mais interessantes, por resultarem em um maior número de respostas, em um estudo de transcriptoma em plantas de citros infestadas com o CiLV-C (KUBO, 2011). O tempo sintomas foi definido em função da fenologia das plantas infestadas com ácaros virulíferos: todas apresentaram sintomas iniciais de leprose no momento da coleta das folhas. O desenho experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado.

Folhas provenientes de duas plantas foram agrupadas em um pool, formando assim uma repetição biológica, totalizando dez repetições biológicas para cada tratamento. No momento das coletas, o material vegetal foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, e logo em seguida armazenado a -80ºC para posterior extração do RNA.

4.5 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração do RNA foi realizada a partir de 100 mg de folhas com o *RNeasy plant mini kit* (Qiagen), conforme recomendação do fabricante. Para evitar contaminações com DNA genômico, as amostras foram tratadas com *RNase-free DNase set* (Qiagen). O RNA total foi quantificado e avaliado quanto a sua pureza em um *NanoDrop ND-8000 spectrophotometer* (Thermo Scientific), e sua integridade foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 1,2%, após 5 min a 65°C seguido de 10 min no gelo para desfazer possíveis estruturas secundárias.

A síntese de cDNA foi realizada segundo instruções do manual do *Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) com a utilização de *primers oligo-dT* (Fermentas), a partir de 500 ng do RNA total. O cDNA obtido foi diluído em água estéril e livre de RNAses na proporção de 1:25 para as análises por RT-qPCR.

Todo o material utilizado foi previamente tratado com DEPC (dietilpirocarbonato), com o intuito de inativar RNAses, e esterilizado em autoclave.

4.6 Detecção do CiLV-C mediante RT-qPCR

A presença do CiLV-C nas plantas utilizadas no experimento de *time course* foi verificada por RT-qPCR, utilizando-se o sistema TaqMan, através de um conjunto de primers e sonda que detecta região do gene da putativa capa proteica do vírus (*p29*, Figura 3). Os primers e sondas foram desenhados através do *software Primer-Express* (*Life Technologies*) (Tabela 6).

As RT-qPCR foram realizadas utilizando-se 5 µL de *TaqMan® Fast Universal PCR MasterMix 2X* (*Life Technologies*), 0,5 µL do conjunto de primers e sonda, 1,5 µL de cDNA diluído e 3 µL água para um volume final de 10 µL em um equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Life Technologies*). As reações para cada par de primer foram feitas em triplicatas e incluíram três brancos (reações sem cDNA) para verificar a presença de contaminações.

Tabela 6 - Sequência de primers e sondas utilizados na detecção do CiLV-C e do gene normalizador *SAND* por RT-qPCR .

Gene		Sequência (5`-3`)	Marcação
p29 **(CiLV-C)**	*Forward*	ACCCTATGCACTGCCTGATTTT	-
	Reverse	TTCGTTAACAGCAACCAAATCCT	-
	Sonda	AGGTGATGGAAGCTT- MGBNFQ	VIC
SAND **(*Arabidopsis thaliana*)**	*Forward*	GCGTGGTTGCCTGGAAAA	-
	Reverse	TTCTTCCTCTTTCTCCATGACGTA	-
	Sonda	TGTTGATGAGGATGATGC- MGBNFQ	NED

A eficiência de amplificação e os valores de CT foram calculados para cada reação individual de PCR utilizando-se o software *Real-time PCR Miner* (ZHAO; FERNALD, 2005). Em posse dos dados gerados, para cada gene foi calculada uma única eficiência, dada pela eficiência média de todas as qPCR, e para cada repetição biológica foi calculado um único valor de CT, dado pela média de valores de CT das três repetições técnicas. Os valores de CT foram transformados em quantidades relativas, atribuindo-se o valor de um para a amostra com maior carga viral (menor CT). Os dados foram normalizados com os valores de quantidade relativa obtidos para o gene *SAND*. A expressão do gene *SAND* em plantas de *A.*

thaliana infectadas com o CiLV-C foi previamente identificada como estável neste trabalho .

Em adição à simples detecção do vírus, foi feita uma análise estatística para comparar a quantidade (relativa) de vírus nos diferentes tempos avaliados. Para tanto, foi feita uma média das réplicas biológicas (plantas infestadas com ácaros virulíferos) de cada tempo e tais valores foram comparados par-a-par por meio de testes *t de Student*.

4.7 Seleção dos genes para as análises de trancriptômica durante a interação ácaros/CiLV-C/ *A. thaliana*

A seleção dos genes para análise através de RT-qPCR foi realizada com base em conhecimento prévio de sua possível relação com respostas de defesa. Para tanto, foi feita uma busca por trabalhos de interação planta-patógeno na literatura, principalmente associados à resposta de *A. thaliana* a vírus pertencentes a diversas famílias.

Em geral, foram selecionados genes fundamentais das vias de SA, JA/ ET, além de silenciamento de RNA. Como os vírus de RNA tipicamente ativam a via de SA (WHITHAM et al., 2003), optou-se por selecionar um maior número de genes associados a esta via. Foi tomado o cuidado de se escolher genes com atuação em pontos distintos de cada via (*upstream* e *downstream* às sinteses dos hormônios, por exemplo), com o intuito de se obter maior robustez na análise. Além dos genes associados à resposta de defesa, foram também selecionados alguns para a normalização dos dados de RT-qPCR.

4.7.1 Seleção e validação de primers

Realizou-se uma busca na literatura especializada para selecionar primers correspondentes a cada um dos genes elegidos. Estes primers foram verificados quanto à sua especificidade através do algoritmo BLAST, analisando-se se o pareamento total ocorria apenas com o gene de interesse, o qual deveria aparecer com o menor E-value, e se este valor estava distante dos correspondentes aos demais genes encontrados no pareamento. Adicionalmente, os primers foram triados

de acordo com a sua finalidade, impacto do periódico no qual foram publicados e número de vezes em que foram utilizados.

Os primers sintetizados foram primeiramente validados por PCR convencional, sendo avaliados quanto à amplificação de sequências de cDNA obtido a partir de RNA total extraído de *A. thaliana* Col-0. Foram testadas diferentes concentrações de primers, temperaturas de anelamento, número de ciclos e tempo de extensão. Desta forma, as PCR consistiram de 1X tampão de reação, 1,8 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP mix, 1U *Taq* DNA polymerase (Fermentas), 0,4µM ou 0,2µM dos primers *forward* e *reverse*, e água Milli-Q completando o volume para 25 µL. As condições de amplificação foram de 1 ciclo de 94°C por 2 minutos, 30 ou 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C ou 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 ou 20 segundos, com 1 ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos. A visualização dos produtos amplificados foi feita em gel de agarose 2%, formulado com TAE 1X e brometo de etídio, sob luz UV. As reações para cada par de primer foram feitas em duplicatas e incluíram um branco (reação sem cDNA), como controle de amplificações inespecíficas e contaminações.

Após validação por PCR convencional, os primers validados foram testados por PCR quantitativo (qPCR). As amplificações foram realizadas utilizando-se 10 µL de GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 3 µL de cDNA (obtido a partir de RNA total de *A. thaliana* Col-0 e diluído em 1:25), 0,4 µM ou 0,2 µM de cada *primer* e volume final de 25 µL em um equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Life Technologies*). As condições térmicas de ciclagem foram de: 1 ciclo de 50°C por 2 min, 1 ciclo de 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Para cada reação foi realizada uma curva de dissociação com o intuito de verificar possíveis contaminações e reações inespecíficas. As reações para cada par de primer foram feitas em triplicatas e incluíram três brancos (reações sem cDNA) para verificar a presença de amplificações inespecíficas e contaminações. Os produtos amplificados foram também visualizados em gel de agarose 2% para confirmar a presença de bandas do tamanho esperado.

4.7.2 Avaliação de genes normalizadores

Em função da necessidade de se obter genes de referência comprovadamente estáveis em plantas de *A. thaliana* desafiadas com o vírus da leprose dos citros C, para fins de normalização dos dados de RT-qPCR (tópico 2.4.1), foi realizada uma avaliação de diferentes genes utilizados como normalizadores.

Como candidatos selecionou-se os genes *EF1α* (At5g60390), *F-Box* (At5g15710), *GAPDH* (AT1G13440), *SAND* (At2g28390), *PPR* (AT5G55840) e *TIP41* (AT4G34270). Eles foram previamente identificados como estáveis em três trabalhos com plantas de *A. thaliana* sob diferentes tipos de estresse (CZECHOWSKI et al., 2005), *A. thaliana* infectadas por vírus distintos (LILLY et al., 2011) e *Citrus* spp. desafiadas por diferentes patógenos, incluindo o CiLV-C (MAFRA et al., 2012).

Os níveis de expressão e estabilidade dos genes candidatos foram avaliados sob os três tratamentos considerados no estudo do patossistema leprose: plantas infestadas com ácaros virulíferos, plantas infestadas com ácaros avirulíferos e plantas não-infestadas. Cada tratamento contou com três repetições, sendo cada uma obtida a partir da extração de RNA total e posterior síntese de cDNA de um pool de duas plantas de *A. thaliana* Col-0. As amostras foram testadas por RT-PCR com primers para o gene que amplifica parte da proteína de movimento do vírus (LOCALI et al., 2003), com o intuito de confirmar a presença ou ausência do vírus.

Foram realizadas análises de RT-qPCR, de acordo com a metodologia descrita no tópico abaixo, com três replicatas técnicas para cada amostra. A estabilidade de expressão dos genes nas amostras testadas foi estatisticamente avaliada através do algoritmo geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), que calcula para cada gene um valor de estabilidade de expressão (M), no *software GenEx version 5.0.1.5* (www.multid.se). Este algoritmo baseia-se no princípio de que o raio de expressão de dois genes de referência ideais deve ser idêntico em todas as amostras testadas, independentemente do tipo celular ou condições experimentais, de forma que qualquer variação nos raios de expressão sugere instabilidade de um ou ambos os genes candidatos. Considerando um grupo de genes, a estabilidade de cada um (M) pode ser determinada por comparações par-a-par com todos os outros genes avaliados e subsequente o cálculo da média geométrica dos desvios padrão

dos raios de expressão (transformados em escala log). Um menor valor de M indica uma maior estabilidade do gene.

4.8 Análises de expressão gênica por RT-qPCR

As qPCR foram realizadas utilizando-se 10 µL de *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega), 3 µL de cDNA diluído (1:25), 100 ou 200 nM de cada primer e água para um volume final de 25 µL em um equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Life Technologies*). As condições térmicas de ciclagem foram de: 1 ciclo de 50°C por 2 min, 1 ciclo de 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Para cada reação, foi realizada uma curva de dissociação com o intuito de verificar possíveis contaminações e reações inespecíficas. As reações para cada par de primer foram feitas em triplicatas e incluíram três brancos (reações sem cDNA) para verificar a presença de amplificações inespecíficas e contaminações. A eficiência de amplificação e os valores de CT foram calculados para cada reação individual de PCR utilizando-se o software *Real-time PCR Miner* (ZHAO; FERNALD, 2005), o qual utiliza um algoritmo implementado em três etapas:

i) ajuste de uma curva sigmóide de acúmulo de DNA para cada reação de PCR, a partir dos dados brutos de fluorescência plotados como uma função dos ciclos de PCR, na qual é definida a fase exponencial da reação.

ii) estimação da eficiência da reação, utilizando-se uma regressão não-linear para se determinar eficiências candidatas dentro da fase exponencial da curva, seguida de uma média ponderada destas candidatas para computar uma eficiência final da reação.

iii) determinação do CT, referente a um ponto característico presente na fase exponencial: o ponto máximo da segunda derivada da curva, selecionado como o ponto mais conveniente por estar geralmente confinado em uma zona com uma eficiência constante.

Em posse dos dados gerados, para cada gene foi calculada uma única eficiência, dada pela eficiência média de todas as PCR, e para cada repetição biológica foi calculado um único valor de CT, dado pela média de valores de CT das três repetições técnicas. Os resultados foram analisados através de um método

derivado do $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), distinto deste por incluir o valor real de eficiência do gene, e não considerar a mesma como sendo 100%.

Nesta análise, os valores de CT foram transformados em quantidades relativas através da função $Q = E^{\Delta CT}$, atribuindo-se o valor de 1 para a amostra com maior nível de expressão. *Q* é a quantidade relativa à amostra com maior expressão (menor CT), *E* é a eficiência de amplificação (sendo o valor 2 correspondente à eficiência de 100%) e ΔCT a diferença entre o menor CT e o CT da amostra em análise.

Os valores das quantidades relativas foram normalizados com os dados de três genes de referência - *FBOX* (At5g15710), *TIP41* (AT4G34270) e *SAND* (At2g28390) – identificados como os mais estáveis nos três tratamentos em teste pelo algoritimo geNorm (conforme descrito no tópico 5.8, abaixo). Para tanto, foi calculado um fator de normalização, dado pela média geométrica das quantidades relativas obtidas para os três normalizadores. O nível de expressão de cada amostra foi dado pela razão entre a quantidade relativa da amostra e o fator de normalização apropriado.

Por fim, foram calculados os valores de *foldchange* de cada tratamento (V ou AV) em relação ao controle sadio (S), dados pela razão entre os níveis de expressão das repetições biológicas de cada tratamento em relação aos do controle. Quanto às análises estatísticas, foi realizado um teste F (*one-way* ANOVA) para comparar as médias de expressão de cada gene entre os três tratamentos. No caso de um teste F significativo, foi utilizado um test *t de Student* par-a-par, para comparar as médias de expressão entre as possíveis combinações de dois tratamentos.

Alguns genes, no entanto, não puderam ser analisados através da metodologia descrita, pois apresentaram um nível de expressão acentuadamente baixo nas plantas controle não tratadas. Tais níveis estão no limite de detecção do ensaio e, portanto, para estas amostras não foi possível o ajuste da curva exponencial de amplificação. Consequentemente, não foram determinados valores de CT, impossibilitando uma comparação relativa (obtenção de valores de *foldchange*) às amostras infestadas com ácaros. Para estes casos, foi considerado que não houve amplificação do gene nas amostras sadias e, embora não seja possível aplicar a análise estatística devido à ausência de valores de CT, o resultado foi considerado como altamente significativo, visto que ficou evidente a

especificidade de amplificação dos genes nos tratamentos de infestação com ácaros.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Populações de ácaros *B. phoenicis*

Antes deste trabalho, populações de ácaros avirulíferos eram normalmente mantidas sobre frutos sadios de laranja doce. Visto que a laranja doce é altamente suscetível ao CiLV-C e buscando evitar possíveis contaminações da população avirulífera de *Brevipalpus*, neste trabalho estes frutos foram substituídos por frutos de lima ácida “Tahiti”, resistente ao vírus. Houve um excelente desenvolvimento dos ácaros nos frutos de lima ácida, sendo observadas grandes quantidades de ovos após duas semanas, e de ácaros em todas as suas fases de desenvolvimento nos períodos seguintes (dados não mostrados).

Através da RT-PCR, foi possível detectar o gene da proteína de movimento do CiLV-C nos ácaros da população virulífera, mas não nos da avirulífera, assegurando assim o desenvolvimento das duas populacões de *B. phoenicis* requeridas para os experimentos de interação planejados.

5.2 Eficiência de inoculação de CiLV-C em *A. thaliana*

Como a maioria dos processos biológicos são dinâmicos, experimentos de *time course* são ideais ao seu entendimento e, portanto, têm se tornado fundamentais para o estudo dos mesmos (BAR-JOSEPH et al., 2012). No entanto, a escolha dos tempos a serem avaliados deve ser criteriosa, de forma a permitir a obtenção de dados relevantes e informativos. Em experimentos de resposta a estresse, deve ser dada atenção aos tempos iniciais, visto que uma vasta gama de trabalhos tem mostrado que a resposta transcricional frequentemente ocorre neste período (BAR-JOSEPH et al.., 2012).

No contexto do patossistema leprose, o tempo inicial a ser avaliado é considerado o mais crítico, devido à necessidade de se assegurar que de fato já houve a inoculação do vírus pelo vetor. Em laranja doce, os períodos mínimos necessários para a aquisição e inoculação do CiLV-C pelo ácaro são de, respectivamente, quatro e uma hora após a infestação (hai) (BASTIANEL et al., 2008a). De maneira similar, em feijão os períodos necessários para ambos os processos, aquisição e inoculação, são de quatro hai (GARITA, 2013).

Visando assegurar que todas as plantas estivessem infectadas no tempo inicial do *time course*, foi feita uma avaliação da eficiência de inoculação do vírus pelo ácaro em dois tempos candidatos: 4 hai e 6 hai. Os ácaros *B. phoenicis* virulíferos foram depositados em plantas de Arabidopsis e retirados das mesmas após os períodos citados. As plantas foram avaliadas diariamente com o intuito de se verificar o aparecimento de sintomas.

As plantas de Arabidopsis, infestadas com quatro semanas de cultivo, foram mantidas e avaliadas por seis semanas após a infestação. Em todas as plantas que apresentaram sintomas, o aparecimento dos mesmos se deu de seis a dez dias após a infestação. As plantas que não apresentaram sintomas dentro deste período também não o fizeram durante toda a avaliação, o que comprova que elas de fato não receberam o vírus. A presença do CiLV-C foi confirmada por RT-PCR. Apenas 30% das plantas nas quais os ácaros foram mantidos por 4 horas apresentaram sintomas de leprose, em contraste com 100% das plantas nas quais os ácaros foram mantidos por 6 horas (Tabela 2). Observa-se que os ácaros, tendo adquirido previamente o CiLV-C, são capazes de transmitir o vírus com apenas 4 horas de alimentação. No entanto, quanto maior o período de inoculação, mais eficiente parece ser a transmissão. Estes dados estão condizentes com os obtidos para feijão (GARITA, 2013), no qual o período mínimo necessário para a inoculação do CiLV-C foi de quatro horas, e laranja doce (BASTIANEL et al.., 2008a), no qual o percentual de plantas com sintomas foi proporcional ao período de alimentação dos ácaros.

Tabela 2 – Transmissão de CiLV-C por cinco ácaros *B. phoenicis* para cada planta de *A. thaliana* após diferentes períodos de inoculação (horas após a infestação, hai, em que os ácaros foram mantidos nas plantas).

Período de inoculação	Plantas testadas (n)	Plantas com sintomas (n)	Eficiência de inoculação (%)
4 hai	10	3	30
6 hai	10	10	100
Controle*	10	10	100

* Controle de inoculação, no qual os ácaros virulíferos foram mantidos nas plantas durante toda a avaliação.

Embora seja possível transmitir o vírus em 4 hai, neste período de tempo a eficiência de inoculação ainda é baixa, enquanto em 6 horas tem-se uma eficiência máxima. Diante destes dados, foi escolhido o tempo de 6 hai como tempo inicial do *time course*.

5.3 Experimento para a avaliação da interação ácaros/CiLV-C/*A. thaliana*

Para averiguar a ativação de diferentes vias de defesa em resposta à leprose dos citros, plantas de *A. thaliana* foram infestadas com ácaros virulíferos (V), avirulíferos (AV) ou mantidas não infestadas (S). Folhas infestadas foram coletadas 6 hai, 12 hai, 24 hai e após o aparecimento dos sintomas (tempo “sintomas”).

Foi obtido sucesso no experimento biológico, visto que 100% das plantas infestadas com ácaros virulíferos no tempo sintomas desenvolveram sintomas típicos de leprose, assim como todas as seis plantas deixadas como controle. Os sintomas apareceram de seis a oito dias após a infestação, manifestando-se sob a forma de pontos cloróticos em folhas verdes, os quais em seguida formaram lesões localizadas verdes em folhas senescentes. Foi possível também observar danos nas plantas infestadas com ácaros avirulíferos. Tais plantas adquiriram uma coloração escura, manifestada cerca de uma semana após a infestação, não observada nas plantas não infestadas, as quais permaneceram verdes (Figura 9). Este dano possivelmente representa uma resposta ao estresse causado pela alimentação dos ácaros sobre as plantas infestadas. A coleta das folhas AV foi realizada oito dias após a infestação, em correspondência com o tempo sintomas da infeção pelo CiLV-C.

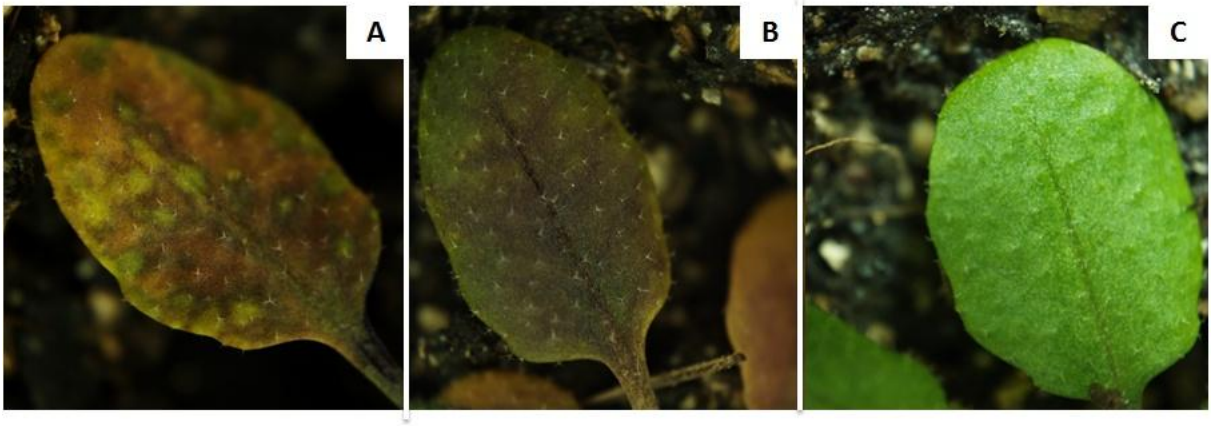

Figura 9 - Aspecto de folha infestada com ácaros virulíferos que portam CiLV-C, onde podem ser observadas lesões circulares características de leprose (A), folha infestada com ácaros avirulíferos, observando-se apenas a coloração escura (B), e folhas não infestadas completamente sadias (C)

Nos tempos iniciais (6, 12 e 24 hai), as plantas dos três tratamentos mantiveram-se com as folhas verdes, de maneira similar à planta sadia observada na Figura 9, Quadro C. No caso do tratamento com ácaros virulíferos, a fenologia

era esperada, visto que nestes curtos períodos de tempo ainda não é possível observar o aparecimento de sintomas de leprose em *A. thaliana*.

5.4 Qualidade do RNA extraído das plantas

As folhas provenientes de duas plantas submetidas às mesmas condições experimentais foram agrupadas, formando um pool (totalizando dez pools por tratamentos). Após a preparação do RNA das mesmas, foi feita uma análise qualitativa (verificação de pureza e integridade) e quantitativa (quantificação de RNA) dos extratos resultantes.

Considera-se um RNA de boa qualidade aquele com a relação $A_{268/280}$ de 1,8 a 2,2. Esta relação avalia a presença de contaminantes que absorvem a 280 nm, como proteínas, os quais podem inibir as reações posteriores de cDNA e qPCR. Em relação à quantificação, era desejável um mínimo de 500 ng (25 ng/ µL), quantidade necessária à síntese de cDNA, de forma a obter material suficiente para todas as reações posteriores. Todos as amostras mostraram relação $A_{268/280}$ dentro da faixa desejada e valores muito superiores a 500 ng.

Quanto à análise de integridade (Figura 10), as amostras mostraram as duas bandas esperadas, correspondentes aos RNAs ribossomais 16S e 28S. Além disso, não foram observadas bandas mais altas, indicando a ausência de contaminação com DNA genômico.

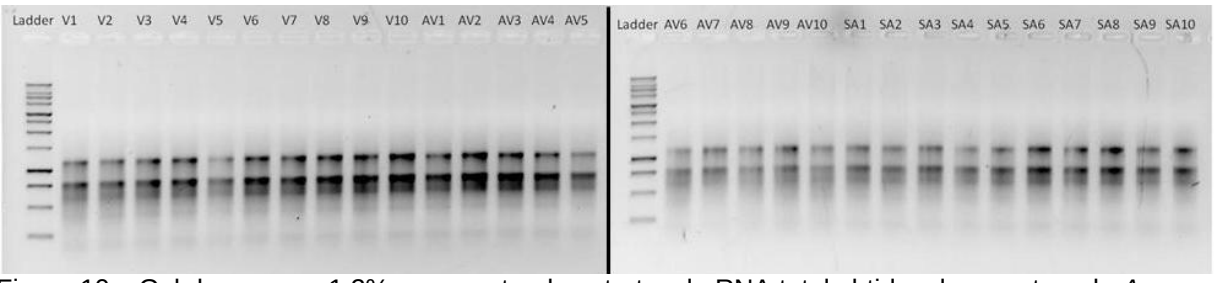

Figura 10 – Gel de agarose 1,2% representando extratos de RNA total obtidos de amostras de *A. thaliana* em um dos tempos do *time course*. Todas as demais amostras apresentaram o mesmo padrão eletroforético. V (1-10): plantas infestadas com ácaros virulíferos; AV (1-10): plantas infestadas com ácaros avirulíferos; SA (1-10): plantas sadias não infestadas

Todos os RNAs obtidos foram considerados satisfatórios quanto à pureza, rendimento e integridade para as análises de RT-qPCR.

5.5 Presença de CiLV-C nas plantas infestadas com ácaros virulíferos

A manifestação de sintomas de leprose em plantas infestadas com ácaros virulíferos torna direta a verificação da presença do CiLV-C. No entanto, nos tempos iniciais considerados no *time course* (6, 12 e 24 hai) ainda não é possível observar a presença de sintomas, o que impede a identificação da presença do vírus pela simples análise visual. Portanto, para confirmar que as plantas foram de fato infectadas pelo CiLV-C, é necessária uma análise molecular. Esta foi feita por RT-qPCR utilizando o sistema de detecção *TaqMan* (*Life Technologies*), o qual tem sido extensivamente utilizado para fins de diagnóstico, em função da sua especificidade de amplificação. Foram utilizados primers e sonda desenhados de forma a amplificar parte do gene que codifica para a proteína putativa do capsídeo viral (p29).

Como resultado, foi possível confirmar a presença do CiLV-C em todas as plantas infestadas com ácaros virulíferos (Figura 11). Destaca-se a sensibilidade da técnica, visto que foi possível a detecção do vírus nos tempos iniciais, nos quais o título viral é acentuadamente baixo.

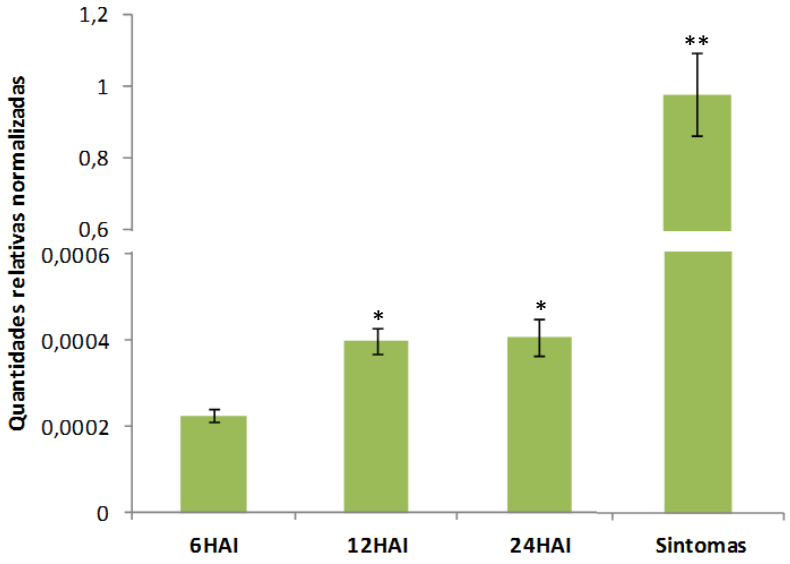

Figura 11 - Acúmulo de CiLV-C em plantas de *A. thaliana* ao longo do *time course*, dado pela quantificação de uma região do gene que codifica para a proteína p29 do vírus. Os valores estão representados em quantidades relativas normalizadas com o gene *SAND* de *A. thaliana*

A comparação estatística das amostras analisadas nos diferentes tempos de coleta mostra que há aumento significativo na concentração viral de 6 hai a 12 hai, porém não de 12hai a 24hai. De 24 hai ao aparecimento de sintomas, há um

incremento extremo da quantidade de vírus. Para que seja avaliada a curva de acúmulo de CiLV-C durante o processo de infecção de *A. thaliana* é necessário, portanto, uma análise da presença do vírus em tempos compreendidos entre 24 hai e sintomas.

5.6 Seleção dos genes marcadores de respostas de defesa

A seleção dos genes a serem avaliados foi feita a partir de uma busca na literatura por trabalhos de interação planta-patógeno, dando especial atenção àqueles envolvendo *A. thaliana* e diferentes viroses. Os genes foram escolhidos em função de sua participação nas principais vias de defesa: SA, JA/ET e silenciamento de RNA. Ademais, foram selecionados genes para a normalização dos dados de RT-qPCR (Tabela 3).

Tabela 3 - Genes selecionados para avaliar a resposta de *A. thaliana* à infestação por ácaros avirulíferos e aqueles portando CiLV-C, através de RT-qPCR. Para cada gene é mostrada a função ao qual está associado

Símbolo	Locus*	Nome	Função
AGO1.	AT1G48410	*Argonaute 1*	Silenciamento de RNA
AGO2.	AT1G31280	*Argonaute 2*	
DCL2	AT3G03300	*Dicer-like 2*	
DCL4	AT5G20320	*Dicer-like 4*	
HEN1	AT4G20910	*Hua enhancer 1*	
RDR6	AT3G49500	*RNA-dependent RNA poymerase*	
PAD4	AT3G52430	*Phytoalexin deficient 4*	Via de SA
EDS5	AT4G39030	*Enhanced disease susceptibility 5*	
ICS1	AT1G74710	*Salicylic acid induction deficient 2*	
NPR1	AT1G64280	*Nonexpresser of PR genes 1*	
TGA3	AT1G22070	*TGACG sequence-specific binding protein 3*	
WRKY70	AT3G56400	*WRKY DNA-binding protein 70*	
PR1	AT2G14610	*Pathogenesis-related gene 1*	
PR5	AT1G75040	*Pathogenesis-related gene 5*	
ETR1	AT1G66340	*Ethylene response 1*	Via de JA/ET
EIN2	AT5G03280	*Ethylene insensitive 2*	
JAR1	AT2G46370	*Jasmonate resistant 1*	
MYC2/JIN1	AT1G32640	*Jasmonate insensitive 1*	
PDF1.2	AT5G44420	*Plant defensin 1.2*	
EF1α	AT5G60390	*Elongation factor 1-α*	Normalização de dados
FBOX	AT5G15710	*F-box family protein*	
GAPDH	AT1G13440	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*	
PPR	AT5G55840	*Pentatricopeptide repeat superfamily protein*	
SAND	AT2G28390	*SAND family protein*	
TIP41	AT4G34270	*TIP41-like family protein*	

*Número de identificação do *locus* no bando de dados do TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*).

5.7 Seleção e validação de primers específicos para os genes marcadores

Os primers para amplificação dos genes selecionados foram obtidos na literatura. Em função da grande quantidade de estudos com *A. thaliana*, foram

encontrados vários primers para cada um dos genes em questão. Dentre estes, foram selecionados apenas aqueles específicos, que haviam sido desenhados para experimentos de RT-qPCR com sistema de detecção de repórteres intercalantes (o mesmo utilizado neste estudo) e preferencialmente publicados em revistas conceituadas ou utilizados em mais de um trabalho.

Após seleção, os primers foram avaliados por PCR e qPCR, sendo testados diferentes parâmetros de amplificação. Na validação por RT-PCR (figura 12) conferiu-se a geração de fragmentos de amplificação do tamanho esperado, e por RT-qPCR confirmou-se a especificidade de amplificação do gene pela presença de um único pico em curvas de dissociação. Não foram detectadas bandas ou curvas de amplificação nas reações controle, indicando ausência de contaminação e amplificações inespecíficas. A lista final de primers com suas respectivas sequências e tamanhos esperados de amplicons encontra-se na Tabela 4.

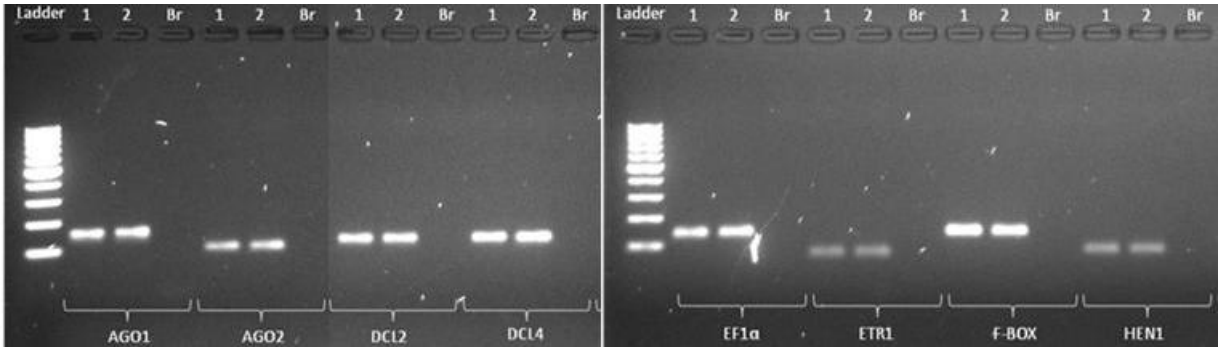

Figura 12 – Padrão eletroforético dos amplicons visualizados em gel de agarose 2% para oito pares de primers. As reações realizadas com os demais pares de primers apresentaram o mesmo padrão, sendo obtidas bandas únicas do tamanho esperado. (1,2): amplicons obtidos a partir de amostras de cDNA de plantas de A. thaliana; (Br): reações sem cDNA.

5.8 Avaliação de genes normalizadores para análises de RT-qPCR

Inicialmente, os genes selecionados como candidatos foram avaliados quanto ao seus níveis de expressão. Os valores médios de CT variaram de 23,98 para o gene *EF1α* a 36,01 para o *PPR* (Tabela 5, Figura 13). Em função dos dados obtidos para o *PPR* (CT>= 35), considerados de baixa confiabilidade, o gene foi excluído das análises posteriores. O baixo nível de expressão de *PPR* foi relatado em trabalhos anteriores em plantas de *A. thaliana* (LILLY et al., 2011) e *Nicotiana benthamiana* (LIU et al., 2012) infectadas com vírus distintos. A exclusão de genes com valores de CT acima de 35, incluindo o *PPR*, está de acordo com o descrito por

outros autores (LIU et al., 2012; LILLY et al., 2011). Os demais genes, com valores de CT inferiores a 35, foram portanto considerados adequados em relação ao seu nível de expressão.

Tabela 5. - Genes candidatos avaliados, com seus níveis de expressão e classificação de acordo com sua estabilidade de expressão (valor de M).

Gene	Locus	CT médio	Desvio padrão (σ)*	Valor de M	Classificação
FBOX	AT5G15710	30,46	0,29	0,18	1
TIP41	AT4G34270	28,15	0,31	0,18	1
SAND	AT2G28390	28,30	0,26	0,19	2
EF1α	AT5G60390	23,98	0,38	0,22	3
GAPDH	AT1G13440	30,19	0,71	0,34	4
PPR	AT5G55840	36,01	0,41	-	-

*Desvio padrão (σ) dos valores de CT, obtidos a partir de 27 reações de RT-qPCR, correspondentes a triplicatas de nove amostras pertencentes a três condições experimentais distintas.

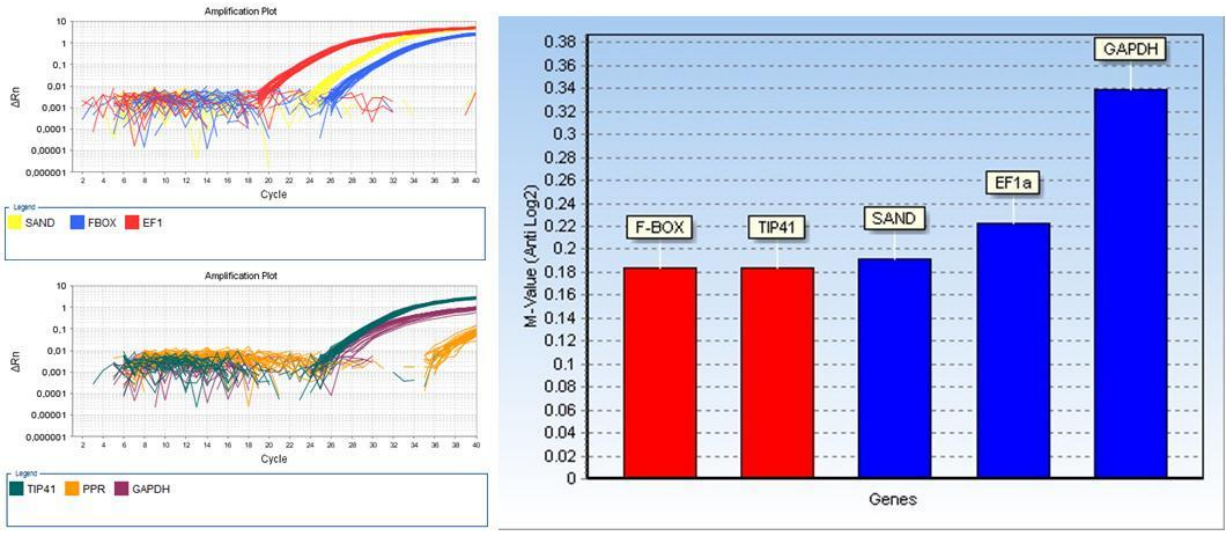

Figura 13 - Gráficos de amplificação por RT-qPCR dos genes candidatos a normalizadores (esquerda) e gráfico gerado pelo geNorm, comparando os valores de M obtidos (direita). As barras de cor vermelha indicam os genes com valor de M mais baixo; isto é, os melhores candidatos à normalização. O gene *PPR* foi excluído da análise de estabilidade em função de seu baixo acúmulo de transcritos.

Analisando-se unicamente os desvios nos valores de CT obtidos entre as amostras submetidas às diferentes condições experimentais (Tabela 5) é possível fazer inferências acerca da estabilidade de cada um dos genes candidatos. Observa-se que as menores variações ocorreram para os genes *SAND, FBOX* e *TIP41* (σ = 0,26, 0,29 e 0,31, respectivamente), enquanto o gene *EF1α* mostrou um valor intermediário (σ= 0,38) e o *GAPDH* teve a maior variação (σ= 0,71).

Tabela 4 – Primers selecionados para a RT-qPCR, com suas respectivas sequências, tamanhos de amplicons e referências das quais foram obtidos

Nome	Locus	*Forward* (5`-3`)	*Reverse* (5`-3`)	A (bp)	Referência
AGO1.	AT1G48410	TCTACAGGGATGGAGTCAGTGAGGG	AGCCTCGTGTGATGACGCTTCTG	148	Aelbrecht el al., 2006
AGO2.	AT1G31280	GATGGAGCCTTGAGTACACGACCT	AATGGACCGAGCGGTGGTGAAATC	135	Barrero et al., 2010
DCL2	AT3G03300	AATCTCTAGCAGGCGCGATA	TCACAGGATGCAACTTGACAG	120	Gutierrez et al., 2009
DCL4	AT5G20320	GGCATCCGAAATGAAGCTAA	CTTTCACTATTCCCGCCAAA	122	Gutierrez et al., 2009
EDS5	AT4G39030	CATCAGGTGATGGCTCAGAC	ACTAATCCAAGCGTGGCTCC	170	Wang et al., 2010b
EF1α	AT5G60390	CACCACTGGAGGTTTTGAGG	TGGAGTATTTGGGGGTGGT	137	Lilly et al., 2011
EIN2	AT5G03280	TCATGGCGATTTCGAAGGTCTG	AGGAAGCCCTAACAGAGCAACC	112	Brotman et al., 2012
ETR1	AT1G66340	TCCAAGACCATCGCTCTCAATCCA	CCTCGCCATCTCCAAGAGGTTTGT	70	Czechowski et al.,2004
FBOX	AT5G15710	GGCTGAGAGGTTCGAGTGTT	GGCTGTTGCATGACTGAAGA	140	Lilly et al., 2011
GAPDH	AT1G13440	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA	AAACTTGTCGCTCAATGCAATC	62	Brotman et al, 2012
HEN1	AT4G20910	TTCAATCAATGGGCATCAAA	ACTTCACCAGACCCACCAAC	80	Gutierrez et al., 2009
JAR1	AT2G46370	GTCATCACAAATTACGCAGGGTTG	TCTCTTTCGGTGTTCTTGTCGATG	149	Brotman et al., 2012
MYC2	AT1G32640	AGCAACGTTTACAAGCTTTGATTG	TCATACGACGGTTGCCAGAA	76	Anderson et al., 2004
NPR1	AT1G64280	GTCGGTGAGACTCTTGCCTC	CGAAGAGCGAAACTATATGACG	113	Kim et al., 2010
PAD4	AT3G52430	GGTTCTGTTCGTCTGATGTTT	GTTCCTCGGTGTTTTGAGTT	61	García et al.,2010
PDF1.2	AT5G44420	CTTGTTCTCTTTGCTGCTTTCGAC	TTGGCTCCTTCAAGGTTAATGCAC	140	López et al., 2011
PPR	AT5G55840	AAGACAGTGAAGGTGCAACCTTACT	AGTTTTTGAGTTGTATTTGTCAGAGAAAG	59	Czechowski et al., 2005
PR1	AT2G14610	GTGCCAAAGTGAGGTGTAACAA	CGTGTGTATGCATGATCACATC	120	Lindermayr et al., 2010
PR5	AT1G75040	ATGTGAGCCTCGTAGATGGTTAC	GATCCATGACCTTAAGCATGTCG	132	Lindermayr et al., 2010
RDR6	AT3G49500	AGAAACTCATCCCTCCCAACAG	CCAACTGCTCATTCGCCAAG	138	Aelbrecht el al., 2006
SAND	AT2G28390	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	61	Czechowski et al., 2005
ICS1	AT1G74710	GAGACTTACGAAGGAAGATGATGAG	TGATCCCGACTGCAAATTCACTCTC	188	Chen et al., 2009
TIP41	AT4G34270	GTGAAAACTGTTGGAGAGAAGCAA	TCAACTGGATACCCTTTCGCA	61	Czechowski et al., 2005
TGA3	AT1G22070	TCTCTTGAAGCAGAACCGTCGAG	TCTAACTGTTGAACATGGGCCTTC	140	Brotman et al., 2012
WRKY70	AT3G56400	GGAAGAAGACAATCCTCATCGT	CGTTTTCCCATTGACGTAACT	124	Von Saint Paul et al., 2011

Esta simples comparação de valores de CT, no entanto, não é suficiente para avaliar a estabilidade de expressão de genes de referência, sendo necessária uma análise estatística mais acurada, obtida pelo uso do geNorm. A análise de estabilidade de expressão no geNorm (Figura 13) revelou que todos os genes candidatos apresentam alta estabilidade de expressão, sendo o maior M obtido igual a 0,34 (*GAPDH*), valor este muito abaixo do limite de 1,5 sugerido de acordo com o uso do geNorm. Dentre os seis genes testados, os que apresentaram menor valor de M foram *F-BOX, TIP41* e *SAND*. Uma vez que um menor valor de M indica uma maior estabilidade, estes três genes foram considerados os mais estáveis nas condições testadas. Estes resultados corroboram o trabalho de Czechowski et al.. (2005), no qual os genes *SAND* e *TIP41* foram identificados entre os mais estáveis em *A. thaliana* submetidas a diferentes tipos de estresse, e os trabalhos posteriores de Lilly et al. (2011) e Mafra et al. (2012), que identificaram *F-BOX* e *SAND* entre os genes com maior estabilidade em *A. thaliana* infectadas por vírus, e *Citrus* spp. infectados por vírus e outros patógenos distintos, respectivamente. Os resultados obtidos mostram também que os dois *housekeeping genes* tradicionalmente utilizados para fins de normalização testados, *EF1α* e *GAPDH*, apresentaram a maior variabilidade no acúmulo de transcritos entre os genes candidatos. Esses genes foram escolhidos na era pré-genômica com base em seus papéis em processos celulares básicos. Entretanto, hoje existe um consenso de que o uso de tais genes de maneira arbitrária pode resultar em uma interpretação errônea dos resultados (GUTIERREZ et al., 2008; GUÉNIN et al.., 2009). A validação dos genes *FBOX, TIP41* e *SAND* como os mais estáveis, em detrimento aos *houskeeping genes EF1α* e *GAPDH*, mostra claramente que genes de referência tradicionais podem ser facilmente superados. Esta baixa estabilidade de *housekeeping genes* tradicionalmente utilizados em comparação a outros genes tem sido observada em diversos trabalhos (CZECHOWSKI et al., 2005, GUTIERREZ et al., 2008; MAFRA et al., 2012; MATTA et al., 2011; NICOT et al., 2005; REMANS et al., 2008).

Um gene de referência apropriado deve apresentar um acúmulo estável (M inferior a 1,5) em todas as condições experimentais testadas, e acumular em quantias moderadas (CT de 15 a 30) (WAN et al., 2010). Todos os cinco genes avaliados atenderam a estes dois pré-requisitos e portanto podem ser recomendados como genes de referência adequados em estudos de leprose dos citros em plantas de *A. thaliana*. Recomenda-se que a normalização seja feita com

múltiplos genes de referência e, idealmente, os três melhores genes avaliados devem ser utilizados (GUÉNIN et al., 2009; VANDESOMPELE et al., 2002). Portanto, *F-BOX, TIP41* e *SAND*, considerados os mais estáveis nas condições testadas, foram selecionados como normalizadores para as análises por RT-qPCR do presente trabalho.

5.9 Avaliação da resposta de *Arabidospis thaliana* à infestação com ácaros avirulíferos

Os resultados obtidos para as plantas infestadas com ácaros avirulíferos nos permitem identificar o comportamento da planta em relação à presença do ácaro vetor da leprose, uma vez que não há interferência do vírus e consequente sobreposição de respostas por eles induzidas. Desta forma, as considerações apresentadas neste tópico referem-se unicamente à interação *A. thaliana* – *Brevipalpus phoenicis*.

Observa-se que a resposta da planta ao *B. phoenicis* é estabelecida em tempos iniciais da infestação, visto que a maioria dos genes avaliados foi encontrada induzida logo no primeiro tempo avaliado, 6 hai. Um comportamento similar foi observado na resposta de Arabidopsis ao ácaro também tenuipalpídeo *Tetranychus urticae*, onde a maioria dos genes diferencialmente expressos foi identificada logo em 1 hai, persistindo no tempo de 6 hai, incluindo aqueles envolvidos nas vias de JA, ET e SA (ZHUROV et al., 2014).

5.9.1 Via de SA

Em resposta ao ácaro *Brevipalpus phoenicis*, foi possível observar uma ativação da via de ácido salicílico (SA), visto que todos os genes avaliados (*PAD4, SID2, EDS5*, *NPR1*, *WRKY70, TGA3*, *PR1* e *PR5*) foram encontrados induzidos nas plantas infestadas. A maior parte dos genes mostraram-se induzidos em todos os tempos do *time course* (Figura 14).

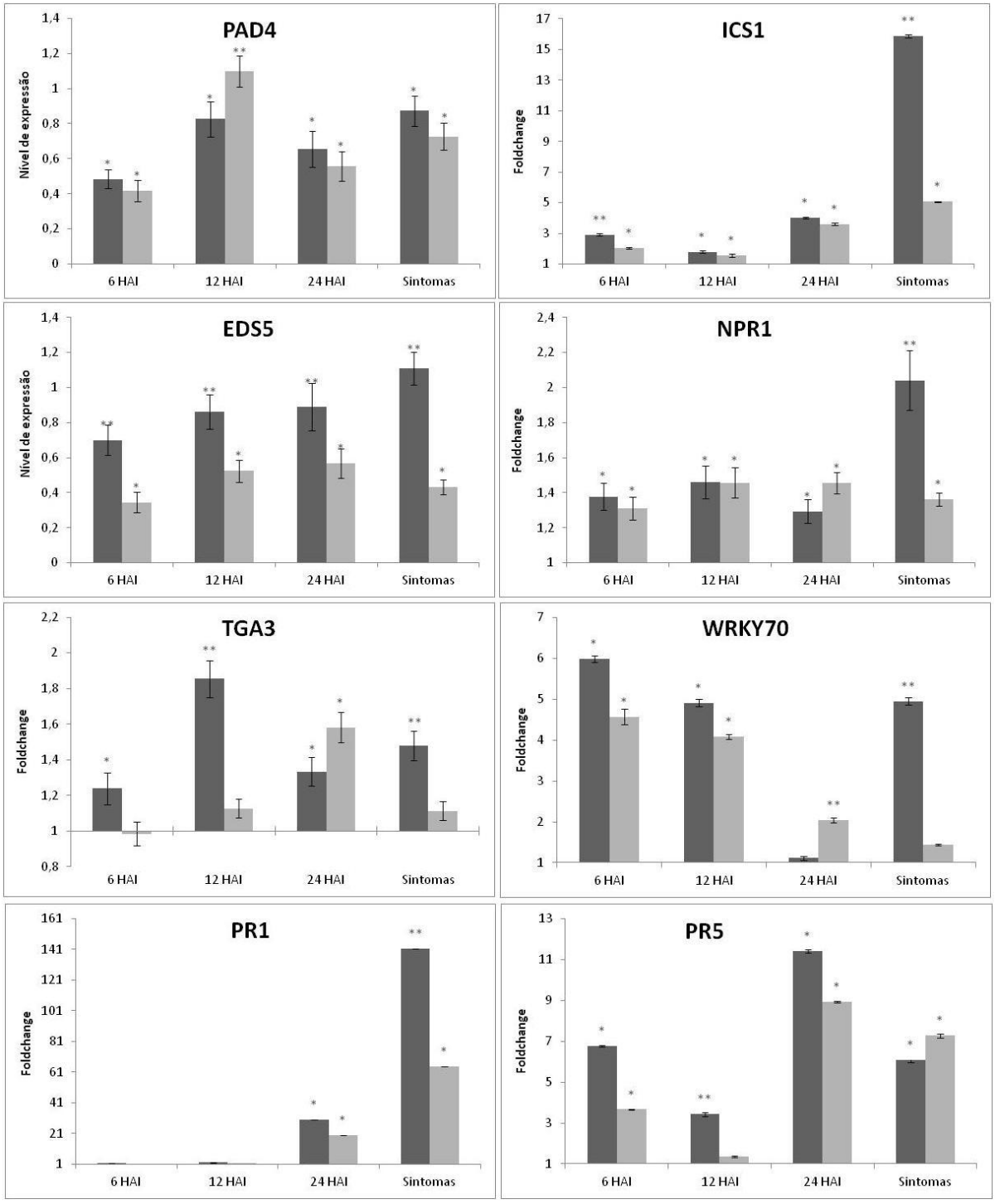

Figura 14 - Padrões de expressão dos genes associados à via de SA em plantas de *A. thaliana.* Em cinza escuro, plantas infestadas com ácaros virulíferos. Em cinza claro, plantas infestadas com ácaros avirulíferos. Para *EDS5* e *PAD4*, estão representados os níveis de expressão normalizados, visto que não houve amplificação nas amostras sadias (plantas não-infestadas). Para os demais genes, estão representados os valores de *foldchange* em relação ao controle não-infestado (foldchange = 1). * Diferença (α = 0,05) entre as plantas infestadas em referência às não-infestadas. ** Diferença (α = 0,05) entre plantas infestadas com ácaros virulíferos e avirulíferos

O gene *PAD4* codifica uma proteína similar a lipases triacil-glicerol, que representa uma importante moduladora da resistência contra distintos patógenos biotróficos (GLAZEBROOK, 2005; ASCENCIO-IBÁÑEZ et al., 2008). Nesta interação, a PAD4 promove a sinalização para a síntese de SA, contribui para a ETI mediada pelo reconhecimento do patógeno por proteínas R e atua na ativação da SAR (FEYS et al., 2001; RUSTÉRUCCI et al., 2001; RIETZ et al., 2011; LOUIS et al., 2012). Além de seus bem descritos papéis na resposta a patógenos, a PAD4 atua diretamente na resposta contra herbívoros, em uma ação totalmente independente de SA e portanto distinta de suas atividades de resistência contra patógenos (PEGADARAJU et al., 2005, 2007).

Para exercer estas funções a PAD4 adota formas moleculares diferentes e participa em mecanismos distintos (LOUIS et al., 2012; BOATWRIGHT; PAJEROWSKA-MUKHTAR, 2013). Interagindo fisicamente com a EDS1, a PAD4 forma um complexo que se acumula no núcleo e citoplasma de células foliares e sinaliza para a produção de SA. O acúmulo leva à expressão de genes de defesa na resistência basal contra patógenos (FEYS et al., 2005; RIETZ et al, 2011). Em conjunto com a EDS1, ambas as proteínas dissociadas ativam HR em uma resposta de ETI mediante o reconhecimento de patógenos por proteínas TIR-NB-LRR (RUSTÉRUCCI et al., 2011; RIETZ et al., 2011). Independente de EDS1 e do acúmulo de SA, a PAD4 atua na resistência contra herbívoros, promovendo a antixenose (detém a colonização e alimentação pelo herbívoro) e a acumulação de um fator de antibiose (prejudica o crescimento, desenvolvimento e reprodução do herbívoro) (LOUIS et al, 2012). Nesse sentido, a PAD4 é requerida para a resistência ao pulgão *Myzus persicae.* Os transcritos de PAD4 se acumulam após a alimentação do pulgão e a proteína regula o metabolismo celular para diminuir a susceptibilidade ao afídeo (PEGADARAJU et al., 2005; LOUIS et al., 2012). De maneira similar, os transcritos de PAD4 se acumulam em resposta à mosca-branca *Bemisia tabaci*; no entanto, a PAD4 não influencia o desenvolvimento da mesma, visto que plantas mutantes e selvagens para este gene apresentam taxas similares de desenvolvimento populacional do inseto (KEMPEMA et al., 2007). Em resposta ao *B. phoenicis*, em relação ao controle não infestado, foi possível observar um acúmulo de transcritos de *PAD4* em todos os tempos do *time course* quando comparados com as plantas não infestadas. A indução de *PAD4* em resposta ao ácaro pode estar envolvida na ativação da biossíntese de SA, conforme

frequentemente observado em interações com patógenos, ou em uma resposta à herbivoria independente de SA.

A proteína ICS1 apresenta uma atividade isocorismato sintase, catalisando a formação de isocorismato a partir do corismato, que por sua vez é convertido em SA pela enzima IPL (*isochorismate pyruvate lyase)*. A maior parte do SA acumulado em respostas de defesa de plantas (~90%) é sintetizado através da via mediada pela ICS1, visto que a produção de SA é drasticamente reduzida em plantas mutantes para esta proteína. Esta observação foi confirmada em espécies de plantas distintas (VERBENE et al., 2007; CATINOT et al., 2008). Bioquimicamente, o SA pode também ser sintetizado por outra via, mediada pela enzima PAL, responsável pela produção dos ~10% restantes (WILDERMUTH et al., 2001; FU; DONG, 2013).

A síntese de SA pela ICS1 ocorre no cloroplasto (STRAWN et al., 2007; FRAGNIERE et al., 2011), sendo necessário o transporte do hormônio ao citoplasma para que ele de fato atue sobre processos celulares distintos. Recentemente, foi demonstrado que este transporte é mediado pela proteína EDS5 (SERRANO et al., 2013), um transportador membro da família MATE (*multidrug and toxin extrusion*) (NAWRATH et al., 2002) localizado na membrana do cloroplasto (SERRANO et al., 2013). Inicialmente, a EDS5 foi descrita como envolvida na biossíntese de SA, possivelmente transportando intermediários do SA para o processo (NAWRATH et al., 2002), tendo em vista o decréscimo na síntese de SA em mutantes para esta proteína (SERRANO et al., 2013). Esta perda da síntese de AS em mutantes *eds5* pode ser explicada por um hipotético mecanismo de *feedback* autoinibitório. Na ausência da proteína transportadora, o SA acumula-se no cloroplasto e possivelmente inativa sua própria biossíntese por um feedback negativo ainda não-caracterizado (SERRANO et al., 2013).

Ambos os genes envolvidos no acúmulo de SA, *ICS1* e *EDS5*, foram encontrados induzidos na interação com ácaros *B. phoenicis* em todos os tempos do *time course*. A indução na expressão destes genes foi também observada na interação de Arabidopsis com os herbívoros *B. tabaci* (KEMPEMA et al., 2007) e *T. urticae* (ZHUROV et al., 2014). Em resposta ao *T. urticae*, a expressão de ambos os genes considerados segue um padrão estreitamente similar ao observado em resposta *ao B. phoenicis*: em ambos os trabalhos, o acúmulo de transcritos de tais genes inicia-se em 6 hai e permanece nos tempos seguintes de 12 e 24 hai.

Downstream ao acúmulo de SA e recentemente identificada como um receptor do hormônio (WU et al., 2012), a proteína NPR1 surge como o principal regulador transcricional da via, sendo responsável por controlar cerca de 95% dos genes dependentes de SA (WANG et al., 2006). Neste contexto, a NPR1 está envolvida na resistência basal, ETI e SAR, bem como no *cross-talk* entre as vias de SA e JA/ET (BOATWRIGHT; PAJEROWSKA-MUKHTAR, 2013).

Em células não infectadas, a NPR1 é sequestrada no citoplasma sob a forma de um complexo oligomérico de alto peso molecular, estabilizado através de ligações intermoleculares dissulfito entre resíduos de cisteínas (KINKEMA et al., 2000; MOU et al., 2003). O aumento na concentração celular de SA como resultado do reconhecimento de um agressor leva a alterações no estado de oxidoredução celular, o que elicita a redução das cisteínas por proteínas tioredoxinas (MOU et al., 2003; TADA et al., 2008). A consequente quebra das pontes dissulfito, no entanto, não parece ser suficiente para liberar os monômeros de NPR1, como antes proposto. Possivelmente, após esta quebra, o SA interage diretamente com as cisteínas, provocando a desagregação final do oligômero (WU et al., 2012). Subsequentemente, os monômeros de NPR1 são translocados ao núcleo, onde exercem suas atividades regulatórias, tais como a indução na expressão de genes *PR* (KINKEMA et al.., 2000). Esta indução ocorre não apenas localmente, como também sistemicamente: a NPR1 é responsável por iniciar toda a cascata de sinzalização que conduz à reprogramação transcricional massiva na SAR. Plantas sem NPR1 funcional são debilitadas na expressão de genes *PR* e quase completamente incapazes de exibir SAR em resposta a infecções de patógenos (PAJEROWSKA-MUKHTAR et al., 2013). Em relação à interação com herbívoros, a indução na expressão de *NPR1* foi também observada na resposta de Arabidopsis a *B. tabaci* (KEMPEMA et al., 2007).

A NPR1 não apresenta um domínio de ligação ao DNA e portanto desempenha sua atividade transcricional atuando como um co-ativador de fatores de transcrição (SPOEL et al., 2009). Entre eles, destacam-se os fatores de transcrição TGA (GATZ, 2013), cuja interação com a NPR1 está bem descrita na literatura. Os TGAs constituem subfamílias conversadas dos reguladores bZIP (*basic region/ leucine zipper motif*) cujos alvos no genoma são elementos cis-regulatórios do tipo as-1, comuns a genes *PR*. O genoma de Arabidopsis codifica 10 fatores TGA, cinco dos quais interagem constitutivamente com NPR1 (TGA2, TGA3, TGA5, TGA6 e

TGA7), interferindo de maneira positiva ou negativa na expressão de genes da via de SA (FU; DONG, 2013). Neste contexto, o fator TGA3 atua como um regulador positivo da expressão de genes-alvo, incluindo o *PR1* (KESARWANI et al., 2007). Esta indução ocorre a partir do recrutamento do TGA3, dependente de SA e NPR1, a elementos LS7 (*linker-scanning* 7) presentes no promotor de *PR1* (JOHNSON et al., 2003; PAJEROWSKA-MUKHTAR et al., 2013). O TGA3 fornece também um *link* entre as vias de SA e do hormônio citoquinina. Em tecidos com acúmulo de citoquinina, o TGA3 recruta o regulador ARR2 a promotores de genes de defesa responsivos ao SA, o que promove a hiperativação dos mesmos (CHOI et al., 2011). O fator pode ser também associado a assinaturas de cálcio, visto que sua ligação ao DNA é favorecida pela calmodulina (SZYMANSKI et al., 1996). No entanto, ainda não se sabe a relevância disto às funções do TGA3 (GATZ, 2013).

Em resposta ao *B. phoenicis, as* alterações na expressão do *TGA3* foram observadas no tempo 24 hai, no qual o gene encontrou-se induzido. Observa-se que a indução na expressão do gene *PR1*, diretamente controlado por TGA3, também foi evidente no mesmo tempo do time course, indicando uma possível regulação do gene de resistência pelo fator considerado.

Além dos TGAs, outros fatores de transcrição diretamente envolvidos em respostas de defesa das plantas são os conhecidos como WRKY. Fatores WRKY constituem uma das maiores famílias de fatores de transcrição em plantas e modulam muitos processos distintos, dentre os quais a resposta imune representa o principal. Neste contexto, os fatores WRKY atuam como reguladores chave, tanto positivos quanto negativos, das duas linhas de defesa da imunidade inata: PTI e ETI (Rushton et al., 2010). Fatores WRKY apresentam em comum um domínio de ligação ao DNA com um *zinc finger* na região C-terminal e uma sequência de aminoácidos altamente conservada (WRKYGQK) na região N-terminal, que reconhece elementos cis-regulatórios do tipo W-box (TTGACC/T) (RUSHTON et al., 2010; SHIM et al., 2013). Os promotores dos genes WRKY apresentam muitas sequências W-box, o que indica que os fatores WRKY realizam autoregulação, interagindo com seus próprios promotores, e regulação cruzada, pela interação de outros fatores WRKY com seus promotores (EULGEM; SOMSSICH, 2007; RUSHTON et al., 2010). Dentre os inúmeros membros da família WRKY, o WRKY70 é conhecido por controlar de maneira positiva a expressão de genes PR, de uma maneira dependente de SA. O aumento nos níveis de SA ativa a expressão de

WRKY70 e, por outro lado, o aumento nos níveis de JA reprime a expressão do mesmo gene, de forma que a quantidade de transcritos do *WRKY70* reflete o balanço celular de SA e JA. Altos níveis de transcritos de *WRKY70* promovem a expressão de genes *PR* responsivos a SA (como *PR1, PR2, PR5*), enquanto baixos níveis favorecem a expressão de genes responsivos a JA (como *PDF1.2*). Portanto, o WRKY70 apresenta um papel central na integração das vias de sinalização de SA e JA/ET para a regulação das respostas de defesa (LI et al., 2004). Em relação à resposta a herbívoros, recentemente o WRKY70 foi mostrado como necessário à defesa mediada pelo gene R *Mi-1* contra o afídeo *Macrosiphum euphorbiae* em tomate. Transcritos de *WRKY70* foram encontrados acumulados na presença do afídeo e o silenciamento do gene reduziu a resistência da planta ao herbívoro (ATAMIAN et al., 2012). Além disso, a indução do *WRKY70* foi também observada na interação de *B. tabaci* com *A. thaliana* (KEMPEMA et al., 2007).

Ambos os fatores avaliados, TGA e WRKY, são requeridos para a expressão de genes de defesa ao final da via de SA. Dentre estes genes, os principais são os da classe *PR* (*pathogenesis-related genes*), os quais codificam um grupo de proteínas caracterizadas por serem induzidas em ataques de patógenos ou herbívoros. As proteínas PR, muitas delas com atividades antimicrobianas, são consideradas as realizadoras da imunidade. Tais proteínas possivelmente atuam em conjunto, sendo difícil avaliar a contribuição de cada uma delas à resistência (VAN LOON et al., 2006b). Em concordância com esta observação, a superexpressão de proteínas PR em plantas transgênicas mostra que elas não são tão efetivas quando expressas individualmente se comparadas quando expressas de maneira coordenada. Desde sua descoberta em 1970, 17 famílias de proteínas PR foram identificadas (VAN LOON et al., 2006b; FU; DONG, 2013). Em Arabidopsis, a via de SA induz a expressão da PR1, PR2 (B-1,3-glucanase) e PR5 (taumatina), consideradas marcadoras da SAR (VAN LOON et al., 2006b). Destaca-se a PR1, a qual é sempre encontrada acompanhando a SAR, e é muito abundante na planta (1 a 2% das proteínas totais da folha). Apesar disso, a função da PR1 ainda é desconhecida. As proteínas PR1 são amplamente conservadas e aparentemente estão representadas em todas as espécies de plantas, sendo frequentemente encontradas induzidas em interações com agressores distintos. As proteínas PR5, por sua vez, pertencem a uma ampla família de proteinas com funções distintas e têm sido principalmente associadas com atividades contra fungos e oomicetos (VAN

LOON et al., 2006b). Considerando apenas possíveis papéis na resposta à herbivoria, uma PR5 encontrada em sementes de milho foi descrita como capaz de inibir α-amilases de insetos (SCHIMOLER-O'ROURKE et al, 2001), enquanto outras de Arabidopsis e arroz apresentam funções putativas de receptores do tipo quinase (VAN LOON et al., 2006b). O acúmulo de transcritos de ambas as proteínas, PR1 e PR5, foi observado na resposta de Arabidopsis a *B. tabaci* (KEMPEMA et al., 2007) e *T. urticae* (ZHUROV et al., 2014).

Em plantas, a resposta à herbivoria está tipicamente associada às vias de JA/ET. No entanto, herbívoros que não causam injúrias severas, como aqueles sugadores que se alimentam do floema (MOHASE; VAN DER WESTHUIZEN, 2002; ZHANG et al., 2009) ou do conteúdo celular (ARIMURA et al., 2002) têm sido associados com a ativação da via de SA. Como exemplo, afídeos e moscas-brancas ativam principalmente a via de SA, de maneira similar a patógenos biotróficos, o que inclui a indução de genes ao longo de toda a via (MORAN; THOMSON, 2001; ELLIS et al., 2002; MORAN et al., 2002; DE VOS et al., 2005; ZARATE et al., 2007). A expressão dos genes envolvidos na via de SA é aparentemente variável, visto que aumentos em genes *PR* específicos não são observados em todos os estudos (MORAN; THOMSON, 2001; ELLIS et al., 2002; MORAN et al., 2002; DE VOS et al., 2005).

Um crescente número de evidências indica que a função do SA em resposta a herbívoros está associada a uma melhor performance deste tipo de agressor, ao invés de uma defesa efetiva contra os mesmos (WU; BALDWIN, 2010). Neste sentido, afideos *M. persicae* e *Brevicoryne brassicae* têm melhor desempenho em plantas selvagens de Arabidopsis do que em mutantes *npr1*, debilitados em defesas de SA (MEWIS et al., 2005). Da mesma maneira, ninfas de *B. tabaci* apresentam melhor performance em plantas de Arabidosis *cpr-6*, as quais apresentam vias de SA ativadas (ZHANG et al., 2013). A função da via do SA é ainda indiferente ao estilo de alimentação do herbívoro. Por exemplo, as lagartas *Spodoptera exigua* (MEWIS et al., 2005), *S. littoralis* (STOTZ et al., 2002) e *Trichoplusia ni* (CUI et al., 2002) mostram um desenvolvimento comprometido em plantas debilitadas na sinalização de SA e favorecido em plantas com níveis elevados de SA ou debilitadas na sinalização de JA. Exceções podem ser encontradas, como a defesa de tomate contra afideos *M. euphorbiae,* dependente de SA (LI et al., 2006), indicando que a

função do SA em influenciar a atividade de herbívoros pode ser espécie-específica (WU; BALDWIN, 2010).

Inúmeros trabalhos mostram que a ativação da via de SA representa uma estratégia de herbívoros para suprimir a vias de defesa de JA, de fato efetiva contra a performance dos mesmos (MEWIS et al., 2005; ZARATE *et a*l., 2007). Ou seja, os herbívoros exploram o *cross-talk* entre as vias de sinalização para suprimir respostas de defesa (FELTON; KORTH, 2000; MUSSER et al, 2002). Como consequência, o sucesso do herbívoro depende da extensão da supressão da via de JA pela ativação da via de SA (MEWIS et al., 2005). A observação frequente de que herbívoros sugadores elicitam perfis de transcrição associados com a ativação de genes responsivos a SA e a fraca expressão ou repressão de genes responsivos a JA (MORAN; THOMPSON, 2001;THOMPSON; GOGGIN, 2006; KEMPEMA et al., 2007; DE VOS et al., 2005) indica que, ao contrário de herbívoros mastigadores, os sugadores são capazes de suprimir ativamente as vias de defesa de JA (THOMPSON; GOGGIN, 2006; ZARATE et al., 2007). Acredita-se que a indução fraca da via de JA por herbívoros sugadores reflita apenas os danos mecânicos causados pelo estilete (THOMPSON; GOGGIN, 2006; HOWE; JANDER, 2008).

Ácaros *B. phoenicis,* por si só, são pouco agressivos às suas hospedeiras. No processo de alimentação, os ácaros penetram seus estiletes nas células hospedeiras, provocando um extravasamento do conteúdo celular, e em seguida os retraem, de forma que os fluidos celulares vêm à superfície da folha e são então sugados. Ao contrário de herbívoros mastigadores, esta estratégia de alimentação não provoca danos graves aos tecidos das plantas. A ativação da via de SA, portanto, está em concordância com a resposta frequentemente observada para herbívoros com o mesmo comportamento. A presença de inúmeros trabalhos indicando o papel positivo da via de SA torna plausível supor que o *B. phoenicis* seja capaz de ativar a via de SA como uma forma de alterar a sinalização da planta a seu favor, possivelmente suprimindo defesas efetivas. No entanto, permanece desconhecida a influência da via sob a atividade dos ácaros.

5.9.2 Vias de JA/ET

Em adição à ativação da via de SA, durante a interação dos ácaros com *A. thaliana* também foi observada a indução das vias de JA/ET (Figura 15). A maior

parte dos genes associados a estas vias foi encontrada induzida: *ETR1*, *EIN2, MYC2* e *PDF1.2*. Exceção foi observada apenas para o *JAR1*, gene-chave da via do JA que, ao contrário dos demais, foi encontrado reprimido.

Apesar do conhecido antagonismo entre as vias clássicas de defesa, SA e JA/ET, a ativação de ambas em resposta à herbivoria já foi descrita para outras interações (REYMOND et al., 2000; MORAN; THOMPSON, 2001). Enquanto a via de SA normalmente reprime as vias de JA/ET, o contrário é pouco comum. Acredita-se que isso aconteça pois um ataque de herbivoria pode ser preditivo de uma futura doença, visto que o dano gerado pelo herbívoro pode ser uma porta de entrada para patógenos ou o próprio herbívoro pode ser um vetor transmitindo patógenos no momento de seu ataque. Seria, portanto, prejudicial à planta inibir a principal via de defesa a patógenos, SA, quando as vias de defesa à herbivoria, JA/ET, fossem ativadas. A elicitação de uma resistência contra patógenos como resposta à herbivoria representa à planta uma vantagem seletiva e é portanto bastante comum (HEIL; BOSTOCK, 2002). A indução de ambas as vias, SA e JA/ET, foi encontrada na interação entre tomate e *T. urticae* (KANT et al., 2004).

A proteína ETR1 constitui um receptor de ET e faz parte de uma família de cinco membros de receptores do hormônio, dentre os quais exerce o papel predominante na via de sinalização (QU et al., 2007; HALL et al., 2012). Sua estrutura é composta por três domínios transmembranas próximos à região N-terminal, que contêm o sítio de ligação ao ET, um domínio GAF central para interações com outras proteínas e um domínio C-terminal com função de histidina quinase (ZHAO et al., 2002). Na ausência do ET, o receptor atua como um regulador negativo da via, visto que mutações nesta proteína promovem a ativação constitutiva das respostas de etileno. Na presença do ET, sua ligação ao receptor gera alterações conformacionais que tornam a sinalização de ETR1 inativa, o que permite a indução das respostas ao etileno (ZHAO et al., 2002; HALL et al., 2012). Os receptores ETR1 ativam a proteína quinase CTR1, que regula negativamente componentes downstream da via (BISSON et al., 2009). Ambos, ETR1 e CTR1, são localizados no retículo endoplasmático (ZHU; GUO, 2008).

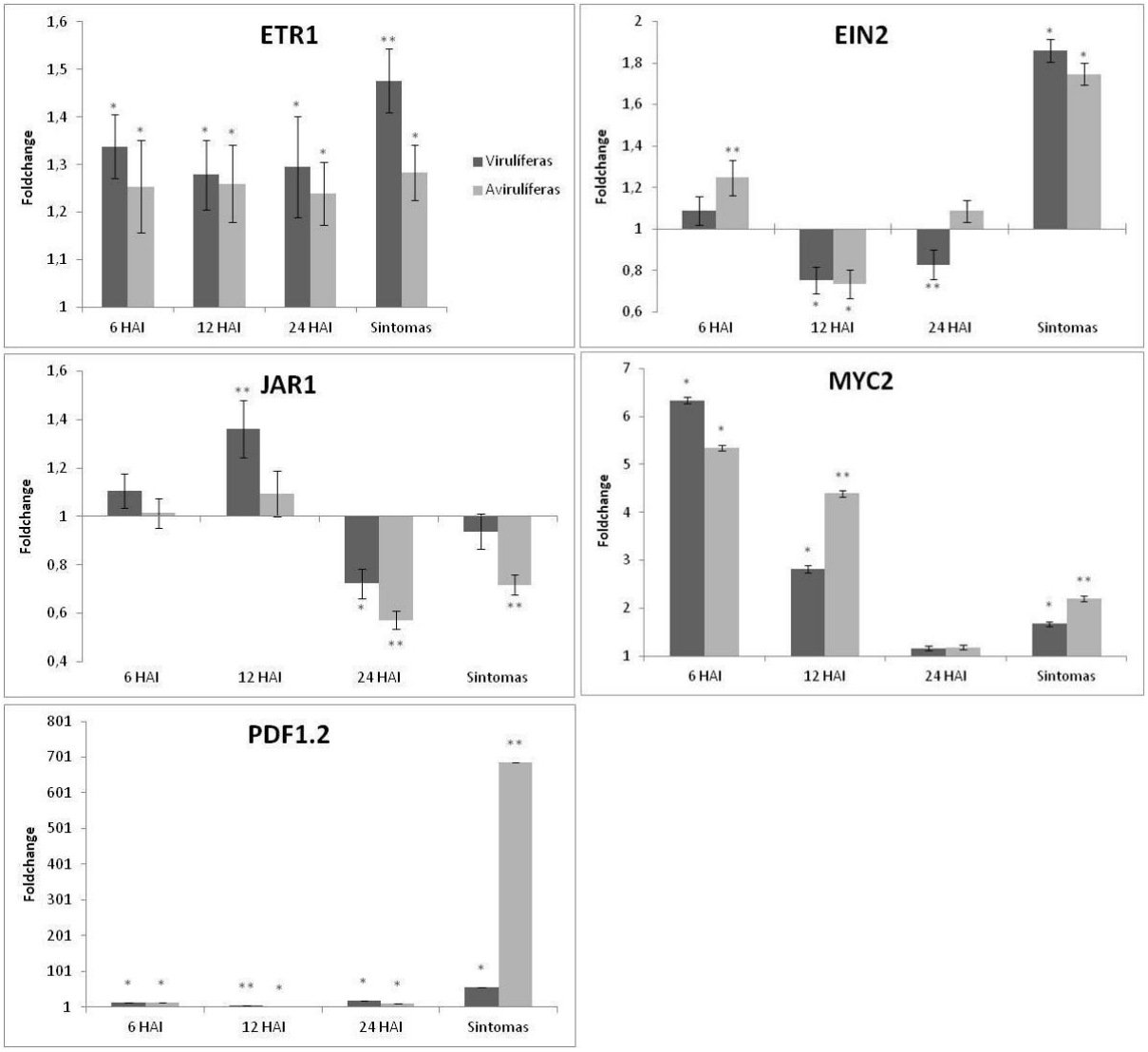

Figura 15 - Padrões de expressão dos genes associados às via de JA/ET em plantas de *A. thaliana.* Em cinza escuro, plantas infestas com ácaros virulíferos. Em cinza claro, plantas infestadas com ácaros avirulíferos. Estão representados os valores de *foldchange* em relação ao controle não-infestado (foldchange = 1). * Diferença (α = 0,05) entre as plantas infestadas em referência às não-infestadas. ** Diferença (α = 0,05) entre plantas infestadas com ácaros virulíferos e avirulíferos.

Entre os componentes suprimidos pela CTR1, encontra-se a proteína EIN2, a qual desempenha papel central como regulador positivo da sinalização da via de ET (ZHU; GUO, 2008). O gene que a codifica é o único entre todos os componentes envolvidos na via de ET cuja mutação de perda de função leva à completa insensibilidade ao etileno (ALONSO et al., 1999; BISSON et al., 2009). Apesar disso, sua função bioquímica é ainda desconhecida (LIU et al., 2010). A EIN2 é também localizada no retículo endoplasmático e interage com ETR1 (BISSON et al., 2009). Estudos recentes propõem que, na ausência do ET, o ETR1 permanece em seu estado fosforilado formando interações com o regulador negativo CTR1, mas não

com EIN2. A presença do hormônio, por sua vez, possivelmente inibe a atividade autoquinase do receptor, tornando-o inativo, o que promove a inativação de CTR1 e a interação do receptor com EIN2 na membrana do retículo endoplasmático (BISSON; GROTH, 2011). A transdução do sinal de ET pelo EIN2 leva à expressão de genes específicos da resposta de defesa, tais como o *PDF1.2*, um marcador da via de ET e JA (MORAN; THOMPSON, 2001; LIU et al., 2010).

Ambos os genes associados à via do ET, *ETR1* e *EIN2*, foram induzidos em plantas de *A. thaliana* desafiadas com *B. tabaci* (KEMPEMA et al., 2007). O ETR1 mostrou ser necessário à resposta de defesa mediada por glucosinolatos a insetos com estratégias distintas de alimentação: sugadores (*M. persicae* e *B. brassicae*) e mastigador (*S. exigua*) (MEWIS et al., 2005). Indicando um papel negativo de ET na regulação da resposta contra herbívoros, lagartas generalistas *S. littoralis* apresentam atividade reduzida em mutantes *ein2* e aumentada em plantas selvagens pré-tratadas com um análogo do ET (STOTZ et al., 2000).

O gene *JAR1* codifica a enzima *JA conjugate synthase*, responsável por conjugar o ácido jasmônico a aminoácidos como a isoleucina, resultando no JA-Ile, forma biologicamente ativa do hormônio que ativa a via de sinalização de JA (FONSECA et al., 2009; WASTERNACK; HOUSE, 2013). O ácido jasmônico forma também conjugados com outros aminoácidos, embora as funções biológicas dos mesmos permaneçam desconhecidas (WU; BALDWIN, 2010). O papel de JAR1 e JA-Ile na resposta contra herbívoros foi demonstrado em *Nicotiana attenuata*. O silenciamento de ortólogos de *JAR1* reduziu o acúmulo de JA-Ile e tornou as plantas mais suscetíveis a larvas de *Manduca sexta*, enquanto o tratamento com JA-Ile reverteu os defeitos na defesa contra o inseto (KANG et al., 2006; WANG et al., 2007). A elicitação da expressão de *JAR1* é observada em resposta a *M. sexta*, *B. tabaci* (KEMPEMA et al., 2007), *T. urticae* (ZHUROV et al., 2014), além de danos mecânicos (SUZA; STASWICK., 2008).

Após associação do JA-Ile ao receptor COI1 e consequente liberação do estado de repressão da via pelas proteínas JAZ, o processo primário de transdução do sinal converge em MYC2, um fator de transcrição do tipo bHLH (*basic helix-loop-helix*). Para regular a transcrição de genes, o MYC2 forma dímeros com outros fatores de transcrição do tipo bHLH, como MYC3 e MYC4 (FERNANDEZ-CALVO et al., 2011), os quais se associam a sequências cis-regulatórias do tipo G-box em seus promotores alvo (DOMBRECHT et al., 2007; KAZAN; MANNERS, 2001). Entre

os genes regulados por MYC2, destaca-se o marcador *VSP2*, mostrado induzido em resposta à alimentação de herbívoros ou ferimentos (LORENZO et al., 2004). Atestando a contribuição de MYC2 na defesa à herbivoria, o fator de transcrição considerado é essencial para a biossíntese de glucosinolatos (metabólitos secundários tóxicos a artrópodes), com um marcante efeito na alimentação de herbívoros generalistas (SCHWEIZER et al., 2013), tais como o *B. phoenicis*. O MYC2 atua como um ponto regulatório central dentro da via de sinalização, pois além de regular positivamente a defesa contra herbívoros e ferimentos, ele age negativamente na defesa contra patógenos necrotróficos. Essa regulação negativa é exercida pela repressão de fatores de transcrição do tipo ERF, que ativam a expressão de genes de defesa a tais patógenos (KAZAN; MANNERS, 2013).

Os fatores de transcrição do tipo ERF, sendo os principais ERF1 e OR59, mediam portanto um segundo ramo da via de sinalização de JA. Este ramo culmina na expressão de genes efetivos contra necrotróficos, destacando-se o *PDF1*.2. O PDF1.2, principal marcador deste braço da via de JA, constitui uma defensina (PR12) amplamente expressa em resposta a tais patógenos e com atividade antifúngica, embora seu papel preciso ainda não esteja bem esclarecido (PENNINCKX et al., 1996; SELS et al., 2008). Como consequência à repressão da indução do braço ERF por MYC2, mutantes *myc2* mostram uma elevada expressão de *PDF1.2* (LORENZO et al.., 2004). Recentemente, foi mostrado que o antagonismo entre os dois braços durante a herbivoria é regulado ao nível da expressão gênica dos fatores de transcrição *ERF* e *MYC2* (VERHAGE et al., 2011).

A ativação do braço ERF, em particular a indução de transcritos do marcador *PDF1.2*, é regulada também pela presença do hormônio ET (PRÉ et al., 2008). Assim, quando a resposta de JA e ET são induzidas em conjunto, o braço ERF é ativado, enquanto o braço MYC2 é ativado quando o ET está ausente (VERHAGE et al., 2011). Esta resposta diferencial dos braços de JA pode ser claramente observada em Arabidopsis após indução com o necrotrófico *Alternaria brassicola*, que induz a produção de ambos JA e ET, ativando o braço ERF, ou após a infestação com o herbívoro *Frankliniella occidentalis*, que estimula a biossíntese de JA mas não ET, ativando o braço MYC2. Em função da repressão exercida de um braço sobre o outro, os mutantes myc2 mostram uma elevada susceptibilidade à lagarta *Helicoverpa armigera* (DOMBRECHT et al., 2007) e uma resistência contra

os patógenos necrotróficos *Botrytis cinerea* e *Plectosphaerella cucumerina* (LORENZO et al., 2004).

A via do JA, portanto, é dividida em dois braços, os quais regulam diferencialmente as defesas contra herbívoros e patógenos necrotróficos. Um deles é mediado pelo fator de transcrição MYC2, negativamente regulado por ET, e induz a expressão do gene marcador *VSP2.* O outro é mediado pelos fatores de transcrição ERF1 ou ORA59, positivamente regulado por ET, e induz a expressão do gene marcador *PDF1.2*. O braço MYC2 representa a resposta principal à herbivoria e reprime o braço ERF, normalmente ativado em resposta a necrotróficos. Sendo assim, na presença de herbivoria, apenas quando o braço MYC2 é reprimido ocorre a ativação do braço ERF. Ao contrário do esperado, o braço ERF foi encontrado ativo na presença de ácaros *B. phoenicis*, conforme observado pela superexpressão do gene *PDF1.2*, cujos valores de *foldchange* nas plantas avirulíferas em relação às sadias variam de 13, no tempo inicial de 6 HAI, a quase 700, no tempo sintomas (Figura 15).

Um trabalho recente mostra que a indução do braço ERF em resposta à herbivoria ocorre precisamente em mutantes de Arabidopsis para a proteína JAR1 (VERHAGE et al., 2011). Em plantas selvagens, após o estímulo pela lagarta *Pieris rapae*, é ativado o braço principal de resposta à herbivoria (MYC2), enquanto em plantas que não expressam a JAR1 é ativado o braço secundário (ERF). Trata-se analogamente da situação encontrada na resposta de *A. thaliana* à presença do ácaro da leprose, ou seja, uma repressão do gene *JAR1* e uma superexpressão do gene *PDF1.2*. Neste mesmo trabalho, foi mostrado também que a ativação do braço ERF estimula a atração aos herbívoros. As larvas de *P. rapae* preferem se alimentar de plantas que expressam o braço ERF do que de plantas que não expressam nenhum dos dois braços de defesa. O braço ERF tem um efeito estimulatório à alimentação das larvas devido, possivelmente, ao aumento da produção de metabólitos regulados por ele. Assim, a ativação do braço MYC2 por plantas selvagens desafiadas com *P. rapae* representa uma estratégia da planta para reduzir a atratividade ao herbívoro. Interessantemente, quando é aplicada apenas a saliva da larva através de pequenos ferimentos na folha, de forma que não haja nenhum outro tipo de reconhecimento ou ataque do inseto, o braço induzido não é o tipicamente associado à herbivoria, mas sim o ERF, favorável à alimentação da larva. Por conclusão, os autores assumem que o braço ERF representa um estímulo

ao herbívoro, ao invés de uma resposta de defesa do hospedeiro, e o herbívoro seria capaz de manipular a planta de forma a induzir a via que lhe é favorável.

Em relação à interação avaliada de *A. thaliana* ao *B. phoenicis*, não era esperada uma resposta intensa, visto que o ácaro não causa danos severos à planta. No entanto, foi possível observar uma indução expressiva da via de JA, e mais especificamente de um braço não frequentemente associado a uma resposta de defesa à herbivoria. Em consistência com a regulação diferencial da via de JA, foi possível também observar que o *MYC2* é ativado nos tempos iniciais da infestação e reduzido ao longo do *time course*, e este perfil de expressão correlaciona com a baixa indução do *PDF1.2* nos tempos iniciais e seu aumento ao longo do *time course*. Este comportamento oposto pode estar relacionado à repressão do braço ERF pelo braço MYC2. O *cross-talk* com ET tambem é observado: nos tempos iniciais, a expressão do gene *EIN2* é reduzida, assim como a do braço ERF; no tempo sintomas, o *EIN2* é superexpresso, em conjunto com o braço ERF. Embora ainda não hajam subsídios suficientes para comprovar tal hipótese, pode-se propor que o ataque do ácaro inicialmente elicite na planta defesas contra a herbivoria (MYC2), porém o ácaro seja capaz de reprimir esta via e ativar o braço ERF. Assim, a repressão de *JAR1* observada seria uma estratégia do ácaro para manipular a resposta da planta a seu favor, desviando a via principal de defesa contra herbívoros para uma que seja favorável a ele, talvez devido à indução na produção de metabólitos que estimulem sua alimentação.

5.9.3 Silenciamento de RNA

Genes associados ao silenciamento de RNA foram selecionados para análise neste trabalho em função de seu conhecido papel na defesa antiviral. No entanto, foi possível observar alterações na expressão de tais genes também em resposta à infecção por ácaros avirulíferos. De forma geral, os genes avaliados foram induzidos em tempos iniciais e sua acumulação observa-se reduzida no tempo sintomas (Figura 16).

O ataque por herbívoros gera uma massiva reprogramação transcricional, que culmina em alterações no metabolismo e estado de defesa da planta. Está claro que os fitormônios, principalmente JA e ET, mediam tais respostas. No entanto, a velocidade e a magnitude das mesmas, muitas das quais precedem as alterações

nos niveis de fitormônios, sugerem que outros mecanismos regulatórios estão envolvidos. Alguns estudos recentes relatam uma associação entre silenciamento de RNA e resposta de defesa à herbivoria, sugerindo que os RNAs endógenos de pequeno tamanho (smRNAs), rapidamente elicitados e transportados, são prováveis candidatos ao controle destas alterações transcricionais, promovendo um ajuste fino das respostas de defesa (BOZOROV; BALDWIN, 2012).

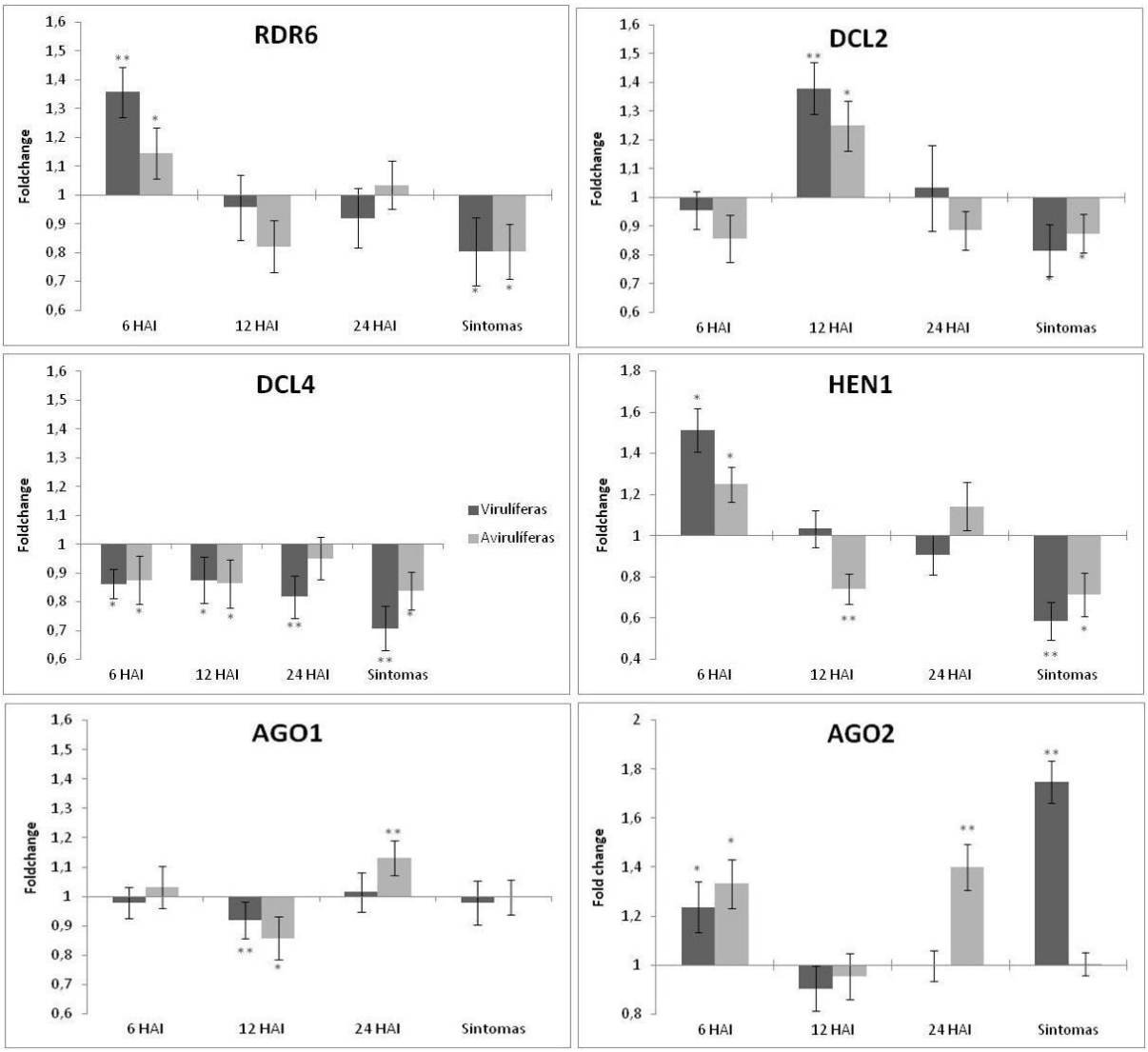

Figura 16 - Padrões de expressão dos genes associados ao silenciamento de RNA em plantas de *A. thaliana.* Em cinza escuro, plantas infestas com ácaros virulíferos. Em cinza claro, plantas infestadas com ácaros avirulíferos. Estão representados os valores de *foldchange* em relação ao controle não-infestado (foldchange = 1). * Diferença (α = 0,05) entre as plantas infestadas em referência às não-infestadas. ** Diferença (α = 0,05) entre plantas infestadas com ácaros virulíferos e avirulíferos

Os smRNAs são classificados em miRNAs e siRNAs em função de sua origem. A biogênese de ambos requer componentes específicos da via de

silenciamento de RNA, tais como RDR, DCL, HEN1 e AGO, avaliados neste trabalho. Os miRNAs originam-se a partir de genes MIR, os quais são transcritos no núcleo, gerando moléculas estruturadas de RNA contendo um grampo e regiões de dsRNA, denominadas pré-miRNA, que são subsequentemente processadas pela DCL1 (BARTEL, 2004; CHEN, 2005; BOLOGNA et al., 2012). Os siRNAs endógenos, por sua vez, são produzidos a partir de moléculas de dsRNA precursoras de origens distintas, sintetizadas por enzimas RDR, que são processadas por proteínas DCL 2, 3 e 4 (GASCIOLLI et al., 2005). Após processados por proteínas DCL, os siRNAs e miRNAs gerados são estabilizados por adições de grupos metil em suas extremidades pela enzima metil-transferase HEN1. Ambos os smRNAs se associam a proteínas AGO, componentes centrais de RISCs, os quais são direcionados para reconhecer mRNAs através de uma complementariedade perfeita ou imperfeita, resultando na degradação ou inibição do mRNA alvo (BOZOROV; BALDWIN, 2012).

Os smRNAs têm emergido como reguladores fundamentais, exercendo um controle na expressão de genes a níveis transcricionais e pós-transcricionais (Ruiz-Ferrer; Voinnet, 2009; Chellappan et al., 2010; Chen et al., 2011; Bozorov; Baldwin, 2012). Além de seus conhecidos papéis nos processos de desenvolvimento e diferenciação, muitos trabalhos têm mostrado que os smRNAs também desempenham funções chave nas respostas de plantas a estresses bióticos e abióticos (CHOI; SANO, 2007; PHILLIPS et al., 2007; REINHART et al., 2002; RUIZ-FERRER; VOINNET, 2009; ZHANG et al., 2010; KULCHESKI et al., 2011; YAN et al., 2011; KHRAIWESH et al., 2012). Estresses bióticos e abióticos são capazes de alterar a abundância dos smRNAs. Seria custoso para as plantas manter a expressão dessas respostas em condições ausentes de estresse, em função da energia gasta para a síntese de proteínas que não seriam utilizadas e da perda de metabólitos primários e produtos da fotossíntese para os agressores. Desta forma, quando as plantas são expostas a estresses, elas devem inativar a expressão de genes envolvidos nos processos de crescimento e desenvolvimento e ativar a expressão de genes de resposta a estresse (SUNKAR, 2010). Os smRNAS possivelmente controlam tais alterações, permitindo que as plantas se adaptem de uma maneira rápida e plástica ao estresse ao qual foram submetidas (SCHMIDT et al., 2005; BOZOROV; BALDWIN, 2012).

Neste contexto, um estudo mostrou alterações em larga escala na população de smRNA de plantas de *Nicotiana attenuata* sujeitas ao ataque de herbivoria (PANDEY et al., 2008). Além disso, a interrupção de proteínas da maquinaria de silenciamento de RNA tem demonstrando o papel chave dessas proteínas em genes de resposta a estresse, incluindo genes responsivos à herbivoria. Recentemente, foi mostrado que a RDR1 é rapidamente elicitada após a herbivoria em *N. attenuata* e que a ausência da proteína torna as plantas mais suscetíveis a herbívoros de diferentes estratégias de alimentação (PANDEY; BALDWIN, 2007), sugerindo um envolvimento dos smRNAs na regulação da resposta de defesa à herbivoria. Buscando elucidar este papel, foram avaliadas plantas selvagens e mutantes *rdr1* de *N. attenuata* submetidas ao ataque do inseto *M. sexta* (ou aplicações de secreções orais, OS, do mesmo), cuja defesa é regulada positivamente pela via de JA, que elicita principalmente a produção de nicotina (PANDEY et al., 2008). Como resultado, após elicitação por OS, em comparação com plantas selvagens, a ausência da RDR1 provocou a redução no acúmulo de transcritos associados à biossíntese de JA, com consequente redução nos níveis do fitormônio e alterações transcricionais em genes de sinalização da via, contribuindo para a maior susceptibilidade das plantas a herbívoros. Comprovando que esta suscetibilidade de plantas mutantes *rdr1* era de fato devido a níveis insuficientes de JA para ativação da via de sinalização, plantas mutantes suplementadas com JA tiveram sua resistência restaurada. Os autores propuseram que os smRNAs, neste caso gerados pela RDR1 elicitada após a herbivoria, regulam a vias de sinalização de JA, tanto diretamente pelo controle da transcrição dos genes associados à via quanto indiretamente pelo controle de fatores de transcrição e repressores (PANDEY et al., 2008).

Tomando como exemplo outro componente central da maquinaria de silenciamento de RNA, Borozov et al. (2012) avaliaram o envolvimento de cada uma das quatro DCL na resposta à herbiviora, considerando a mesma interação entre *M. sexta* e *N. attenuata*. Como resultado, foi mostrado que a ausência de cada DCL, assim como RDR1, também debilita as defesas mediadas por JA durante a herbivoria nesta espécie vegetal. Estas alterações mostraram ser reguladas de maneiras distintas para cada DCL. Plantas mutantes *dcl3* e *dcl4* são mais suscetíveis ao herbívoro e mutantes simples *dcl4* e duplos *dcl2/3* apresentam acúmulos reduzidos de JA. Em relação às defesas diretas, DCL3 sozinha regula os

níveis de inibidores de proteases, enquanto DCL3 e DCL4 regulam o acúmulo de nicotina. Por fim, os autores concluíram que DCL2, DCL3 e DCL4 interagem de maneira complexa para regular as defesas anti-herbivoria (BOROZOV et al., 2012). Em relação aos demais genes envolvidos na via de silenciamento de RNA, tais como os AGOs e HEN1 aqui avaliados, não foram encontrados na literatura trabalhos demonstrando associações entre os mesmos e a resposta à herbivoria.

O silenciamento de RNA é colocado, portanto, no centro da resposta da planta a herbívoros, sendo responsável por regular as vias de sinalização hormonais que determinam as defesas (PANDEY et al., 2008; BOZOROV; BALDWIN, 2012). Seguindo a hipótese de que o *B. phoenicis* possa ser capaz de manipular a resposta de defesa da planta, o padrão de expressão dos genes envolvidos na via de silenciamento, induzidos em tempos iniciais da infestação e reprimidos em tempos posteriores, permite supor que o ácaro exerça esta manipulação reprimindo a expressão destes genes. Por consequência, a expressão de genes das vias de sinalização hormonais seria afetada de forma a favorecer a infestação da planta pelo ácaro, de maneira similar à repressão da via de JA pela ausência da RDR1. Como exemplo hipótetico, a supressão da via de silenciamento poderia reprimir a expressão da enzima JAR1, deslocando a via de JA para a indução do braço ERF.

5.9.4 Considerações finais sobre a interação *B. phoenicis*/*A. thaliana*

De forma geral, foi possível observar uma consistente indução de toda a via de sinalização de SA ao longo do *time course* do experimento de interação entre o ácaro *B. phoenicis* e a planta *A. thaliana*. A resposta é similar à descrita para os herbívoros que não causam danos drásticos às células hospedeiras. Em relação à via de JA, foi verificada uma redução na expressão de genes associados ao braço que media as defesas contra herbivoria, correlacionada com uma indução do braço que intermedia respostas contra necrotróficos. A indução deste braço foi previamente relatada na resposta de Arabidopsis a secreções orais de *P. rapae* e pode fazer parte da manipulação do metabolismo vegetal por parte de artrópodes para favorecer sua atividade (VERHAGE et al., 2011). Por fim, a análise dos genes associados à via de silenciamento de RNA, considerados modeladores das vias clássicas de sinalização, revelou uma indução inicial de tais genes, seguida da repressão dos mesmos em tempos posteriores.

A análise de outras interações planta-herbívoro permitem hipotetizar que o ácaro *B. phoenicis* possa ser capaz de manipular a resposta de defesa de *A. thaliana* de forma a favorecer sua infestação. Inúmeros trabalhos relatam a capacidade de herbívoros em interferir com vias de sinalização de defesa de forma a modular a resposta da planta a seu favor. Como exemplo, secreções orais da lagarta generalista *Helicoverpa zea* são capazes de reduzir a via de JA que culmina na síntese de nicotina, uma toxina capaz de induzir resposta de defesa em plantas de tabaco contra a herbivoria (MUSSER et al., 2002). Moscas-brancas (*B. tabaci*) e secreções orais da lagarta *S. exigua* são ambas capazes de ativar a via de SA com o intuito de antagonizar defesas de JA (ZARATE et al., 2007; DIEZEL et al., 2009). Em uma interação similar a aqui avaliada, entre tomate e o ácaro tenuipalpídeo *Tetranychus evansi*, foi mostrada não apenas a supressão de defesas por herbívoros, como também um aumento na qualidade da planta para o herbívoro supressor (SARMENTO et al., 2011), conforme relatado para *P. rapae* (VERHAGE et al., 2011). Em plantas pré-ativadas para as vias de SA e JA, o ácaro *T. evansi* é capaz de suprimir estas vias, reduzindo os níveis de compostos de defesa a valores ainda menores do que os constitutivos em plantas não infestadas. Por consequência, os ácaros apresentam um desenvolvimento ainda melhor em plantas previamente atacadas do que em plantas não atacadas (SARMENTO et al., 2011). Tratam-se de estratégias distintas, porém todas trazem a ideia de manipulação da resposta da planta pelo herbívoro, em detrimento à elicitação de uma resposta de defesa contra ele.

Amplas evidências indicam que esta modulação do metabolismo da célula vegetal hospedeira por herbívoros se dá por meio de efetores, de maneira similar a patógenos (BOS et al., 2010; BOS; HOGENHOUT, 2012; WU; BALDWIN, 2010). Vários estudos sugerem que tais proteínas são secretadas pela saliva de herbívoros e introduzidas em células hospedeiras para suprimir respostas de defesa das plantas. Por esta razão, a manipulação de respostas de defesa de plantas hospedeiras por efetores de herbívoros tem sido frequentemente descrita para herbívoros perfuradores-sugadores, os quais afetam as células vegetais pela perfuração com seus estiletes e posterior injeção de saliva. Essa estratégia típica de alimentação permite a liberação de proteínas efetoras pela saliva dentro de células hospedeiras (BOS et al., 2010; BOS; HOGENHOUT, 2012). Como exemplo, em resposta a afídeos pode ser desencadeada uma resposta de defesa caracterizada

por influxos de Ca^{2+} que provocam o entupimento de elementos crivados, impedindo a alimentação do herbívoro. A saliva do afídeo contém proteínas de ligação a cálcio que previnem a união de Ca^{2+} a proteínas do elemento crivado, suprimindo este mecanismo de defesa (WILL et al., 2007). A atuação de efetores de herbívoros com outras estratégias de alimentação, tais como mastigadores, tem sido relatada em estudos que utilizam a aplicação de secreção oral de tais herbívoros, ao invés da infestação com os mesmos (VERHAGE et al., 2011).

Acredita-se que um dos passos requeridos para o estabelecimento de uma interação compatível seja a modulação de respostas de defesa das plantas pela saliva injetada e, possivelmente, a gama de hospedeiros de um herbívoro seja limitada pela habilidade do mesmo em ativamente suprimir essas respostas (BOS; HOGENHOUT, 2012). É possível, portanto, que a ampla gama de hospedeiros verificada para herbívoros polífagos, como é o caso do ácaro *B. phoenicis*, reflita um vasto repertório de estratégias de supressão da resposta imune.

5.10 Avaliação da resposta de *Arabidospis thaliana* à infestação com ácaros virulíferos

Devido ao fato de a transmissão do CiLV-C ser necessariamente mediada pelo ácaro vetor, a resposta à infecção pelo vírus em *A. thaliana* apresenta o componente da resposta à infestação pelo ácaro. No entanto, a fim de compreender a resposta à infecção com o vírus, neste trabalho é mostrada uma comparação entre os dados obtidos para plantas infestadas com ácaros virulíferos em relação àquelas infestadas com ácaros avirulíferos. Desse modo, os resultados aqui apresentados referem-se à interação *A. thaliana* - CiLV-C.

5.10.1 Via de SA

Em resposta à presença do vírus, foi possível observar uma ativação da via de SA, visto que todos os genes estudados da via apresentaram indução maior na presença dos dois estímulos (ácaros e vírus) em ao menos um ponto do *time course*, com exceção do *PAD4* (Figura 14).

A análise por qPCR demostrou que são induzidos genes atuantes na biossíntese (*ICS1*), translocação (EDS5), transdução de sinal (*NPR1*), ativação

transcricional (*WRKY70, TGA3*) e defesa (*PR1, PR5*) (Figura 14). O maior acúmulo de transcritos em plantas infectadas com o vírus pode ser resultado de ao menos duas razões. Por um lado, maior número de células é afetado pelo vírus, expressando a via de defesa. Enquanto o ácaro afeta apenas células das quais se alimenta, os vírus por ele inoculados se multiplicam e realizam um movimento célula-a-célula em torno do sítio de inoculação, de forma que o número de células afetadas pela infecção viral é maior. Por outro lado, a presença do CiLV-C pode constituir um estímulo qualitativamente superior ao ácaro, já que a multiplicação viral representa um transtorno morfofisiológico ao nível subcelular, celular e dos tecidos ao redor do sítio de inoculação.

Os genes associados às etapas iniciais da via - biossíntese (*ICS1*) e translocação (*EDS5*) de AS - foram encontrados induzidos logo no tempo inicial de 6 hai. Os demais genes, atuantes *downstream* ao acúmulo de SA, foram induzidos em tempos posteriores da avaliação. Altos níveis de transcritos do fator de transcrição TGA3 e da proteína de defesa PR5 foram observados em 12 hai, enquanto um acúmulo de mRNA correspondente ao fator de transcrição WRK70, à proteína reguladora NPR1 e à proteína de defesa PR1 foram observados no tempo sintomas. De forma geral (exceto para o *TGA3* e *PR5*), uma maior expressão dos genes correlacionou com o maior acúmulo do CiLV-C. Os maiores valores de fold-change e o maior número de cópias virais (Figura 11) foram ambos detectados no tempo sintomas.

Patógenos biotróficos tipicamente ativam defesas mediadas por SA (DERKSEN et al., 2013), assim como os vírus de RNA (WHITHAM et al., 2003). Neste contexto, uma análise de cinco vírus de RNA distintos revelou que eles elicitam um conjunto comum de genes em plantas suscetíveis de Arabidopsis, grande parte deles associados à via de SA (WHITHAM et al., 2003; 2006). Portanto, a resposta encontrada na interação *A. thalianal* CiLV-C condiz com a frequente ativação da via de SA na interação com patógenos deste tipo.

Das duas vias responsáveis pela biossíntese de SA na célula vegetal, fenilpropanóide e via do corismato, a segunda representa a principal em respostas de defesa e é mediada pela proteína isocorismato sintase ICS1 (WILDERMUTH et al., 2001). A indução da ICS1 foi observada em interações vírus-planta distintas, tais como entre o geminivirus (ssDNA) *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) e Arabidopsis (ASCENCIO-IBÁÑEZ et al., 2008) ou entre o tombusvirus (ssRNA) *Panicum mosaic*

virus (PMV) e *Brachypodium distachyon* (MANDADI; SCHOLTHOF, 2012). O acúmulo de transcritos de *ICS1* observado no presente trabalho sugere que, assim como verificado em outras infecções virais, a via do corismato pode ser também responsável pela biossíntese de SA em resposta ao CiLV-C.

O transporte de SA do cloroplasto ao citoplasma, mediado pela proteína EDS5, também foi potencializado em resposta ao CiLV-C e em outras infecções virais. Um aumento na expressão de EDS5 ocorre em folhas do ecótipo C24 de Arabidopsis após a inoculação com uma linhagem (Y) de *Cucumber mosaic virus* (CMV-Y) (ISHIHARA et al., 2004). Atestando o papel do EDS5 na defesa contra vírus, mutantes *eds5* são comprometidos na resistência ao CMV (SEKINE et al., 2004) e a expressão constitutiva do EDS5 em Arabidopsis aumenta a resistência contra o CMV(Y) e linhagens virulentas de CMV e *Turnip crinkle virus* (TCV) (ISHIHARA et al., 2008). É possível ainda que, em adição ao seu envolvimento no acúmulo de SA, a EDS5 esteja envolvida na translocação de outras moléculas orgânicas que poderiam modular a defesa de plantas contra patógenos por mecanismos independentes de SA (ISHIHARA et al., 2008).

O acúmulo de SA no citoplasma promove a indução da proteína NPR1, a qual, atuando como co-fator de fatores de transcrição, representa o principal regulador transcricional da via (SPOEL et al., 2009). A indução da NPR1 pode ser observada em outras infecções virais (ASCENCIO-IBÁÑEZ et al., 2008). Demonstrando a importância da proteína para a indução dos genes responsivos ao SA, a reprogramação transcricional massiva que conduz à SAR é regulada por uma cascata de eventos iniciada pela NPR1. Alvos transcricionais diretos de NPR1 incluem genes envolvidos na síntese e secreção de proteinas PR antimicrobianas (WANG et al., 2006). No entanto, apesar de seu papel preponderante em interações com patógenos distintos, existe uma via independente de NPR1 que também leva à expressão de genes de defesa (CLARKE et al., 2000). No contexto de infecções virais, a maioria das respostas mediadas por SA ativadas aparentemente é independente de NPR1, com algumas exceções tais como a indução do gene *PR1* (WHITHAM et al., 2003). Neste contexto, acredita-se que a via seja ramificada após o acúmulo de SA em um braço dependente e outro independente de NPR1 (WHITHAM et al., 2006). O acúmulo de transcritos de *NPR1* neste trabalho, identificado no tempo sintomas, indica que ao menos a via dependente de NPR1 é ativada em resposta ao CiLV-C, promovendo a indução do gene *PR1*.

Fatores de transcrição envolvidos na expressão de genes associados à via de SA em resposta a patógenos, incluindo vírus distintos, são principalmente os das famílias WRKY e TGA. Ambos os fatores interagem com NPR1 e seus papéis relevantes em defesas contra patógenos têm sido bem estabelecidos, atuando positivamente ou negativamente na regulação de tais respostas. O TGA3 é um importante ativador da expressão basal e induzida de genes PR, incluindo o *PR1* (KESARWANI et al., 2007). Mutantes *tga3* mostram diferentes graus de aumento da susceptibilidade à *Pseudomonas syringae* e uma redução na indução de genes *PR* (KESARWANI et al., 2007). Duplos mutantes *tga3 npr1* mostram uma susceptibilidade ainda maior que os mutantes simples para os mesmos genes, o que demonstra que a função do TGA3 não é completamente dependente de NPR1 (KESARWANI et al*.,* 2007). Considerando a resposta de *A. thaliana* ao CiLV-C, esta observação permite explicar a indução na expressão do *TGA3* em um tempo anterior à expressão da proteína reguladora frequentemente associada a ele, NPR1.

Assim como o TGA3, o WRKY70 é também um importante regulador positivo da expressão de genes *PR*. Sua superexpressão resulta em elevada resistência aos patógenos *Pseudomonas syringae* e *Erwinia carotovora* supsp *carotovora* (ASAI et al*.,* 2002; CHEN; CHEN, 2002; LI et al.., 2004). Em relação a interações planta-vírus, o WRKY70 é também essencial à resistência mediada pelo gene RCY1 ao CMV(Y), sendo induzido em resposta à inoculação em hospedeiros incompatíveis e promovendo a indução a indução do gene *PR1* e uma redução no acúmulo do vírus (ANDO et al*.,* 2014). Ademais, o WRKY70 parece desempenhar apenas um papel crítico na multiplicação do vírus, mas não no desenvolvimento da morte celular por HR (ANDO et al., 2014). Ambos os fatores de transcrição avaliados no presente trabalho, WRKY70 e TGA3, foram também encontrados induzidos na resposta de Arabidopsis ao CaLCuV (ASCENCIO-IBÁÑEZ et al., 2008). Na interação entre Arabidopsis e CiLV-C, tais fatores podem estar envolvidos na expressão de genes de defesa responsivos ao SA, incluindo o *PR1*, também encontrado induzido neste trabalho.

Os principais genes de defesa ao final das vias de sinalização são os da classe PR, os quais podem atuar diretamente na restrição do desenvolvimento ou espalhamento do patógeno na planta. Diferentes conjuntos de proteínas PR podem ser induzidas em resposta a patógenos distintos. Os genes *PR1* e *PR5* são

frequentemente induzidos pela via de SA em resposta a vírus, razão pela qual eles foram analisadas durante a interação CiLV-C/Arabidospsis.

Numerosos trabalhos avaliando interações de Arabidopsis com vírus como *Tobacco mosaic virus* (TMV) (BUCHEL; LINTHORST, 1999; JI; DING, 2001), CaLCuV (ASCENCIO-IBÁÑEZ et al.., 2008), CMV (ANDO et al., 2014; HUANG et al., 2005), *Oilseed rape mosaic virus* (ORMV) (HUANG et al., 2005) ou *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (LOVE et al., 2005) relatam a indução dos genes *PR1* e *PR5*. Nestas interações, a expressão dos genes PR é anulada em mutantes incapazes de acumular SA, indicando uma total dependência do SA por tais respostas. *Downstream* ao AS, a indução de *PR1* mostra ser completamente dependente de NPR1. Em contraste, um aumento na expressão de *PR5* não requer NPR1 (WHITHAM et al., 2006). Isso sugere que o controle da expressão de tais genes se ramifica em uma via dependente e outra independente de NPR1 após o acúmulo de AS (WHITHAM et al., 2006). No caso da interação CiLV-C/Arabidospsis, os genes *PR1* e *PR5* também foram encontrados induzidos. A indução na expressão do gene *PR1* foi observada apenas no tempo sintomas, quando ocorreu também o acúmulo de transcritos de *NPR1*, enquanto o aumento da expressão do gene *PR5* foi detectado em um tempo anterior (12 hai), sugerindo a ramificação da via.

Há numerosos relatos de que a infecção viral estimula a sinalização de SA, tanto em hospedeiros incompatíveis como em compatíveis (LOVE et al., 2007). Em hospedeiros compatíveis, no entanto, a via de SA aparentemente não exerce um papel preponderante na resistência ao vírus. Neste contexto, mutantes de Arabidopsis para genes distintos da via de AS (*pad4, eds5* e *npr1*) submetidos às interações compatíveis com CMV(Y) e ORMV foram monitorados quanto à expressão de genes responsivos à via, acúmulo viral e desenvolvimento de sintomas (HUANG et al., 2005). Como resultado, foi observada uma redução da expressão de genes de defesa; no entanto, nenhum dos mutantes mostrou um aumento na susceptibilidade aos vírus avaliados (maior acúmulo viral ou sintomas mais severos). Outros trabalhos relatam resultados similares: mutantes capazes de acumular altos níveis de SA e proteínas PR não se tornam mais resistentes ao CMV (SEKINE et al., 2004) e mutantes incapazes de acumular SA não demonstram um aumento na suscetibilidade ao CaMV (MAYERS et al., 2005). Em contraste, em interações incompatíveis, a resistência mostra um requerimento absoluto pela via de SA. Como exemplo, as respostas de defesa mediadas pelos genes de resistência *RCY1* e *HRT*

a CMV(Y) e TCV, respectivamente, em Arabidopsis (KACHROO et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2002) e pelo gene de resistência *N* ao TMV em tabaco (GAFFNEY et al., 1993) requerem o acúmulo de SA, sendo suprimidas em plantas transgênicas que expressam a enzima salicylate desidrogenase (NahG).

Sugere-se, portanto, que hospedeiros compatíveis e incompatíveis compartilham uma via de sinalização comum que promove a expressão de genes de defesa; no entanto, a expressão elevada de tais genes não apresenta efeitos negativos em interações compatíveis (HUANG et al., 2005). Entre outras hipóteses, é possivel que os vírus suprimam estas respostas de defesa em interações compatÍveis, de maneira similar a como eles suprimem o silenciamento de RNA (HUANG et al., 2005). Alternativamente, esta resposta inefetiva nas interações compatíveis pode simplesmente ocorrer em função de uma falta de velocidade ou magnitude necessária para conter a infecção viral. Neste contexto, frequentemente, o atraso na indução de uma resposta de defesa ou a expressão insuficiente é o que diferencia interações compatíveis e incompatíveis (TAO et al., 2003).

Quando efetiva, a via de SA pode exercer um papel antiviral tanto na replicação quanto no movimento do vírus. Suprimindo a replicação viral, o tratamento com SA atua na resistência basal ao *Alfalfa mosaic virus* (AlMV) em feijão-de-corda, e ao TMV e *Potato virus X* (PVX) em tabaco (VAN HUIJSDUIJNEN et al., 1986; CHIVASA; CARR, 1998; NAYLOR et al., 1998). Afetando o movimento viral, o tratamento com AS é capaz de restringir o transporte à longa distância do CMV em plantas de tabaco e Arabidopsis (NAYLOR et al., 1998; MAYERS et al, 2005; ISHIHARA et al., 2008). A atuação da via de SA sobre um dos dois processos depende ainda da combinação vírus-hospedeiro, visto que, ao contrário da interação com tabaco, em abóbora a resistência mediada por SA ao CMV atua sobre a replicação do vírus (MAYERS et al., 2005).

Vale ressaltar, porém, que a resposta de hospedeiros que desenvolvem sintomas de leprose ainda não está bem caracterizada. Segundo Huang et al. (2005), interações compatíveis resultam em infecções sistêmicas tipicamente acompanhadas pelo surgimento de sintomas da doença, enquanto interações incompatíveis resultam na cessação da replicação ou movimento do vírus no sítio de inoculação ou próximo dele. Em plantas consideradas suscetíveis à leprose, e portanto compatíveis, o movimento do vírus é restrito ao local de inoculação, de

maneira similar a uma interação incompatível, provocando as lesões características da doença.

Os resultados deste trabalho atestam que há uma ativação da via de SA na infecção de Arabidopsis pelo CiLV-C, de maneira similar à resposta genérica observada em interações planta-vírus. No entanto, não se sabe o impacto da expressão destes genes no resultado da interação. É possível que a via ativada exerça um efeito negativo sobre a replicação ou ainda sobre o movimento à longa-distância do vírus, contribuindo para a incapacidade do mesmo em atingir o floema e invadir a planta sistemicamente. Alternativamente, a via ativada pode ser simplesmente inefetiva, como observado frequentemente em interações compatíveis. Neste caso, a ausência do movimento sistêmico não teria influência dos genes de defesa ativados, mas sim de outros fatores, possivelmente intrínsecos ao vírus e não à planta.

5.10.2 Vias de JA/ET

Ao contrário da consistente ativação da via de SA na interação CiLV-C/Arabidopsis, a análise das vias de JA e ET revelou padrões de expressão distintos para cada um dos genes avaliados. Embora em tempos distintos, os genes *JAR1* e *ETR1*, os quais codificam receptores de JA e ET, respectivamente, foram induzidos. Os demais genes, *EIN2, MYC2* e *PDF1.2,* atuantes em etapas *downstream* das vias, foram reprimidos (Figura 15). De forma geral, o comportamento dos perfis de expressão destes genes pode ser explicado em função da influência da via de SA sobre os mesmos como resultado do intenso *cross-talk* entre as vias.

Muitos exemplos de cross-talk negativos e positivos entre as vias de SA, JA e ET tem sido documentados. Entre estes, o mais bem conhecido é o antagonismo entre as vias de sinalização de SA e JA, no qual a ativação da primeira reprime a segunda (AN; MOU, 2011; VAN DER DOES et al., 2013). Este antagonismo representa uma estratégia da planta para economizar seus recursos, alocando-os para a defesa contra um agressor específico. Como consequência, a infecção por patógenos biotróficos, associados à via de SA, tipicamente suprime defesas contra herbívoros ou patógenos necrotróficos, associados à via de JA. Ou seja, a planta prioriza o investimento de recursos em defesas associadas a SA em detrimento a defesas associadas a JA (KOORNEEF et al., 2008; PIETERSE et al., 2009).

Diversas proteínas que regulam o crosstalk entre SA e JA/ET tem sido identificadas. Entre estas, encontram-se as glutaredoxinas (GRX), os fatores de transcrição WRKY70 e TGA e a reguladora NPR1, proteínas envolvidas tanto na indução de genes responsivos ao SA quanto na inibição de genes responsivos ao JA. A GRX480 interage com fatores de transcrição TGA, associados à via de SA, bloqueando o a expressão do gene *PDF1.2*. Indicando que as proteínas citadas efetivamente regulam o cross-talk SA-JA, mutantes quádruplos *tga2356* são comprometidos na supressão da via de JA mediada por SA e plantas transgênicas expressando GRX480 têm a expressão de *PDF1.2* debilitada (NDAMUKONG et al., 2007; ZANDER et al., 2009). Da mesma maneira, a superexpressão do WRK70, enquanto resulta na expressão constitutiva dos genes *PR*, reprime a expressão do *PDF1.2* (LI et al., 2004). A proteína NPR1, por sua vez, regula as três proteínas envolvidas no antagonismo, GRX480, WRKY70 e TGA. A localizacao nuclear da NPR1 é essencial para a expressao de genes de defesa responsivos ao SA, mas não para a supressao da via de JA mediada por SA, indicando que o cross-talk SA-JA provavelmente é mediado pela NPR1 citosólica (PIETERSE et al., 2009).

Em resposta à interação de *A. thaliana* com ácaros virulíferos portando o CiLV-C, puderam ser observados indícios da repressão das vias de JA/ET pela via de SA. No tempo sintomas, em que a ativação da via de SA é mais proeminente, há um aumento na expressão de *NPR1*, *WRK70* e *TGA3*, responsivos ao SA e sabidamente atuantes no antagonismo em questão. Em correlação com esta superexpressão, foram reprimidos o fator de transcrição *MYC2* e o gene de defesa *PDF1.2*, ambos responsivos a JA.

Embora muitos trabalhos relatem uma interação antagonística entre as vias de SA e JA/ET, interações sinergísticas tambem já foram descritas (SCHENK et al., 2000; VAN WEES et al., 2000; MUR et al., 2006). Como exemplo, em Arabidopsis, o tratamento com baixas concentrações de JA e SA resulta em um efeito sinergístico nos genes *PDF1.2* e *PR1*, responsivos a JA e SA, respectivamente. No entanto, em altas concentrações dos mesmos hormônios os efeitos são antagonísticos, demonstrando que o resultado da interação entre as vias depende da concentração relativa de cada hormônio (MUR et al., 2006; SPOEL; DONG, 2012; BOATWRIGHT; PAJEROWKSA-MUKHTAR, 2013). Na interação CiLV-C/Arabidopsis os resultados obtidos também podem refletir a influência da concentração dos hormônios envolvidos no resultado final da interação. Espera-se que as concentrações dos

hormônios sejam menores nos tempos iniciais, o que pode ser suposto para o SA em função do aumento crescente na expressão das enzimas envolvidas no acúmulo do hormônio, ICS1 e EDS5, ao longo do tempo avaliado. No tempo 24 hai, onde portanto considera-se uma concentração ainda baixa de SA, há uma expressão simultânea de *PR1* e *PDF1.2*. Quando se atinge o tempo sintomas, onde a concentração de SA é possivelmente maior, tendo em vista a elevada expressão de *ICS1* e *EDS5*, é clara a elevação na expressão de *PR1* e redução de *PDF1.2*.

O *cross-talk* SA-JA descrito ocorre, portanto, *downstream* nas vias de JA/ET, ao nível de transcrição dos genes responsivos ao hormônio. Os demais genes avaliados, *ETR1* e *JAR1* atuam em etapas iniciais da via, ao nível da percepção dos hormônios ET e JA. Portanto, o antanogismo descrito não os afeta diretamente, o que explicaria o fato de os mesmos não terem sido reprimidos.

Ao contrário, uma interação sinergística entre genes das vias de SA e ET, incluindo o receptor ETR1, tem sido frequentemente descrita. Como exemplo, em uma planta resistente de Arabidopsis, as vias ET e SA mostraram atuar sinergisticamente contra um isolado avirulento de CMV (TAKAHASHI et al., 2002). Da mesma maneira, estudos mostram que o ET opera sinergisticamente com SA na indução de *PR1* (DE VOS et al*.,* 2006). Além disso, estudos com plantas de tabaco insensíveis ao ET infectadas com TMV revelaram que a percepção do ET é requerida para a síntese de moléculas sinais que ativam o acúmulo de SA, a expressão de genes *PR* e o desenvolvimento da SAR em tecidos sistêmicos (VERBERNE et al., 2003). Por fim, um trabalho revelou que o ET modula o resultado final da interação entre SA-JA, afetando o requerimento por NPR1 (LEON-REYS et al., 2009). Neste caso os autores propuseram que, por um lado, o ET potencializa a expressão do gene *PR1* de uma maneira dependente de NPR1; enquanto por outro lado o ET ultrapassa a necessidade de NPR1 no *cross-talk* entre as vias. Acredita-se que a sinalização de ET promova a alocação de mais NPR1 no núcleo para auxiliar a expressão de genes responsivos ao SA, enquanto compensa a falta de NPR1 no citosol auxiliando na supressão de genes responsivos a JA de uma maneira independente de NPR1 (LEON REYS et al., 2009).

A ativação da via de ET foi descrita em outras interações virais. Como exemplo, os geminivirus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) e *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) são capazes de afetar o metabolismo de ET, ativando principalmente genes envolvidos na biossíntese do hormônio (WANG et al., 2002). A

indução do receptor de etileno em todos os tempos avaliados em resposta ao CiLV-C sugere um acúmulo do hormônio e uma possível ativação sinergística de ET e SA na resposta ao vírus. Assim como proposto em outras interações, a ativação na percepção do etileno pode estar associada à indução na expressão do gene *PR1*, verificada na presença do CiLV-C.

5.10.3 Silenciamento de RNA

Além da via de SA, a resposta a vírus distintos está frequentemente associada à ativação do mecanismo de silenciamento de RNA. Porém, no estudo da interação ácaro/CiLV-C/Arabidopsis, a resposta dos genes da via de SA nas plantas infestadas apenas com ácaros seguiu o mesmo comportamento das infestadas com ácaros portando o vírus. De forma geral, todos os genes associados à via de SA foram induzidos, com um acúmulo maior de transcritos em plantas que receberam os dois estímulos. Ao contrário, a análise dos genes envolvidos no silenciamento de RNA revelou padrões distintos de expressão para a resposta a ácaros avirulíferos e virulíferos, sendo possível observar respostas específicas ao vírus (Figura 16).

Um aumento nos níveis de *RDR6* foi identificado em 6 hai, enquanto um acúmulo de transcritos dos genes *DCL2, AGO1* e *HEN1* foi observado em 12 hai. Tais genes foram inicialmente induzidos e progressivamente reprimidos. No tempo sintomas, foi verificada uma indução do gene *AGO2*, específica a plantas virulíferas. Por outro lado, uma redução nos níveis de *DCL4* foram observados a partir de 24 hai (Figura 16). A indução de genes associados ao silenciamento sugere um envolvimento do mecanismo na resposta especificamente de *A. thaliana* ao CiLV-C.

Os vírus de RNA codificam suas próprias RNA polimerases dependentes de RNA (RdRps), as quais sintetizam intermediários de dsRNA durante o processo de replicação, e estas são suficientes para induzir o silenciamento antiviral em organismos que não possuem RDRs endógenas como *Drosophila melanogaster* (ALIYARI et al., 2008). Em plantas, no entanto, o silenciamento antiviral requer diretamente uma função de RDR hospedeira para a amplificação de siRNAs virais, realizada tanto pela RDR1 quanto pela RDR6. Após indução do silenciamento antiviral pelos siRNAs virais primários, derivados a partir dos dsRNAs gerados no processo de replicação, novos dsRNAs virais são sintetizados pela RDR1 ou RDR6,

os quais são processados em siRNAs secundários para direcionar um silenciamento antiviral mais potente (WANG et al., 2010). Demonstrando a importância da RDR6 para o silenciamento viral, mutantes *rdr6* exibem elevada susceptibilidade a vírus de RNA distintos, tais como CMV (WANG et al., 2010), PVX e *Potato virus Y* (PVY) (SCHWACH et al., 2005). A hipersusceptibilidade ao PVX em tais mutantes está associada à invasão do meristema da planta infectada pelo vírus, indicando que a RDR6 atua ainda na exclusão meristemática viral (SCHWACH et al., 2005). Por fim, a RDR6 é essencial à restrição da infecção sistêmica pelo TuMV sem supressor de silenciamento (GARCIA-RUIZ et al., 2010). A indução da RDR6 em resposta à infecção pelo vírus da leprose sugere um papel da proteína na geração de siRNAs derivados do vírus.

Os dsRNAs amplificados a partir de RDRs ou intermediários replicativos virais são processados por enzimas DCL em siRNAs virais. Em *A. thaliana*, as enzimas DCL4 e DCL2 atuam na defesa antiviral de uma maneira hierárquica e redundante (DELERIS et al., 2006; GARCIA-RUIZ et al., 2010). A DCL4 representa a barreira primária e cataliza a formação de siRNAs de 21 nucleotídeos, enquanto a DCL2 atua de maneira secundária e gera siRNAs de 22 nucleotídeos (GARCIA-RUIZ et al., 2010). A DCL2 atua proeminentemente quando a DCL4 é geneticamente removida ou suprimida (DELERIS et al., 2006). Em concordância com estas observações, a infecção pelo CiLV-C revelou uma indução da DCL2 em conjunto com uma supressão da DCL4. Inúmeros trabalhos mostram o papel crítico da DCL2 no silenciamento viral. Como exemplo, a virulência de CMV deficientes para seu VSR é completamente restaurada em mutantes *dcl2* (WANG et al., 2010) e, em condições que permitem uma severa replicação do TCV em *A. thaliana*, mutantes *dcl2* morrem em função da infecção pelo vírus, enquanto plantas selvagens sobrevivem (ZHANG et al., 2012). Da mesma maneira, a DCL2 pode estar envolvida em um possível silenciamento do CiLV-C em plantas de *A. thaliana*.

Após o processamento por enzimas DCL, os siRNAs gerados são recrutados por proteínas AGO, como parte de RISCs, para direcionar o silenciamento de RNAs virais. Na interação CiLV-C/Arabidospis é de grande destaque a ativação do AGO2. Este gene já havia sido identificado em um trabalho anterior, no qual foi estudada a resposta global de genótipos resistente e suscetível de citros ao CiLV-C através de análises de microarranjos (KUBO, 2011).

Recentemente, foi demonstrado que AGO2 atua como uma segunda linha de defesa, ativada apenas quando a primeira, AGO1, não está funcional (HARVEY et al., 2011). A regulação em questão ocorre ao nível pós-transcricional, sendo os níveis de transcritos de *AGO2* regulados por um RISC constituído de AGO1 em associação com o microRNA miR403, impedindo que *AGO2* seja expresso. Para que a proteína AGO2 seja expressa, é necessário, portanto, inativar este complexo. Alguns vírus apresentam supressores (VSRs) capazes de se ligar a AGO1 e inativá-lo, a exemplo das proteínas 2b do CMV (ZHANG et al., 2006) e p38 do TCV (AZEVEDO et al., 2010). A inativação pela p38 ocorre através da presença de um motivo triptofano-glicina (WG) na mesma, que atua como um gancho para se ligar a AGO1, mimetizando proteínas hospedeiras celulares contendo este mesmo motivo que fazem parte de RISCs funcionais. Há, portanto, uma competição entre VSRs e proteínas hospedeiras pela ligação ao AGO1. Na ausência do VSR, AGO1 e proteínas hospedeiras formam RISCs ativos; na sua presença, o AGO1 pode ser sequestrado e inativado (AZEVEDO et al., 2010; JIN; ZHU, 2010). Desta forma, a presença do VSR provoca uma inativação da primeira linha de defesa e como consequência uma liberação do estado de inibição da expressão de *AGO2*, ativando esta segunda linha de defesa, capaz de limitar o acúmulo viral (HARVEY et al., 2011). Por conclusão, assume-se que haverá um aumento nos níveis de transcritos de *AGO2*. De fato, foi demonstrado que em plantas de Arabidopsis mutantes para *AGO1*, o AGO2 é expresso a um nível 4,6 vezes maior em relação às plantas selvagens (KURIHARA et al., 2009). Em plantas infectadas por TCV e CMV, ambos capazes de inativar AGO1 por meio de seus supressores, ocorre um aumento nos níveis proteicos de AGO2, sendo este nível similar ao encontrado em mutantes *ago1* (HARVEY et al., 2011).

Em adição à indução de AGO2, a inativação de AGO1 pela p38 do TCV interfere também com a interação homeostática entre as quatro DCLs de Arabidopsis (AZEVEDO et al., 2010). Naturalmente, o AGO1 intermedia a atividade do miRNA miR162, que reduz o acúmulo de DCL1 (XIE et al., 2003). A DCL1, por sua vez, regula negativamente os níveis de DCL4, possivelmente ao nível transcricional. Em consequência, a supressão do AGO1 pelo TCV leva a uma hiperindução de DCL1 e consequentemente um decréscimo nos níveis de DCL4, permitindo que a DCL2 exerça seu papel antiviral (DELERIS et al., 2006; AZEVEDO et al., 2010).

A regulação de AGO2 e DCL4 por AGO1 relatada em TCV se assemelha ao cenário encontrado na infecção de Arabidopsis pelo CiLV-C. Os níveis de mRNA correspondentes ao *AGO1* foram inicialmente induzidos, decrescendo em outros tempos avaliados, enquanto no tempo sintomas os níveis de transcritos de *AGO2* foram diferencialmente elevados e de *DCL4* reduzidos. Estudos *in silico* conduzidos por nosso grupo revelaram a presença do motivo WG na porção C-terminal da RdRp do CiLV-C (Figura 17, dados não publicados). Em conjunto com o padrão de expressão de *AGO1* e *AGO2* na presença do vírus da leprose, este dado sugere que a RdRp possa ter uma atividade supressora, inativando AGO1 e como consequência induzindo a expressão de *AGO2*. Desta forma, o vírus apresentaria de fato uma proteína supressora capaz de superar a primeira linha de defesa, porém em resposta o hospedeiro ativaria uma segunda linha de defesa. Esta segunda linha, mediada por AGO2, poderia ser capaz de reduzir o acúmulo do vírus ou até mesmo restringir o movimento viral.

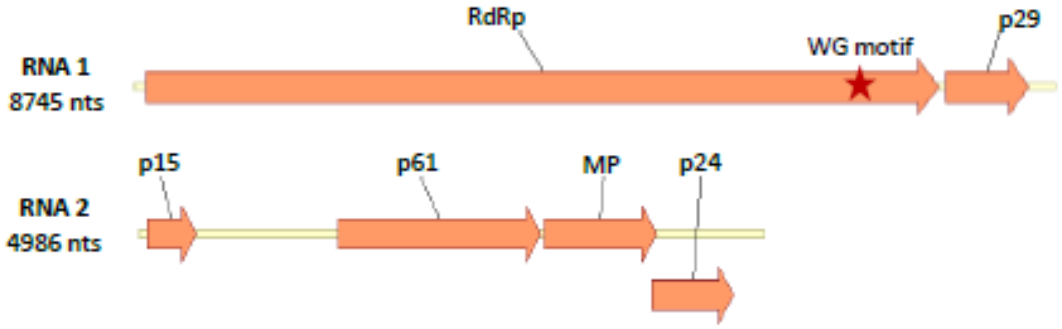

Figura 17 - Organização genômica do CiLV-C. RdRp: RNA dependent RNA polymerase, MP: movement protein. A estrela indica a posição do motivo WG.

O silenciamento de RNA é capaz de restringir o movimento viral (VUORINEN et al., 2011). Por um lado, várias linhas de evidência sugerem que este mecanismo é hiperativado em células que controlam o acesso ao floema (MARATHE et al., 2000), impedindo o movimento à longa distância e consequente espalhamento sistêmico de vírus distintos. Por outro lado, muitas proteínas virais, posteriormente identificadas como VSRs, suprimem este mecanismo de defesa, contribuindo ao estabelecimento e manutenção de infecções sistêmicas (SCHOLTHOF et al., 2005). Desta forma, diversos trabalhos demonstram que vírus mutantes debilitados em sua habilidade de suprimir o silenciamento são incapazes de infectar plantas sistemicamente, mas este movimento à longa-distância é restaurado em co-infecções com outras espécies

virais que possuam VSRs funcionais, em plantas mutantes para as proteínas responsáveis pelo silenciamento de RNA ou em plantas transgênicas expressando VSRs (DING et al.; 1996; CHU et al., 2000; JI; DING 2001; KASSCHAU; CARRINGTON, 2001; RYABOV et al., 2001; QU; MORRIS, 2002; RYANG et al., 2004; DELÉRIS et al., 2006; WEGE; SIEGMUND, 2007; LEWSEY et al., 2010; CAO et al., 2010; FAGOAGA et al., 2011; Vuorinen et al., 2011).

Como exemplo, linhagens modificadas de CMV, *Tobacco etch virus* (TEV), TCV e *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) que não expressam as proteínas supressoras 2b, HC-Pro, p38 e p19, respectivamente, são incapazes de se mover sistemicamente em determinados hospedeiros (DING et al., 1996; CHU et al., 2000; KASSCHAU; CARRINGTON, 2001; QU; MORRIS, 2002; DELÉRIS et al., 2006). A co-infecção de tabaco com CMV e PVY permite que o PVY, normalmente restrito às células externas do floema neste hospedeiro, atinja as células internas do floema e se espalhe por todos os tecidos (RYANG et al., 2004). Com objetivo contrário, as co-infecções de *Abutilon mosaic virus* (AbMV) e *Potato leafroll virus* (PLRV) com CMV e *Pea enation mosaic virus 2* (PEMV-2), respectivamente, permitem que os primeiros vírus citados deixem de ser limitados ao floema em função da supressão do silenciamento exercida pelos segundos (RYABOV et al., 2001; WEGE; SIEGMUND, 2007). Em plantas de Arabidopsis mutantes para genes-chave do silenciamento de RNA, mas não em plantas selvagens, linhagens mutantes de TCV incapazes de produzir a capa proteica, que atua como VSR e é necessária para a proteção do genoma viral na entrada ao floema, são capazes de entrar no floema e invadir a planta sistemicamente (CAO et al., 2010). Finalmente, a expressão constitutiva da proteína p23, VSR codificada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), facilita o movimento à longa-distância no floema do hospedeiro resistente (laranja-azeda) e permite que o vírus restrito ao floema escape do mesmo em ambos os hospedeiros resistente e suscetível (laranja-doce) (FAGOAGA et al., 2011).

Sabe-se que o CiLV-C permanece restrito ao movimento célula-a-célula em torno do sítio de infecção e não atinge o floema, sendo possível encontrar partículas virais nas células da epiderme e parênquima, mas nunca na região vascular (EW KITAJIMA, dados não publicados). Existe, portanto, a possibilidade de que algum mecanismo de inibição da movimentação viral esteja envolvido na resposta da planta à doença. Uma possível hipótese é a de que o silenciamento de RNA exerça este papel, tendo em vista seu papel bem descrito em restringir o movimento de vírus

distintos e sua aparente hiperativação em células próximas ao floema. Alguns vírus, inoculados por seus vetores diretamente no sistema vascular, a exemplo dos polerovirus, tornam-se restritos ao floema por não serem capazes de suprimir o silenciamento antiviral e invadir outras células (RYABOV et al., 2001). Como o estilete do ácaro *B. phoenicis* não alcança o floema por ser muito curto (EW KITAJIMA, dados não publicados), pode-se hipotetizar que o vírus da leprose seria inoculado em células mais superficiais do tecido e o silenciamento de RNA o impediria de entrar no floema e invadir o hospedeiro sistemicamente.

Alternativamente, ao invés de influenciar o movimento sistêmico do vírus, o silenciamento pode atuar contendo a replicação do CiLV-C, papel sabidamente exercido por esta maquinaria. A inibição do acúmulo viral em função do silenciamento é frequentemente descrita para inúmeras outras interações, o que o coloca como principal mecanismo de resistência a vírus. Ilustrando a importância do AGO2 em tais processos, o silenciamento mediado por esta proteína promove a completa resistência de Arabidopsis pelo PVX . Enquanto plantas selvagens de Arabidopsis são consideradas não-hospedeiras para o PVX, o vírus é capaz de infectar mutantes *ago2* (JAUBERT et al., 2011). Já está também descrito o envolvimento do AGO2 na defesa de Arabidopsis contra TCV e CMV (HARVEY et al., 2011; ZHANG et al., 2012), uma vez que mutantes *ago2* exibem sintomas mais severos e níveis maiores de RNA viral quando comparados a plantas selvagens. Além de Arabidopsis, recentemente foi relatado o papel de AGO2 na resistência antiviral em *N. benthamiana*, como um componente chave na defesa anti-TBSV (SCHOLTHOF et al., 2011). Vale ressaltar que em todos os trabalhos citados, os mutantes para as demais proteínas AGO foram testados, incluindo AGO1 e AGO7, e o efeito na defesa contra os vírus estudados foi demonstrando apenas para AGO2, ressaltando a importância deste *Argonauta* em restringir o acúmulo viral. É possível, portanto, que o AGO2 exerça papel similar na interação Arabidopsis/CiLV-C, restringindo a infecção viral.

5.10.4 Considerações finais sobre a interação CiLV-C/*A. thaliana*

A análise da interação entre *A. thaliana* e o vírus da leprose dos citros C revelou a ativação de um processo multifatorial. Foi possível observar uma indução da via de sinalização de SA, resposta típica observada para vírus de RNA e

patógenos biotróficos. A ativação da via de SA possivelmente levou à uma redução da via de JA, em concordância com o conhecido antagonismo entre as vias. Por fim, foi verificada uma ativação de genes-chave do mecanismo de silenciamento de RNA. Há indícios de que o CiLV-C apresente uma atividade de VSR capaz de inibir o silenciamento mediado por AGO1, induzindo uma segunda linha de defesa mediada por AGO2.

Atualmente, sabe-se que o ácido salicílico pode atuar sobre outros mecanismos da resposta imune, como o silenciamento gênico. Uma correlação direta entre ambos os mecanismos é verificada para a RDR1, proteína chave do silenciamento antiviral, induzida em tabaco (XIE et al., 2001) e em Arabidopsis (HUNTER et al., 2013) em resposta ao SA. Em Arabidopsis, esta indução é dependente de NPR1, assim como tantos outros genes associados à via, tais como as proteínas PR (HUNTER et al., 2013). Estabelecendo mais uma ligação entre ambos, em *Nicotiana glutinosa*, a proteína 2b do CMV suprime tanto o silenciamento de RNA quanto a defesa mediada por SA contra CMV e TMV (JI; DING, 2001; LEWSEY et al., 2010). Dentro deste contexto, uma cooperação entre as defesas mediadas por SA e pelo silenciamento de RNA foi descrita para a infecção do potyvirus *Plum pox virus* (PPV) em *N. tabacum* (ALAMILLO et al., 2006). O PPV, incapaz de realizar movimento sistêmico em plantas de *N. tabacum*, invade sistemicamente plantas de tabaco transgênicas expressando um forte supressor de silenciamento (P1/HC-Pro) ou incapazes de acumular SA (NahG). O movimento à longa distância do PPV é altamente amplificado no duplo transgênico NahG x P1/HC-Pro, revelando que o silenciamento de RNA e as defesas mediadas por SA atuam de maneira aditiva para limitar a infecção pelo PPV. Os autores propuseram que o SA atua como um potencializador do silenciamento de RNA, restringindo a invasão sistêmica do vírus (ALAMILLO et al., 2006). Na infecção de Arabidopsis pelo CiLV-C, a ativação de ambas as vias pode sugerir que, de maneira similar à interação *N. tabacum*/PPV, a via de SA potencialize a ação do silenciamento de RNA sobre o vírus.

Outra idéia que tem transparecido em estudos recentes de interações vírus-planta é a acomodação do mecanismo de silenciamento de RNA e sua supressão por VSRs no clássico modelo de zig-zag da defesa de plantas. A maioria dos vírus de plantas apresenta genomas de RNA, os quais são copiados em intermediários de replicação (dsRNAs) por proteínas RDRs. Sendo um padrão intrínseco da expressão

e replicação do genoma viral, estes dsRNAs são considerados VAMPs. Como resposta, os dsRNAS são clivados por enzimas DCL, gerando siRNAs que então são acoplados a proteínas AGO e intermediam o silenciamento viral. Tem-se, portanto, uma resposta de defesa desencadeada pelo reconhecimento de padrões: PTI. Alguns vírus são capazes de burlar esta resposta de defesa, empregando efetores que suprimem o silenciamento de RNA, os VSRs, e desencadeiam, portanto, uma reação de susceptibilidade: ETS. Uma resposta do hospedeiro à supressão pelos VSRs seria o uso de proteínas R para guardar a integridade dos componentes da via de silenciamento, de forma que a perturbação destes componentes pelos VSRs poderia efetivamente ativar uma resposta de resistência secundária: a ETI (PUMPLIN; VOINNET, 2013; SANSREGRET et al., 2013).

Em concordância com esta hipótese, alguns VSRs já foram relatados como capazes de induzir mecanismos de resistência associados às vias clássicas de defesa em determinados hospedeiros. Como exemplo, a proteína supressora 2b do *Tomato aspermy virus* (TAV) elicita uma forte resistência típica de uma interação gene-a-gene em tabaco; além disso, sua região N-terminal é crítica para ambas as atividades de VSR e elicitação da resistência, sugerindo um envolvimento do mesmo domínio proteico em ambos os processos (LI et al., 1999). De maneira similar, a proteína supressora p19 do TBSV, quando expressa transgenicamente em tabaco, elicita HR (SANSREGRET et al., 2013). Quando expressa em infecções virais autênticas, a mesma proteína conduz a uma resposta imune notavelmente eficiente denominada “resistência extrema” (ER), distinta da HR por restringir o acúmulo viral sem causar morte celular, e dependente das vias clássicas de SA e ET, visto que plantas mutantes para tais hormônios não desenvolvem resistência ao TBSV (SANSREGRET et al., 2013). Tais dados fortemente sugerem o reconhecimento da atividade de VSRs pelo hospedeiro, elicitando respostas de defesa com características típicas de ETI. Constituindo um indício ainda mais evidente desta idéia, a proteína supressora p38 do TCV é o fator de aviulência reconhecido pela proteína R HRT em ecótipos específicos de *A. thaliana*, o que ativa uma resistência mediada por HR (COOLEY et al., 2000; ZHAO et al., 2000). Também notavelmente, o elicitor da proteína N, que confere resistência mediada por HR ao TMV, foi mapeado na subunidade helicase (p50) da replicase viral (p126), e este mesmo domínio foi identificado como responsável por suprimir o silenciamento de RNA em *N. benthamiana* (WANG et al., 2012). Ademais, a atividade enzimática de helicase

da p50 foi demonstrada como dispensável tanto para a resistência mediada por N quanto para a supressão do silenciamento, sugerindo que a atividade de VSR da p50 deve estimular a ETI através da ativação da proteína N. Em função de todos estes trabalhos, tem emergido a ideia de que a plantas combatem a supressão do silenciamento viral invocando um mecanismo de resistência clássico.

É possível, portanto, que a supressão de AGO1 pelo CiLV-C desencadeie, em contrapartida, uma resposta de defesa típica de PTI ou ETI em Arabidopsis. Como resultado, a via clássica de sinalização de SA seria encontrada induzida, o que foi observado nas análises de expressão realizadas neste trabalho. Após a supressão de AGO1 pelo VSR contendo o motivo WG e consequente indução de AGO2, a ativação destas respostas poderia ocorrer segundo duas hipóteses: (I) em função do reconhecimento dos siRNAs derivados do vírus pelo AGO2, desencadeando uma resposta de PTI; ou (II) do reconhecimento da ação do VSR por uma proteína R, por exemplo responsável por guardar perturbações em AGO1 desencadeando uma resposta de ETI. Em ambos os casos, a ativação da via de SA poderia culminar na indução de genes de defesa (como os genes *PR*). É favorecida a primeira hipótese, visto que o CiLV-C apresenta um grande número de hospedeiras conhecidas e em nenhuma delas realiza movimento sistêmico. A falta de especificidade a uma ou poucas hospedeiras reduz a probabilidade do envolvimento de uma proteína R nesta resposta.

Em outro cenário, é possível que o CiLV-C não apresente supressor de silenciamento ou apresente um supressor fraco. A ausência de atividade supressora poderia potencializar o efeito do silenciamento sobre sua replicação ou o impediria de atingir o floema e invadir o hospedeiro sistemicamente.

Em conclusão, a resposta elicitada pelo CiLV-C envolve dois mecanismos clássicos da resistência antiviral, o silenciamento de RNA e a defesa mediada pela via de SA. É possível que o CiLV-C interfira com o silenciamento, induzindo a ativação de genes associados à via de SA, e/ou a ativação da via de SA potencialize o silenciamento antiviral. Ambos os processos poderiam afetar a infecção viral, seja inibindo o acúmulo do vírus ou restringindo seu movimento e consequente espalhamento sistêmico na planta hospedeira. A análise da infecção do vírus em plantas mutantes para ambos os mecanismos revelará o papel de cada um no resultado da interação CiLV-C/*A. thaliana*.

5.11 Considerações sobre as análises de expressão gênica por RT-qPCR

Neste trabalho, ressalta-se a repetibilidade e consistência dos resultados, dado os reduzidos valores de desvio padrão obtidos para as amostras de um mesmo tratamento para a maior parte dos genes, permitindo revelar a significância estatística mesmo em pequenas diferenças de níveis de expressão. Esta consistência foi possível em função do grande número de repetições utilizado e da instalação de experimentos pilotos que garantiram maior robustez do trabalho. Ambos foram permitidos essencialmente devido a dois fatores: a facilidade de instalação e de avaliação de grandes experimentos em um curto período de tempo. O primeiro fator é atribuído à utilização de Arabidopsis, principalmente em função de seu pequeno porte, ciclo de vida curto, e simplicidade de cultivo e de manipulação da planta (DELATORRE ; SILVA, 2008). O segundo fator está associado à rapidez de manifestação de sintomas de leprose em Arabidopsis, correspondente em média a um quarto do tempo necessário em citros (ARENA et al., 2013).

A utilização das plantas de *Arabibopsis thaliana* nos experimentos desenvolvidos neste trabalho permitiu reduzir os problemas de inconsistência, frequentes em experimentos previamente realizados com plantas de citros, nos quais são dificultadas a obtenção de um grande número de repetições e a instalação de vários experimentos consecutivos. Ademais, a utilização de Arabidopsis em inúmeros estudos de interação planta-patógeno publicados facilitou também a realização dos experimentos de RT-qPCR, visto que não foi necessário o desenho dos primers e uma validação exaustiva dos mesmos (uma vez que, em teoria, todos já estavam validados), processos constantemente dispendiosos em tempo.

O uso de Arabidopsis como planta modelo, portanto, apresentou-se como uma estratégia ideal a estudos da leprose dos citros.

6 CONCLUSÕES

1. Um período de inoculação de 6 horas com 15 ácaros virulíferos para CiLV-C garante 100% de infecção pelo vírus em plantas de *Arabidopsis thaliana*.

2. A avaliação do transcriptoma das plantas inoculadas em um experimento de *time course* (6, 12 e 24 horas após a infestação e surgimento dos sintomas) permite detectar perfis diferenciais de expressão dos transcritos envolvidos nas vias de SA, JA e ET, assim como no silenciamento de RNA, desde o início da infecção.

3. As plantas de *A. thaliana* respondem à interação com ácaros *Brevipalpus phoenicis* e CiLV-C com a ativação da via de SA. O perfil de expressão dos genes associados à via é similar para ambos os estímulos, porém a resposta aos ácaros virulíferos para CiLV-C é mais intensa do que aos ácaros avirulíferos.

4. As vias de JA/ET são ativadas em resposta à interação com ácaros *B. phoenicis*. Em contraste, na resposta ao CiLV-C os dois braços das vias são reprimidos ao longo da infecção, o que sugere uma interferência antagonística da via de SA.

5. O mecanismo de silenciamento em *A. thaliana* é regulado de maneira diferenciada em resposta a ácaros *B. phoenicis* avirulíferos e virulíferos para CiLV-C. Diante da infecção com o vírus, a planta provavelmente reage com a ativação de uma linha principal de defesa mediada por AGO1 em tempos iniciais e posteriormente alterna para uma segunda linha mediada por AGO2.

REFERÊNCIAS

ALAMILLO, J.M.; SAENZ, P.; GARCIA, J.A. Salicylic acid-mediated and RNA silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of *plum pox virus* in tobacco. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, p. 217–227, 2006.

ALANÍS-MARTÍNEZ, E.I.; ROJAS-MARTÍNEZ, R.I.; OTERO-COLINA, G.; ROBLES-GARCÍA, P. Detección de *Citrus Leprosis Virus* tipo nuclear (CiLV-N) mediante RT-PCR en plantas de cítricos. In: CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA, 40, 2013, Oaxaca. **Revista Mexicana de Fitopatología.** Texcoco: Sociedad Mexicana de Fitopatología, 2013. p. 82.

ALIYARI, R.; WU, Q.; LI, H.W.; WANG, X.H.; LI, F.; GREEN, L.D.; HAN, C.S.; LI, W.X.; DING, S.W. Mechanism of induction and suppression of antiviral immunity directed by virus-derived small RNAs in Drosophila**.** **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 4, n. 4, p. 387-397, 2008.

ALONSO, J.M.; HIRAYAMA, T.; ROMAN, G.; NOURIZADEH, S.; ECKER, J.R. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. **Science**, Wahington DC, v. 284, p. 2148–2152, 1999.

AN, C.; MOU Z. Salicylic acid and its function in plant immunity. **Journal of Integrative Plant Biology,** Beijing, v. 53, p. 412–428, 2011.

ANDO, S.; OBINATA, A.; TAKAHASHI, H. WRKY70 interacting with RCY1 disease resistance protein is required for resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 85, p. 8-14, 2014.

ARENA, G.D.; BERGAMINI, M.P.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.S.; FREITAS-ASTÚA, J. *Citrus leprosis virus* C infects *Arabidopsis thaliana*, the model for plant-pathogen interactions. **Journal of Plant Pathology,** Bari, v. 95, n. 2, p. 447-452, 2013.

ARIMURA, G.I.; OZAWA, R.; NISHIOKA, T.; BOLAND, W.; KOCH, T.; KUEHNEMANN, F.. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. **Plant Journal,** Oxford, v. 29, p. 87–98, 2002.

ASAI, T.; TENA, G.; PLOTNIKOVA, J.; WILLMANN, M.R.; CHIU, W.L.; GOMEZ-GOMEZ, L.; BOLLER, T.; AUSUBEL, F.M.; SHEEN, J. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. **Nature**, New York, v. 415, p. 977–980, 2002.

ASCENCIO-IBANEZ, J.T.; TAE-JIN LEE, RS; MING CHU, T.; WOLFINGER, R.D.; CELLA, R.; HANLEY-BOWDOIN, L. Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. **Plant Physiology,** Minneapolis**,** v. 148, p. 436-454, 2008.

ATAMIAN, H.S.; EULGEM, T.; KALOSHIAN, I. SlWRKY70 is required for Mi-1-mediated resistance to aphids and nematodes in tomato. **Planta**, Berlim, v. 235, p. 299–309, 2012

ATTARAN, E.; ZEIER, T.E.; GRIEBEL, T.; ZEIER, J. Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 954–71, 2009.

AZEVEDO, J.; GARCIA, D.; PONTIER, D.; OHNESORGE, S.; YU, A.; GARCIA, S.; BRAUN, L.; BERGDOLL, M.; HAKIMI, M.A.; LAGRANGE, T.; VOINNET, O. Argonaute quenching and global hanges in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. **Genes & Development**, New York, v. 24, n.9, p. 904–915, 2010.

BALAZS, E.; LEBEURIER, G. Arabidopsis is a host of *cauliflower mosaic virus*. **Arabidopsis Information Service**, Frankfurt, v. 18, p. 130–134, 1981.

BARI, R.; JONES, J.D.G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, p. 473–488, 2009.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell,** Cambridge, v. 116, p. 281-297, 2004.

BASSANEZI, R.B.; LARANJEIRA, F.F. Spatial patterns of leprosis and its mite vector in commercial citrus groves in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, p. 97-106, 2007.

BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; YAKAMOTO, P.T. Adeus à leprose. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 10, p. 6-8, 2002.

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, p. 211-220, 2006.

BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.; KUBO, K.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus Leprosis: centennial of an unusual mite-virus pathosystem. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 3, p. 284-292, 2010

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; NICOLINI, F.; GUIDOTTI, A.R.; FARIAS, A.S.; NOVELLI, V.M.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Interactions between Citrus leprosis virus and its vector Brevipalpus phoenicis (Acari: tenuipalpidae). In: EUROPEAN CONGRESS OF ACAROLOGY INTEGRATIVE ACAROLOGY, 6., 2008, Montpellier. **Abstracts**... Montpellier: EURAAC, 2008a. p. 19.

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; NICOLINI, F.; SEGATTI, N.; NOVELLI, V.M.; RODRIGUES, V.; MEDINA, C.L.; MACHADO, M.A. Response of mandarin cultivars and hybrids to Citrus leprosis virus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 90, p. 305-310, 2008b

BASTIANEL, M.;CRISTOFANI, M.; OLIVEIRA, A.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; GARCIA, A.A.F.; RESENDE, M.D.V.; RODRIGUES, V.; MACHADO, M.A. Quantitative Trait Loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* L. Osbeck) x *C. sinensis* L. Osb. **Euphytica**, Wageningen, v. 169, n. 1, p. 101-111, 2009.

BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, New York, v. 431, p. 356-363, 2004.

BECKERS, G.J.; JASKIEWICZ, M.; LIU, Y.; UNDERWOOD, W.R.; HE S.Y; ZHANG, S.; CONRATH, U. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell,** Rockville, v. 21, p. 944–953, 2009.

BISSON, M.M.; GROTH, G. New paradigm in ethylene signaling: EIN2, the central regulator of the signaling pathway, interacts directly with the upstream receptors. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 6, n. 1, p. 164–166, 2011.

BISSON, M.M.; BLECKMANN, A.; ALLEKOTTE, S.; GROTH, G. EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. **Biochemistry Journal**, London, v. 424, p. 1–6, 2009.

BITANCOURT, A.A. Relação das doenças e fungos parasitas observados na secção de Fitopatologia durante os anos de 1931 e 1932. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 5, p. 185-196,1934

BITANCOURT, A.A. Estudos sobre a leprose dos citros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 22, p. 161-231, 1955.

BIVALKAR-MEHLA, S.; VAKHARIA, J.; MEHLA, R.; ABREHA, M.; KANWAR, J. R.; TIKOO, A.; CHAUHAN, A. Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. **Virus Research**, Amsterdam, v. 155, p. 1–9, 2011.

BOATWRIGHT, J. L.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 14, p. 623–634, 2013.

BOLOGNA, N.G.; SCHAPIRE, A.L.; PALATNIK. J.F. Processing of plant microRNA precursors. **Briefing on Functional Genomics**,Oxford, v. 12, n. 1, p.37-45, 2012.

BOS, J.I.B.; HOGENHOUT, S.A. Effectors in Plant–Insect Interactions. In: MARTIN,F. KAMOUN, S (Ed.).S, **Effectors in Plant–Microbe Interactions**. Oxford, :Wiley-Blackwell, 2012. p. 355-375

BOS, J.I.B.; PRINCE, D.; PITINO, M.; MAFFEI, M.E.; WIN, J.; Hogenhout, S.A. A Functional Genomics Approach Identifies Candidate Effectors from the Aphid Species *Myzus persicae* (Green Peach Aphid). **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 11, p. e1001216, 2010.

BOZOROV, T.A.; BALDWIN, I.T. Small RNAs and transcriptional regulation of plant defense responses against insect herbivory. **Endocytobiosis and Cell Research**,Jena, v. 22, p. 82-85, 2012

BOZOROV, T.A.; PRAKASH; PANDEY, S.; DINH, S.T.; KIM, S.G.; HEINRICH, M.; GASE, K.; BALDWIN, I.T. DICER-like proteins and their role in plant herbivore interactions in *Nicotiana attenuata*. **Journal of Integrative Plant Biology***,* Beijing, v. 54, p. 189-206, 2012.

BRADER, G.; DJAMEI, A.; TEIGE, M.; PALVA, E.T.; HIRT, H. The MAP kinase kinase MKK2 affects disease resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant- Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, p. 589–596, 2007.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L**. Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1408 p.

BUCHEL, A.S.; H.J.M. LINTHORST. PR-1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. In: **Pathogenesis-related proteins in plants**. DATTA, S.K. ; MUTHUKRISHNAN, S. (Ed.) Boca Raton; CRC Press LLC, 1999. p.21-47.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 55, p. 4611-4622, 2009.

CAO, M.; YE, X.; WILLIE, K.; LIN, J.; ZHANG, X.; REDINBAUGH, M.G.; SIMON, A.E.; MORRIS, T.J.; QU, F. The capsid protein of *Turnip crinkle virus* overcomes two separate defense barriers to facilitate systemic movement of the virus in Arabidopsis. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, p. 7793–7802, 2010.

CARR, T.; WHITHAM, S.A. An emerging model system: Arabidopsis as a viral host plant. **Plant Cell Monographs**, Rockville, v. 7, p. 159-183, 2007.

CATINOT, J.; BUCHALA, A.; ABOU-MANSOUR, E.; METRAUX, J. Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 582, p. 473–478, 2008.

CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V.V. Transmission of leprosis by grafting. In: **Proceedings of The 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists.** GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. ; DODDS, J.A. (Ed.). Riverside: IOCV,1984. p. 215-217.

CHANDA, B.; XIA, Y.; MANDAL, M.K.; YU, K.; SEKINE, K.T.; GAO, Q.M.; SELOTE, D.; HU, Y.; STROMBERG, A.; NAVARRE, D.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. **Nature Genetics**, New York, v. 43, p. 421–427, 2011.

CHATURVEDI, R.; VENABLES, B.; PETROS, R.A.; NALAM, V.; LI, M.; WANG, X.; TAKEMOTO, L.J.; SHAH, L. An abietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance. **Plant Journal**, Oxford, v. 71, p. 161–72, 2012.

CHELLAPPAN, P.; XIA, J.; ZHOU, X.; GAO, S.; ZHANG, X.; COUTINO, G.; VAZQUEZ, F.; ZHANG, W.; JIN, H. siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. **Nucleic Acids Research***,* Oxford, v. 38, p. 6883-6894, 2010.

CHEN C, CHEN Z. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 129, p. 706–716, 2002.

CHEN X. MicroRNA biogenesis and function in plants. **FEBS Letters***,* Amsterdam, v. 579, p. 5923-5931, 2005.

CHEN, D.; MENG Y, YUAN C, BAI L, HUANG D, LV S, WU P, CHEN LL, CHEN M. Plant siRNAs from introns mediate DNA methylation of host genes. **RNA,** Rockville**,** v. 17, p. 1012-1024, 2011.

CHEN, W.; PROVART, N. J.; GLAZEBROOK, J.; KATAGIRI, F.; CHANG, H. S.; EULGEM, T.; MAUCH, F.; LUAN, S.; ZOU, G.; WHITHAM, S. A.; BUDWORTH, P. R.; TAO, Y.; XIE, Z.; CHEN, X.; LAM, S.; KREPS, J. A.; HARPER, J.F.; SI-AMMOUR, A.; MAUCH-MANI, B.; HEINLEIN, M.; KOBAYASHI, K.; HOHN, T.; DANGL, J.L.; WANG, X.; ZHU, T. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 559-574, 2002.

CHILDERS, C.C.; DERRICK, K.S. *Brevipalpus* mites as vectors of unassigned rhabdoviruses in various crops. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 1-3, 2003.

CHILDERS, C.C.; FRENCH, J.V.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis*, and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): A review of their biology, feeding injury and economic importance. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 5–28, 2003a.

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V.; DERRICK, K.S.; ACHOR, D.S.; FRENCH, J.V.; WELBOURN, W.C.; OCHOA, R.; KITAJIMA, E.W. Citrus leprosies and its status in Florida and Texas: Past and present. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 181-202, 2003b.

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V.; WELBOURN, W.C. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 29-105, 2003c.

CHINI, A.; FONSECA , S.; FERNNDEZ, G.; ADIE, B.; CHICO, J.M. et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. **Nature,** New Tork, v. 448, p. 666–671, 2007.

CHIVASA, S.; CARR, J.P. Cyanide restores N gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase. **Plant Cell,** Rockville, v. 10, p. 1489–1498, 1998.

CHOUDHARI, K.G.; MALI, V. R. Leprosis disease and its role in citrus dieback. **Science & Culture**, Calcutta, v. 44, p. 166-167, 1978.

CHOI, J.; HUH, S.U.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; PAEK, K.H.; HWANG,I. The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis. **Developmental Cell,** Cambridge, v. 19, p. 284-295, 2011.

CHOI, C.S.; SANO, H. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophospho diesterase-like protein in tobacco plants. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 277, p. 589-600, 2007.

CHU, M.; DESVOYES, B.; TURINA, M.; NOAD, R.; SCHOLTHOF, H.B. Genetic dissection of tomato bushy stunt virus p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. **Virology**, New York, v. 266, p. 79-87, 2000.

CLARKE, J.D.; VOLKO, S.M.; LEDFORD, H.; AUSUBEL, F.M.; DONG, X. Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in *cpr*-induced resistance in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 2175–2190, 2000.

CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 16, p. 735-743, 1998.

COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; CHAGAS, C.M.; GALETTI, S.R.; ROSSETTI, V.V.; KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 208-213, 1995.

COOLEY, M.B.; PATHIRANA, S.; WU, H.J.; KACHROO, P.; KLESSIG, D F. Members of the *Arabidopsis* HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 663–676, 2000.

CUI, J.P.; JANDER, G.; RACKI, L.R.; KIM, P.D.; PIERCE, N.E.; AUSUBEL, F.M. Signals involved in Arabidopsis resistance to *Trichoplusia ni* caterpillars induced by virulent and avirulent strains of the phytopathogen *Pseudomonas syringae.* **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 129, p. 551–564, 2002.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W.F. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 139, p. 5-17, 2005.

DE YOUNG, B.J.; INNES, R.W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature Immunology**, New York, v. 7, p. 1243-1249, 2006

DELATORRE, C.A.; SILVA, A.A. *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta, um grande papel. **Revista de Ciências Agrárias**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 58-67, 2008.

DELERIS, A.; GALLEGO-BARTOLOME, J.; BAO, J.; KASSCHAU, K.D.; CARRINGTON, J.C.; Voinnet, O. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. **Science**, Wahington DC, v. 313, p. 68–71, 2006.

DEMPSEY, D.A.; KLESSIG, D.F. SOS - too many signals for systemic acquired resistance? **Trends in Plant Science,** Oxford**,** v. 17, p. 538-545, 2012.

DERKSEN, H.; RAMPITSCH, C.; DAAYF, F. Signaling cross-talk in plant disease resistance. **Plant Science**, Limerick, v. 207, p. 79-87, 2013.

DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.R.; VAN POECKE R.M.P.; VAN PELT, J.A.; POZO, M.J.; MUELLER, M.J.; BUCHALA, A.J.; METRAUX, J-P.; VAN LOON, L.C.; DICKE, M.; PIETERSE, C.M. Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, p. 923–937, 2005.

DE VOS, M.; VAN ZAANEN, W.; KOORNNEEF, A.; KORZELIUS, J.P.; DICKE, M.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 142, p. 352–363, 2006.

DIAZ-PENDON, J.A.; DING, S.W. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 303–326, 2008.

DIETZGEN, R.G.; KUHN, J.H.; CLAWSON, A.N.; FREITAS-ASTÚA, J.; GOODIN, M.M.; KITAJIMA, E.W.; KONDO, H.; WETZEL, T.; WHITFIELD, A.E. *Dichorhavirus* - a proposed new genus for *Brevipalpus* mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. **Archives of Virology**, New York, v. 159, p. 607-619, 2014.

DIEZEL, C.; VON DAHL, C.C.; GAQUEREL E.; BALDWIN IT. Different lepidopteran elicitors account for cross-talk in herbivory-induced phytohormone signaling. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 150, p. 1576–86, 2009.

DING, S.W.; SHI, B.J.; LI, W.X.; SYMONS, R.H. An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** Washington, v. 93, p. 7470–7474, 1996.

DOMBRECHT, B.; XUE, G.P.; SPRAGUE, S.J.; KIRKEGAARD, J.A.; ROSS, J.J.; REID, J.B.; FITT, G.P.; SEWELAM, N.; SCHENK, P.M.; MANNERS, J.M; KAZAN, K. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate dependent functions in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 2225–2245, 2007.

DOMINGUEZ, F.S.; BERNAL, A.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. First report of *Citrus leprosis virus* in Panama. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 228, 2001.

DURRANT, W.E; DONG, X. Systemic Acquired Resistance**. Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185–209, 2004.

ELLIS, C.; KARAFYLLIDIS, I.; TURNER, J.G. Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae,* and *Myzus persicae***. Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, p. 1025–1030, 2002.

EULGEM, T.; SOMSSICH, I.E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, p. 366–371, 2007.

FAGOAGA, C.; PENSABENE-BELLAVIA, G.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Ectopic expression of the p23 protein of Citrus tristeza virus differentially modifies viral accumulation and tropism in two transgenic woody hosts. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 12, p. 898–910, 2011.

FAWCETT, H.S. **Citrus Diseases and Their Control**. 2 ed., New York: McGraw-Hill, 1936. 582 p.

FAWCETT, H.S.; BURGER, O.F. A variety of *Cladosporium herbarum* on *Citrus aurantium* in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 1, p. 164-166, 1911.

FAWCETT, H.S.; LEE H.A. **Citrus diseases and their control**. 1 ed., New York: McGraw-Hill, 1926. 582 p.

FEBRES, V.J.; KHALAF, A.; GMITTER, J.R.; MOORE, G.A. Production of disease resistance in Citrus by understanding natural defense pathways and pathogen interactions. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, Miki cho, v. 3, p. 30-39, 2009.

FELTON, G.W.; KORTH, K.L. Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 3, p. 309-314, 2000.

FERNÁNDEZ-CALVO, P.; CHINI, A.; FERNÁNDEZ-BARBERO, G.; CHICO, J.M.; GIMENEZ-IBANEZ, S.; GEERINCK, J.; EECKHOUT, D.; SCHWEIZER, F.; GODOY, M.; FRANCO-ZORRILLA, J.M.; PAUWELS, L.; WITTERS, E.; PUGA, M.I.; PAZ-ARES, J.; GOOSSENS, A.; REYMOND, P.; DE JAEGER, G.; SOLANO R. The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. **Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 701–715, 2011.

FEYS, B.J.; MOISAN, L.J.; NEWMAN, M.A.; PARKER, J.E. Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. **EMBO Journal**, Oxford, v. 20, p. 5400–5411, 2001.

FONSECA, S.; CHINI, A.; HAMBERG, M.; ADIE, B.; PORZEL, A.; KRAMELL, R.; MIERSCH, O.; WASTERNACK, C.; SOLANO, R. (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, p. 344–350, 2009.

FRAGNIÈRE, C.; SERRANO, M.; ABOU-MANSOUR, E.; MÉTRAUX, J.P.; L'HARIDON, F. Salicylic acid and its location in response to biotic and abiotic stress. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 585, p. 1847–1852, 2011.

FREITAS-ASTÚA, J.; BASTIANEL, M.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; BASÍLIO-PALMIERI, A.C.; SILVA-PINHATI, A.C.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Differentially expressed stress-related genes in the compatible citrus-Citrus leprosis virus interaction. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 980-990, 2007.

FREITAS-ASTÚA, J.; FADEL, A.L.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.M.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. The remote citroid fruit tree *Glycosmis pentaphylla* is a host of *Citrus leprosis virus C* and exhibits novel leprosis symptoms. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 91, n. 2, p. 499, 2009.

FREITAS-ASTÚA, J.; FADEL, A.L.; BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.M.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; MACHADO, M.A. Resposta diferencial de espécies e híbridos de citros à leprose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 7, p. 809-814, 2008.

FREZZI, M.J. La lepra explosiva del naranjo. Investigaciones realizadas por el laboratorio de patologÍa de Bela Vista (Corrientes). **Boletin Frutas y Hortalizas**. Buenos Aires, n. 5, p.1-16, 1940.

FU, Z.Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 839-863, 2013.

FUKUDA, L.A.; FRANCO, D.; FACIO, S.L.; LIMA, R.S. **Balanço fitossanitário de citros:** O que mais pesa? *SFCitros* – SIMPÓSIO SOBRE FITOSSANIDADE EM CITROS, 3 ago. 2012. UNESP, Jaboticabal – SP. p. 60-61. 1 CDROM.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Rio de Janeiro, 2014. 123 p.

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, Washington, v. 261, p. 754–756, 1993.

GARCIA-RUIZ, H.; TAKEDA, A.; CHAPMAN, E.; SULLIVAN, E.; FAHLGREN, N.; BREMPELIS, K.; CARRINGTON, C. Arabidopsis RNA-Dependent RNA Polymerases and Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense and Small Interfering RNA Biogenesis during *Turnip Mosaic Virus* Infection. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 481–496, 2010.

GARITA, L. **Relação vírus-vetor-hospedeiro no patossistema da leprose dos citros**. 2013. 96p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

GARITA, L. C.; TASSI, A. D.; CALEGARIO, R. F.; FREITAS-ASTÚA, J. S.; RENATO, B.; ROMÃO, G. O.; KITAJIMA, E. W. Experimental host range of *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C). **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 43-55, 2014.

GASCIOLLI, V.; MALLORY, A.C.; BARTEL, D.P.; VAUCHERET, H. Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. **Current Biology***,* London, v. 15, p. 1494-1500, 2005.

GATZ, C. From pioneers to team players: TGA transcription factors provide a molecular link between different stress pathways. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 26, p. 151-159, 2013.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v. 30, p. 503–512, 2002.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205–227, 2005.

GOLEM, S.; CULVER, J.N. *Tobacco mosaic virus*-induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, p. 681-688, 2003.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion on Plant Biology**, London, v. 9, p. 414–420, 2006.

GUÉNIN, S.; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; VAN WUYTSWINKEL, O.; BELLINI, C.; GUTIERREZ, L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 60, p. 487-493, 2009.

GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; GUÉNIN, S.; PELLOUX, J.; LEFEBVRE, J. F.; LOUVET, R.; RUSTERUCCI, C.; MORITZ, T.; GUERINEAU, F.; BELLINI, C.; VAN WUYTSWINKEL, O. The lack of a systemic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 6, p. 609-618, 2008.

HALL, B.P.; SHAKEEL, S.N.; AMIR, M.; HAQ, N.U.; QU, X.; SCHALLER, G.E. Histidine kinase activity of the ethylene receptor ETR1 facilitates the ethylene response in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 159, p. 682-695, 2012.

HARVEY, J.J.W.; LEWSEY, M.G.; PATEL, K.; WESTWOOD, J.; HEIMSTÄDT, S. et al.. An Antiviral Defense Role of AGO2 in Plants. **PLoS ONE,** San Francisco, v. 6, p. 1, 2011.

HEIDEL, A.J.; CLARKE, J.D.; ANTONOVICS, J.; DONG, X. Fitness costs of mutations affecting the systemic acquired resistance pathway in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, Austin, v. 168, p. 2197–2206, 2004.

HEIL, M.; BOSTOCK, R.M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 503–512, 2002.

HENRY, G.; THONART, P.; ONGENA, M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others; an update on the diversity of plant immune elicitors. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, Gembloux, v. 16, p. 257-268, 2012.

HOGENHOUT, S.A.; BOS, J.I.B. Effector proteins that modulate plant–insect interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, p. 422-428, 2011.

HOWE, G.A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 41–66, 2008.

HUANG, Z.; YEAKLEY, J. M.; GARCIA, E. W.; HOLDRIDGE, J. D.; FAN, J. B., WHITHAM, S. A. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible Arabidopsis-virus interactions. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 137, p. 1147-1159, 2005.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations. **Genes & Immunity**, Basingstoke, v. 6, p. 279-284, 2005.

HULL, R. **Matthew's Plant Vitology.** 4th. ed. San Diego, Califórnia, 2002. p. 485-531.

HUNTER, L.J.R.; WESTWOOD, J.H.; HEATH, G.; MACAULAY, K.; SMITH, A.G.; MACFARLANE, S. A.; PALUKAITIS, P.; CARR, J. P. Regulation of RNA-Dependent RNA Polymerase 1 and Isochorismate Synthase Gene Expression in Arabidopsis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e66530, 2013.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES – ICTV. **ICTV Taxonomy History for Higrevirus**. Disponível em: <http://ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20133510&taxa_name=Higrevirus>. Acesso em: 06 maio 2014.

ISHIHARA, T.; SAKURAI, N.; SEKINE, K.-T.; HASE, S.; IKEGAMI, M.; SHIBATA, D.; TAKAHASHI, H. Comparative analysis of expressed sequence tags in resistant and susceptible ecotypes of *Arabidopsis thaliana* infected with *cucumber mosaic virus*. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 45, n. 4, p. 470-480, 2004.

ISHIHARA, T.; SEKINE, K.T.; HASE, S.; KANAYAMA, Y.; SEO, S;. OHASHI, Y.; Kusano, T.; Shibata, D.; Shah, J.; Takahashi, H. Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* EDS5 gene enhances resistance to viruses. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 10, p. 451-461, 2008.

HOGENHOUT, S.A.; AMMAR, E-D.; WHITFIELD, A.E.; REDINBAUGH, M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 327-359, 2008.

IZQUIERDO C.; I.; ZERMEÑO D. L.F.; MENDEZ, W.; OTERO-COLINA, G.; FREITAS-ASTUA, J.;LOCALI-FABRIS, E.C.; MORAES, J.G.; CALEGARIO, R.F.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. Confirmation of the presence of the *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) in Southern Mexico. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 400-403, 2011.

JACKSON, A.O.; DIETZGEN, R.G.; GOODIN, M.M.; BRAGG, J.N.; DENG, M. Biology of Plant Rhabdoviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 623-660, 2005.

JAUBERT, M.; BHATTACHARJEE, S.; MELLO, A.; PERRY K. L.; MOFFETT, P. Argonaute2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against *Potato virus x* in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 156, p. 1556–1564, 2011.

JASKIEWICZ, M.; CONRATH, U.; PETERHÄNSEL. C. Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. **EMBO Reports**, Oxford, v. 12, p. 50-55, 2011.

JI, L.H.; DING, S.W. The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, p. 715–724, 2001.

JIN, H.; ZHU, J.K. A viral suppressor protein inhibits host RNA silencing by hooking up with Argonautes. **Genes & Development***,* New York, v. 24, p. 853-856, 2010.

JONES, J.D.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, New York, v. 444, p. 323–329, 2006.

JOHNSON, C.; BODEN, E.; ARIAS, J. Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. **Plant Cell,** Rockville, v. 15, p. 1846–1858, 2003.

JUNG, H.W.; TSCHAPLINSKI, T.J.; WANG, L.; GLAZEBROOK, J.; GREENBERG, J.T. Priming in systemic plant immunity. **Science**, Washington, v. 324, p. 89–91, 2009.

KACHROO, P.; YOSHIOKA, K.; SHAH, J.; DOONER, H.K.; KLESSIG, D.F. Resistance to *Turnip crinkle virus* in Arabidopsis is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but *NPR1*, ethylene, and jasmonate independent. **Plant Cell,** Rockville, v. 12, p. 677-690, 2000.

KANG, J.H.; WANG, L.; GIRI, A.; BALDWIN I.T. Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuate* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 3303–3320, 2006.

KANT, M.R.; AMENT, K.; SABELIS, M.W.; HARING, M.A.; SCHUURINK, R.C. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 135, p. 483–495, 2004.

KASSCHAU, K.D; CARRINGTON, J.C.Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. **Virology**, New York, v. 285, p 71–81, 2001.

KAZAN, K.; MANNERS, J.M. Jasmonate signaling: toward an integrated view. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 146, p. 1459–1468, 2008.

KAZAN, K.; MANNERS, J.M. MYC2: The master in action. **Molecular Plant**, Oxford, v. 6, p. 686–703, 2013.

KEMPEMA, L.A.; CUI, X.; HOLZER, F.M.; WALLING, L.L. Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 143, p. 849–865, 2007.

KESARWANI, M.; YOO, J.; DONG, X. Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 144, p. 336–346, 2007.

KHRAIWESH, B.; ZHU, J.K.; ZHU, J. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. **Biochimica et Biophysica Acta***,* Amsterdam, v. 1819, p. 137-148, 2012.

KINKEMA, M.; FAN, W.; DONG, X. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 2339–2350, 2000.

KITAJIMA, E.W.; CALEGARIO, R.F.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; FRANCISCHINI, F.J.B. *In situ* detection of CiLV-C in the mite vector *Brevipalpus phoenicis*, evidence for a circulative type of virus/vector relationship and model for a virus circulation in the mite. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, Suplemento, p. 289, 2008.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; HARAKAVA, R.; CALEGARIO, R.F.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C. Citrus leprosis in Florida, USA, appears to have been caused by the nuclear type of *Citrus leprosis virus* N (CiLV-N). **Virus Review and Research**, Ribeirão Preto, v. 16, p. 23-27, 2011.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus* transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 135-160, 2003.

KITAJIMA, E.W.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S.; YUKI, W. Short, rodlike particles associated with citrus leprosis. **Virology**, New York, v. 50, p. 254-258, 1972.

KNORR, L.C. Etiological association of a *Brevipalpus* mite with Florida scaly bark of citrus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, p. 15, 1950.

KOORNNEEF, A.; LEON-REYES, A.; RITSEMA, T.; VERHAGE, A.; DEN OTTER, F.C.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M. Kinetics of salicylate-mediated suppression

of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 147, p. 1358–1368, 2008.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 27, p. 95-125, 2006.

KUBO, K.S. (2011). **Expressão gênica diferencial de genótipos de citros em resposta à infecção do vírus da leprose (CiLV-C)**. 2011. 177p. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2011.

KULCHESKI, F.R.; DE OLIVEIRA, L.F.; MOLINA, L.G.; ALMERAO, M.P. RODRIGUES, F.A.; MARCOLINO, J.; BARBOSA, J.F.; STOLF-MOREIRA, R.; NEPOMUCENO, A.L.; MARCELINO-GUIMARAES, F.C.; ABDELNOOR R.V.; NASCIMENTO, L.C.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA, G.A.; MARGIS R. Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 307, 2011.

KURIHARA, Y.; KAMINUMA, E.; MATSUI, A.; KAWASHIMA, M.; TANAKA, M.; MOROSAWA, T.; ISHIDA, J.; MOCHIZUKI, Y.; SHINOZAKI, K.; TOYODA, T.; SEKI, M. Transcriptome analyses revealed diverse expression changes in *ago1* and *hyl1* Arabidopsis mutants. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 50, p. 1715–1720, 2009.

LABRA, M.; VANNINI, C.; GRASSI, F.; BRACALE, M.; BALSEMIN, M.; BASSO, B.; SALA, F. Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, n. 7, p. 1512-1518, 2004.

LEÓN, M.G.; BECERRA, C.H.; FREITAS-ASTÚA, J.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) in Colombia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 1364, 2008.

LEON-REYES, A.; SPOEL, S.H; DE LANGE, E.S.; ABE, H.; KOBAYASHI, M.; TSUDA, S.; MILLENAAR, F.F.; WELSCHEN, R.A.M.; RITSEMA, T.; PIETERSE, C.M.J. Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 149, p. 1797–1809, 2009.

LEWSEY, M.G.; MURPHY, A.M.; MACLEAN, D.; DALCHAU, N.; WESTWOOD, J.H.; MACAULAY, K.; BENNET, M.H.; MOULIN, M.; HANKE, D.E.; POWELL, G, et al. Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 23, p. 835–845, 2010.

LI, H.W.; LUCY, A.P.; GUO, H.S; LI, W.X.; JI, S.H.; WONG, S.M.; DING, S.W. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. **EMBO Journal**, Oxford, v. 18, p. 2683–2691, 1999.

LI, J.; BRADER, G.; PALVA, E.T. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 319–331, 2004.

LI, L.; LI, C.; LEE, G.I.; HOWE, G.A. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences***,* Washington, v. 99, p. 6416–6421, 2002.

LI, Q.; XIE, Q.G.; SMITH-BECKER, J.; NAVARRE, D.A.; KALOSHIAN, I. Mi-1-mediated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 655–664, 2006.

LILLY, S.T.; DRUMMOND, R.S.; PEARSON, M.N.; MACDIARMID, R.M. Identification and Validation of Reference Genes for Normalization of Transcripts from Virus-Infected *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 24, n. 3, p. 294-304, 2011.

LIU, R.; LU, B.; WANG, X.; ZHANG, C.; ZHANG, S.; QIAN, J.; CHEN, L.; SHI, H.; DONG, H. Thirty-seven transcription factor genes differentially respond to a harpin protein and affect resistance to the green peach aphid in *Arabidopsis*; **Journal of Biosciences***,* Osaka, v. 35, p. 435–450, 2010.

LIU, D.; SHI, L.; HAN, C.; YU, J.; LI, D.; ZHANG, Y. Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in Virus-Infected *Nicotiana benthamiana* Using Quantitative Real-Time PCR. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n.9, p. e46451, 2012.

LIVAK, K.J; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta}$CT Method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTUA-MONGE, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to the citrus production in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 1317-1321, 2003.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A. ASTUA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, MA. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 2721-2729, 2006.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. Genus *Cilevirus*. In: **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J.(Ed.). San Diego: Elsevier, 2012. p.1139-1142.

LORENZO, O.; CHICO, J.M.; SANCHEZ-SERRANO, J.J.; SOLANO, R. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 1938–1950, 2004.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SANCHEZ-SERRANO, J.J.; SOLANO, R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 165–178, 2003.

LOUIS, J.; GOBBATO, E.; MONDAL, H.A.; FEYS, B.J.; PARKER, J.E.; SHAH J. Discrimination of Arabidopsis PAD4 activities in defense against green peach aphid and pathogens. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 158, n. 4, p. 1860-1872, 2012.

LOVE, A.J.; LAVAL, V.; GERI, C.; LAIRD, J.; TOMOS, A.D. et al. Components of Arabidopsis defense- and ethylene-signaling pathways regulate susceptibility to *Cauliflower mosaic virus* by restricting long-distance movement. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, p. 659–670, 2007.

LOVE, A.J.; YUN, B.W.; LAVAL, V.; LOAKE, G.J.; MILNER, J.J. *Cauliflower mosaic virus*, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defence signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 139, p. 935-948, 2005.

LUNA, E.; BRUCE, T.J.; ROBERTS, M.R.; FLORS, V.; TON J. Next-generation systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 158, p. 844–853, 2012.

MAFRA, V.; KUBO, K.S.; ALVES-FERREIRA, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; STUART, R.M. et al. Reference Genes for Accurate Transcript Normalization in Citrus Genotypes under Different Experimental Conditions. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e31263, 2012.

MAIA, O.M.; OLIVEIRA, C.A.L. Transmissibilidade do vírus da leprose de cercas-vivas, quebra-ventos e plantas invasoras para laranjeiras através de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). **Bragantia**, v. 64, n. 3, p. 417-422, 2005.

MALDONADO, A.M.; DOERNER, P.; DIXON, R.A.; LAMB, C.J.; CAMERON, R.K. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. **Nature**, New York, v. 419, p. 399–403, 2002.

MALECK, K.; LEVINE, A.; EULGEM, T.; MORGAN, A.; SCHMID, J; LAWTON, K.A.; DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nature Genetics**, New York, v. 26, p. 403–410, 2000.

MANDADI, K.K.; SCHOLTHOF, K.B. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? **Plant Cell**, Rockville, v. 25, p. 1489-1505, 2013.

MARATHE, R.; ANANDALAKSHMI, R.; SMITH, T.H.; PRUSS, G.J.; VANCE, V.B. RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing, **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 295–306, 2000.

MARATHE, R.; GUAN, Z.; ANANDALAKSHMI, R.; ZHAO, H.; DINESH-KUMAR, S.P. Study of *Arabidopsis thaliana* resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, p. 501-520, 2004.

MARQUES, J.P.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. Análise morfológica da evolução das lesões lepróticas foliares de *Citrus sinensis* (L) Osbeck 'Pêra'. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 879-881, 2007.

MARQUES, J.P.R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Comparative morpho-anatomical studies of the lesions caused by *Citrus leprosis virus* on sweet orange. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 2, 2010.

MASCIA, T.; SANTOVITO, E.; GALLITELLI, D.; CILLO, F. Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, p. 805-816, 2010.

MATTA, B.P.; BITNER-MATHE, B.C.; ALVES-FERREIRA, M. Getting real with real-time qPCR: a case study of reference gene selection for morphological variation in *Drosophila melanogaster* wings. **Development Genes and Evolution**,Berlin, v. 221, p. 49–57, 2011.

MAYERS, C.N.; LEE, K.C.; MOORE, C.A.; WONG, S.M.; CARR, J.P. Salicylic acid-induced resistance to *Cucumber mosaic virus* in squash and *Arabidopsis thaliana*: contrasting mechanisms of induction and antiviral action. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, p. 428-434, 2005.

MELZER, M.J.; SIMBAJON, N.; CARILLO, J.; BORTH, W.B.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; NEUPANE, K.R.; HU, J.S. A cilevirus infects ornamental hibiscus in Hawaii. **Archives of Virology**, New York, v. 158, n. 11, p. 2421-2424, 2013.

MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; BORTH, W.B.; HU, J.S. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* with citrus leprosis-like symptoms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 1, p. 122-127, 2012.

MEWIS, I.; APPEL, H.M.; HOM, A.; RAINA, R.; SCHULTZ, J.C. Major signaling pathways modulate Arabidopsis glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 138, p. 1149–1162, 2005.

MEYERS, B.C.; KOZIK, A.; GRIEGO, A.; KUANG, H.; MICHELMORE, R.W. Genome wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 809-834, 2003.

MISHINA, T.E.; ZEIER, J. The Arabidopsis flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 141, p. 1666-1675, 2006.

MOHASE, L.; VAN DER WESTHUIZEN, A. J. Salicylic acid is involved in resistance responses in the Russian wheat aphid-wheat interaction. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 159, p. 585-590, 2002.

MOLNAR, A.; MELNYK, C.; BAULCOMBE, D. C. Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. **Genome Biology**, London, v. 12, p. 215, 2011.

MORAN, P.J.; CHENG, Y.; CASSELL, J.L.; THOMPSON, G.A. Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 51, p. 182–203, 2002.

MORAN, P.J.; THOMPSON, G.A. Molecular responses to aphid feeding in Arabidopsis in relation to plant defense pathways. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 125, p. 1074–1085, 2001.

MOU, Z.; FAN, W.; DONG, X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. **Cell**, Cambridge, v. 113, p. 935–944, 2003.

MUR, L.A.; KENTON, P.; ATZORN, R.; MIERSCH, O.; WASTERNACK, C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology,** Minneapolis, v. 140, p. 249–262, 2006.

MUSSER, R.O.; HUM-MUSSER, S.M.; EICHENSEER, H.; PEIFFER, M.; ERVIN, G.; MURPHY, J.B.; FELTON G.W. Herbivory: Caterpillar saliva beats plant defences - a new weapon emerges in the evolutionary arms race between plants and herbivores. **Nature**, New York, v. 416, p. 599–600, 2002.

MUSSUMECI, M.R.; ROSSETTI, V.V. Transmissão dos sintomas da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 15, p. 228, 1963.

NAWRATH, C.; HECK, S.; PARINTHAWONG, N.; METRAUX, J-P. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 275–286, 2002.

NAYLOR, M.; MURPHY, A.M.; BERRY, J.O.; CARR J.P. Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, p. 860–868, 1998.

NDAMUKONG, I.; ABDALLAT, A. A.; THUROW, C.; FODE, B.; ZANDER, M;, WEIGEL, R., et al. SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. **Plant Journal***,* Oxford*, v.* 50, p. 128–139, 2007.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**, São Paulo: CitrusBR, 2010. 138p.

NICOLINI, F.; BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.; ANTONIOLI LUIZON, R.; SCHONS, J.; MACHADO, M.A. Evidence suggesting that *Brevipalpus phoenicis*-Citrus leprosis virus interaction may not be of the circulative propagative type. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS,12., 2007. Adana. **Annals…**Adana, Turkey: IOCV, 2007.

NICOT, N.; HAUSMAN, J.F.; HOFFMANN, L.; EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 2907–2914, 2005.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time PCR. **Nature Protocols**, New York, v. 1, p. 1559–1582, 2006.

NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; SEGATTI, N.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; MACHADO, M.A. Aquisição e inoculação do vírus da leprose dos citros (CiLV-C) por machos e fêmeas de *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 32, p. S293, 2007. Suplemento.

NUNES, M.A.; BERGAMINI, MP, COERINI, LF, BASTIANEL, M., NOVELLI, VM, KITAJIMA, EW, FREITAS-ASTUA, J. *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) naturally infecting *Commelina benghalensis*, a prevalent monocot weed of citrus orchards in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 5, p. 770, 2012a.

NUNES, M.A.; de OLIVEIRA, C.A.L.; DE OLIVEIRA, M.L.; KITAJIMA, E.W.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; FREITAS-ASTÚA, J. Transmission of *Citrus leprosis virus C*, by *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) to alternate host plants found in citrus orchards. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, p. 968-972, 2012b.

OLIVEIRA, C.A.L. Flutuação populacional e medidas de controle do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 7, p. 1-31, 1986.

PADMANABHAN, C.; ZHANG, X.; JIN, H. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 465-472, 2009.

PAJEROWSKA-MUKHTAR, K.M.; EMERINE, D.K.; MUKHTAR M.S. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 402-411, 2013.

PANDEY, S.P.; BALDWIN, I.T. RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. **Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 40-53, 2007.

PANDEY, S.P.; SHAHI, P.; GASE, K.; BALDWIN, I.T. Herbivory-induced changes in the small-RNA transcriptome and phytohormone signaling in *Nicotiana attenuata*. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, p. 4559-4564, 2008.

PENNINCKX, I.A.; EGGERMONT, K.; TERRAS, F.R.; THOMMA, B.P.; DE SAMBLANX, G.W; BUCHALA, A.; METRAUX, J.P.; MANNERS, J.M.; BROEKAERT, W.F. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 2309–2323, 1996.

PARK, S.W.; KAIMOYO, E.; KUMAR, D.; MOSHER, S.; KLESSIG, D.F. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science**, Washington, v. 318, p. 113–116, 2007.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASSUMPÇÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, J.C.; VALLIM, M.A.; FRANCO, S.F.; SILVA, V.H.; JORDÃO, JÚNIOR H.; OLIVEIRA, F.; GIACHETTO, P.F.; FERRARI, F.; AGUILLAR-VILDOSO, C.I.; FRANCISCHINI, F.J.B.; SILVA, J.M.F.; ARRUDA, P.; FERRO, J.A.; REINACH, F.; SILVA, A.C.R. The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus Leprosis associated Virus, Cytoplasmatic type (CiLVC). **Virus Gene**, New York, v. 32, p. 289-298, 2006.

PEGADARAJU, V.; KNEPPER, C.; REESE, J.C.; SHAH, J. Premature leaf senescence modulated by the Arabidopsis PHYTOALEXIN DEFICIENT4 gene is associated with defense against the phloem-feeding green peach aphid. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 139, p. 1927–1934, 2005.

PEGADARAJU, V.; LOUIS, J.; SINGH, V.; REESE, J.C.; BAUTOR, J.; FEYS B.J.; COOK, G.; PARKER, J.E.; SHAH, J. Phloem-based resistance to green peach aphid is controlled by Arabidopsis PHYTOALEXIN DEFICIENT4 without its signaling partner ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1. **Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 332–341, 2007.

PHILLIPS, J.R.; DALMAY, T.; BARTELS, D. The role of small RNAs in abiotic stress. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, p. 3592-3597, 2007.

PIETERSE, C.M.J.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S.C.M. Networking by small-molecules hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, p. 308–316, 2009.

PINEDA, A.; ZHENG, S.J.; VAN LOON, J.J.A.; PIETERSE, C.M.J.; DICKE, M. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, p. 507–514, 2010.

POULSEN C.; VAUCHERET H.; BRODERSEN P. Lessons on RNA silencing mechanisms in plants from eukaryotic Argonaute structures. **Plant Cell**, Rockville, v. 25, p. 22–37, 2013.

PRÉ, M.; ATALLAH, M.; CHAMPION, A.; DE VOS, M.; PIETERSE, C. M. J.; MEMELINK, J. The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 147, p. 1347-1357, 2008.

POSTNIKOVA, O.; NEMCHINOV, L. Comparative analysis of microarray data in Arabidopsis transcriptome during compatible interactions with plant viruses. **Virology Journal,** London, v. 9, n. 1, p. 101, 2012.

PUMPLIN, N.; VOINNET, O. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. **Nature Reviews Microbiology**, New York, v.11, n. 11, p. 745-760, 2013.

QU, X.; HALL, B.P.; GAO, Z.; SCHALLER, G.E. A strong constitutive ethylene response phenotype conferred on Arabidopsis plants containing null mutations in the ethylene receptors ETR1 and ERS1. **BMC Plant Biology**, London, v. 7, p. 3, 2007.

QU, F.; MORRIS, T.J. Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by *Tomato bushy stunt virus* is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.15, n. 3, p. 193-202, 2002.

RAJEEVAN, M.S.; RANAMUKHAARACHCHI, D.G.; VERNON, S.D.; UNGER, E.R. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 443-451, 2001.

RALHAN, A.; SCHOTTLE, S.; THUROW, C.; IVEN, T.; FEUSSNER, I.; POLLE, A.; GATZ, C. The vascular pathogen *Verticillium longisporum* requires a jasmonic acid-independent COI1 function in roots to elicit disease symptoms in Arabidopsis shoots. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 159, n. 3, p. 1192-1203, 2012.

RÉDEI, G.P. Arabidopsis as a genetic tool. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 9, p. 111–127, 1975.

REINHART, B.J.; WEINSTEIN, E.G.; RHOADES, M.W.; BARTEL, B.; BARTEL, D.P. MicroRNAs in plants. **Genes & Development**, New York, v. 16, p. 1616-1626, 2002.

REMANS, T.; SMEETS, K.; OPDENAKKER, K.; MATHIJSEN, D.; VANGRONSVELD, J. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. **Planta**, Berlim, v. 227, p. 1343–1349, 2008.

REYMOND, P.; WEBER, H.; DAMOND, M.; FARMER, E.E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 707–720, 2000.

RIETZ, S.; STAMM, A.; MALONEK, S.; WAGNER, S.; BECKER, D.; MEDINA-ESCOBAR, N.; VLOT, A.C.; FEYS, B.J.; NIEFIND, K.; PARKER, J.E. Different roles of Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1) bound to and dissociated from Phytoalexin Deficient4 (PAD4) in Arabidopsis immunity. **New Phytologist**, Cambridge, v. 191, p. 107–119, 2011.

RODRIGUES, J.C.V. **Leprose dos citros. Cito-histopatologia, transmissibilidade e relação com o vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae)**. 1995. 79p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 1995.

RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C. *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 59, p. 165–175, 2013.

RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A.; NOGUEIRA, N.L. Uma estratégia para o controle da leprose dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, p.411-423, 2001.

RODRIGUES, J.C.V.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 161-179, 2003.

RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L.; FREITAS, D.S.; PRATES, H. Virus-like particles associated with *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae), vector of citrus leprosis virus. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 26, p. 391-395, 1997.

RODRIGUEZ, V.; BASTIANEL, M.; KUBO, K.S.; FADEL, A.L.; NICOLINI, F.; NOVELLI, V.; FREITAS ASTÚA, J. Desenvolvimento de um método para a otimização da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 28, p. 29-38, 2007.

ROY, A.; CHOUDHARY, N.; GUILLERMO, L.M.; SHAO, J.; GOVINDARAJULU, A.; ACHOR, D.; BRLANSKY, R.H. A novel virus of the genus *Cilevirus* causing symptoms similar to citrus leprosis. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 5, p. 488-500, 2013a.

ROY, A.; STONE, A.; OTERO-COLINA, G.; WEI, G.; CHOUDHARY, N.; ACHOR, D.; LEVY, L. Genome assembly of Citrus leprosis virus nuclear type reveals a close association with Orchid fleck virus. **Genome Announcements**, Washington, v. 1, n. 4, p. 4–5, 2013b.

RUIZ-FERRER, V.; VOINNET, O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 485-510, 2009.

RUSHTON, P.J.; SOMSSICH, I.E.; RINGLER P.; SHEN Q.J. WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science,** Oxford**,** v. 15, p. 247–258, 2010.

RUSTÉRUCCI, C.; AVIV, D.H.; HOLT, B.F.; DANGL, J.L.; PARKER, J.E. The disease resistance signaling components EDS1 and PAD4 are essential regulators of the cell death pathway controlled by LSD1 in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 2211–2224, 2001.

RYABOV, E.V.; FRASER, G.; MAYO, M.A.; BARKER, H.; TALIANSKY, M. Umbravirus gene expression helps *Potato leafroll virus* to invade mesophyll tissues and to be transmitted mechanically between plants. **Virology**, New York, v. 286, p. 363–372, 2001.

RYANG, B.S.; KOBORI, T.; MATSUMOTO, T.; KOSAKA, Y.; OHKI, S. T. *Cucumber mosaic virus* 2b protein compensates for restricted systemic spread of Potato virus Y in doubly infected tobacco. **Journal of General Virology**, London, v. 85, p. 3405–3414, 2004.

SALINAS-VARGAS, D.; SANTILLÁN-GALICIA, M.T.; VALDEZ-CARRASCO, J.; MORA-AGUILERA, G.; ATANACIO-SERRANO, Y.; ROMERO-PESCADOR, P. Species composition and abundance of *Brevipalpus* spp. on different citrus species in Mexican orchards. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.42, n. 4, p. 419-425, 2013.

SANDERFOOT , A. A.; RAIKHEL, N. V. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, New York, v. 408, n. 8692, p. 796-815, 2000.

SANSREGRET, R.; DUFOUR, V.; LANGLOIS, M.; DAAYF F, DUNOYER, P.; VOINNET, O.; BOUARAB, K. Extreme Resistance as a Host Counter-counter Defense against Viral Suppression of RNA Silencing. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e1003435, 2013.

ŠAŠEK, V.; NOVÁKOVÁ, M.; JINDŘICHOVÁ, B.; BOKA, K.; VALENTOVÁ, O.; BURKETOVÁ, L.: Recognition of avirulence gene AvrLm1 from hemibiotrophic ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signaling in *Brassica napus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul,v. 25, p. 1238-1250, 2012.

SARMENTO, R.A.; LEMOS, F.; BLEEKER, P.M.; SCHUURINK, R.C.; PALLINI, A.; OLIVEIRA, M.G.A.; LIMA, E.R.; KANT, M.; SABELIS, M.W.; JANSSEN, A.A herbivore that manipulates plant defence. **Ecology Letters**, Oxford', v.14, p. 229–236, 2011.

SAURABH, S.; VIDYARTHI, A. S.; PRASAD, D.; RNA interference: concept to reality in crop improvement. **Planta**, Berlim, v. 239, n. 3, p. 543-564, 2014.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; ANDERSON, J. P.; SIMPSON, R. S.; WILSON, I. W.; SOMERVILLE, S. C.; MACLEAN, D. J. Systemic gene expression in Arabidopsis during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola.* **Plant Physiology**, Minneapolis, v.132, p. 999–1010, 2003.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by cDNA microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, p. 11655–11660, 2000.

SCHIMOLER-O'ROURKE, R.; RICHARDSON, M.; SELITRENNIKOFF C. P. Zeamatin inhibits trypsin and α-amylase activities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v.67, p. 2365-2366, , 2001.

SCHOLTHOF, H.B. The *Tombusvirus*-encoded P19: from irrelevance to elegance. **Nature Reviews Microbiology**, New York, v. 4, p. 405–411, 2006.

SCHOLTHOF, H.B.; ALVARADO, V.Y.; VEGA-ARREGUIN, J.C.; CIOMPERLIK, J.; ODOKONYERO, D.; BROSSEAU, C.; JAUBERT, M.; ZAMORA, A.; MOFFETT, P. Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 156, p. 1548–1555, 2011.

SCHMIDT, D.D.; VOELCKEL, C.; HARTL, M.; SCHMIDT, S.; BALDWIN, I.T. Specificity in ecological interactions: attack from the same lepidopteran herbivore results in species-specific transcriptional responses in two solanaceous host plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 138, p.1763-1773, 2005.

SCHWACH, F.; VAISTIJ, F.E.; JONES, L.; BAULCOMBE, D. An RNA-dependent RNA-polymerase prevents meristem invasion by Potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. **Plant Physiology,** Minneapolis**,** v. 138, p. 1842-1852, 2005.

SCHWEIZER, F.; BODENHAUSEN, N.; LASSUEUR, S.; MASCLAUX, F. G.; REYMOND, P. Differential contribution of transcription factors to *Arabidopsis thaliana* defense against Spodoptera littoralis. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.4, n. 13, 2013.

SEKINE, K.-T.; NANDI, A.; ISHIHARA, T.; HASE, S.; IKEGAMI, M.; SHAH, J.; TAKAHASHI, H. Enhanced resistance to Cucumber mosaic virus in the *Arabidopsis thaliana* ssi2 mutant is mediated via an SA-independent mechanism. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.17, p. 623–632, 2004.

SELS J.; MATHYS J.; DE CONINCK B. M. A.; CAMMUE B. P. A.; DE BOLLE M. F. C. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, p. 941–950, 2008.

SEO, J.K.; WU, J.; LII, Y.; LI, Y.; JIN, H. Contribution of small RNA pathway components in plant immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul,v.26, p. 617-625, , 2013.

SERRANO, M.; WANG, B.; ARYAL, B.; GARCION, C.; ABOU-MANSOUR, E.; HECK, S.; GEISLER, M.; MAUCH, F.; NAWRATH, C.; METRAUX, J. P. Export of salicylic acid from the chloroplast requires the MATE-like transporter EDS5. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.162, p. 1815–1821, 2013.

SHAH, J.; CHATURVEDI, R.; CHOWDHURY, Z.; VENABLES, B.; PETROS, R. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. **Plant Journal**, Oxford, v. 1, 2014. No prelo.

SHIM, J.S.; JUNG, C.; LEE, S.; MIN, K.; LEE, Y.M.; CHOI, Y.; LEE, J.S.; SONG, J. T.; KIM, J.K.; CHOI, Y.D. AtMYB44 regulates WRKY70 expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. **The Plant Journal,** Oxford, v. 73, p. 483-495, , 2013.

SLAUGHTER, A.; DANIEL, X.; FLORS, V.; LUNA, E.; HOHN, B.; MAUCH-MANI, B. Descendants of primed Arabidopsis plants exhibit resistance to biotic stress. **Plant Physiology,** Minneapolis, v.158, p.835–843, 2012

STURBOIS, B.; DUBRANA-OURABAH, M. P.; GOMBERT, J.; LASSEUR, B.; MACQUET, A.; FAURE, C.; BENDAHMANE, A.; BAURÈS, I.; CANDRESSE, T. Identification and Characterization of Tomato Mutants Affected in the Rx-Mediated Resistance to PVX Isolates. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.25, n. 3, p. 341-354, 2012.

SONG, J.T.; DURRANT, W. .; WANG, S.; YAN, S.; TAN, E.H.; DONG, X. DNA repair proteins are directly involved in regulation of gene expression during plant immune response. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 9, p. 115–124, 2011.

SPEGAZZINI, C. Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de “agrios” en el Paraguay. **Anales de la Sociedad Cientifica Argentina,** Buenos Aires, v.90, p. 155-188, 1920.

SPOEL, S.H.; DONG, X. *How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells.* **Nature Reviews Immunology**, New York, v. 12, p. 89-100, 2012.

SPOEL SH, MOU Z, TADA Y, SPIVEY, N. W.; GENSCHIK, P.; DONG, X. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. **Cell**, Cambridge v.137, p. 860–872, , 2009.

STASWICK, P.E.; TIRYAKI, I. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v.16, p. 2117–2127, 2004.

STOTZ, H.U.; KOCH, T.; BIEDERMANN, A.; WENIGER, K.; BOLAND, W.; MITCHELL-OLDS, T. Evidence for regulation of resistance in Arabidopsis to Egyptian cotton worm by salicylic and jasmonic acid signaling pathways. **Planta**, Berlim, v. 214, p. 648–652, 2002.

STOTZ, H.U.; PITTENDRIGH, B.R.; KROYMANN, J.; WENIGER, K.; FRITSCHE, J.; BAUKE, A.; MITCHELL-OLDS, T. Induced plant defense responses against chewing insects: Ethylene signalling reduces resistance of Arabidopsis against Egyptian cotton worm but not diamondback moth. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.124, p. 1007–1017, 2000.

STRAWN, M.A.; MARR, S.K.; INOUE, K.; INADA, N.; ZUBIETA, C.; WILDERMUTH, M.C. Arabidopsis isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. **The Journal of Biological Chemistry,** Bethesda**,** v. 282, p. 5919–5933, 2007.

SUNKAR, R. MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. **Seminars in Cell e Developmental Biology**, London, v. 21, p. 805-811, 2010.

SUZA, W.; STASWICK, P. The role of JAR1 in jasmonoyl-L-isoleucine production in Arabidopsis wound response. **Planta**, Berlim**,** v. 227, p. 1221-1232, 2008.

SZYMANSKI, D.B.; LIAO, B.; ZIELINSKI, R.E. Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the Arabidopsis *Cam-3* promoter. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 1069-1077, 1996.

TADA, Y.; SPOEL, S. H.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K.; MOU, Z.; SONG, J.; WANG, C.; ZUO, J.; DONG, X. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. **Science,** Washington, v.321, p. 952–956, 2008.

TAKAHASHI, H.; MILLER, J.; NOZAKI, Y.; TAKEDA, M., SHAH, J., HASE, S., IKEGAMI, M., EHARA, Y.; DINESH-KUMAR, S.P. *RCY1*, an *Arabidopsis thaliana* RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to *Cucumber mosaic virus* requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. **Plant Journal ,** Oxford, v. 32, p. 655-667, 2002.

TAO, Y.; XIE, Z.; CHEN, W.; GLAZEBROOK, J.; CHANG, H.S.; HAN, B.; ZHU, T.; ZOU, G.; KATAGIRI, F. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae.* **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 317–330, 2003.

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, New York, v. 408, n. 8692,p. 796-815, 2000.

THINES, B.; KATSIR, L.; MELOTTO, M.; NIU, Y.; MANDAOKAR, A.; LIU, G.; NOMURA, K.; HE, S. Y..; HOWE, G. A.; BROWSE, J. JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COI1) complex during jasmonate signalling. **Nature**, New York, v. 448, p. 661–665, 2007.

THOMMA, B.P.H.J.; NÜRNBERGER, T.; JOOSTEN, M.H.A.J. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. **Plant Cell**, Rockville, v.23, p.4–15, 2011.

THOMPSON, G.A.; GOGGIN, F.L. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 755–766, 2006.

TRINKS, D.; RAJESWARAN, R.; SHIVAPRASAD, P.V.; AKBERGENOV, R.; OAKELEY, E. J.; VELUTHAMBI, K.; HOHN, T.; POOGGIN, M.M. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. **Journal of Virology,** Washington, v. 79, p. 2517–2527, 2005.

VAN DER DOES, D. van der; LEON-REYES, A.; KOORNNEEF, A.; VAN VERK, M. C.; RODENBURG, N.; PAUWELS, L.; GOOSSENS, A.; KÖRBES, A.P.; MEMELINK, J.; RITSEMA, T.; VAN WEES, S.C.; PIETERSE CM. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOI1-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. **Plant Cell,** Rockville**,** v. 25, v. 744-761, *2013.*

VAN HUIJSDUIJNEN, R.A.M.H.; ALBLAS, S.W.; DE RIJK, R.H.; BOL, J.F. Induction by salicylic acid of pathogenesisrelated proteins and resistance to alfalfa mosaic virus infection in various plant species. **Journal of General Virology**, London, v. 67, p. 2135–2144, 1986.

VAN LOON, L.C.; GERAATS, B.P.J.; LINTHORST, H.J.M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, p. 184–191, 2006a.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p.135–162, 2006b.

VAN OOSTEN, V.R. BODENHAUSEN, N.; REYMOND P.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C.; DICKE, M.; PIETERSE, C.M.J. Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, p. 919–930, , 2008.

VAN WEES, S.C.M.; DE SWART, E.A.M.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, p. 8711–8716, 2000.

VAN WEES, S.C.M.; VAN DER ENT, S.; PIETERSE, C.M.J. Plant immune responses triggered by beneficial microbes*.* **Current Opinion in Plant Biology***,* London*, v.*11*,* p. 443–448, 2008.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K. D.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N. V.; PAEPE, A. D.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v.3, n. 7,p. 1-11, 2002.

VERBERNE, M.C.; HOEKSTRA, J.; BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.M. Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. **Plant Journal**, Oxford, v. 35, p. 27–32, 2003.

VERBERNE, M. C.; SANSUK, K.; BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.M.; VERPOORTE, R. Vitamin K-1 accumulation in tobacco plants overexpressing bacterial genes involved in the biosynthesis of salicylic acid**. Journal of Biotechnology,** Amsterdam**,** v.128, p. 72–79, 2007.

VERGANI, A.R. **Transmisión y naturaleza de la “lepra explosiva” del naranjo**. Instituto Sanidad Vegetal. Ministerio de Agricultura de la Nación. Buenos Aires, 1945. p.1-11.

VERHAGE, A.; VLAARDINGERBROEK, I.; RAAYMAKERS, C.; VAN DAM, N. M.; DICKE, M.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Rewiring of the jasmonate signaling pathway in Arabidopsis during insect herbivory. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, p. 2-47, 2011.

VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; MORSE, A.; REIST, R.; KOLDITZ-JAWHAR, R.; WARD, E.; UKNES, S.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction**. Plant Cell,** Rockville**,** v. 6, p. 959–965, 1994.

VOINNET, O**.** RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends in Genetics,** Lausanne**,** v.17, p. 449-459, 2001.

VOS, I.A.; VERHAGE, A.; SCHUURINK, R.C.; WATT, L.G.; PIETERSE, C.M.; VAN WEES, S.C. Onset of herbivore-induced resistance in systemic tissue primed for jasmonate-dependent defenses is activated by abscisic acid. **Frontiers in Plant Science,** Lausanne**,** v. 4, p. 1-10, 2013.

VUORINEN, A.L.; KELLONIEMI, J.; VALKONEN, J.P. Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? **Plant Science,** Limerick**,** v. 181, p. 355–363, 2011.

WALKER, N.A technique whose time has come. **Science,** Washington, v.. 296,p. 557-558, 2002.

WAN, H.; ZHAO, Z.; QIAN, C.; SUI, Y.; MALIK, A.A.; CHEN, J. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. **Analytical biochemistry,** New York**,** v.399, p. 257–261, 2010.

WANG, D, AMORNSIRIPANITCH, N.; DONG, X. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. **Plos Pathogens,** San Francisco, v. 2, n. 11, p. e123, 2006.

WANG, L, HALITSCHKE, R, KANG, J. H.; BERG, A.; HARNISCH. F.; BALDWIN, I. T. Independently silencing two JAR family members impairs levels of trypsin proteinase inhibitors but not nicotine. **Planta,** Berlim**,** v. 226, p.159–167, 2007.

WANG, K.L.C.; LI, H.; ECKER, J.R. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. **Plant Cell,** Rockville, v. 14, n. 131–151, 2002.

WANG, L.Y.; LIN, S.S.; HUNG, T.H.; LI, T.K.; LIN, N.C.; SHEN, T.L. Multiple Domains of the *Tobacco mosaic virus* p126 Protein Can Independently Suppress Local and Systemic RNA Silencing. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 25, p. 648–657, 2012.

WANG, X.B.; WU, Q.; ITO, T.; CILLO, F.; LI, W.X.; CHEN, X.; YU, J.L.; DING, S.W. RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsisthaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** Washington**,** v. 107, p. 484–489, 2010.

WASTERNACK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany***,* London, v. 111, p. 1021–1058, 2013.

WATSON, S.; MERCIER, S.; BYE, C.; WILKINSON, J.; CUNNINGHAM, A.L.; HARMAN, A.N. Determination of suitable housekeeping genes for normalisation of quantitative real time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses. **Virology journal**, London, v. 4, p.130-135, 2007.

WEEKS, A.R.; MAREC, F.; BREEUWER, J.A.J. A mite species that consists entirely of haploid females. **Science,** Washington, v. 292, p. 2479-2483, 2001.

WEGE, C.; SIEGMUND, D**.** Synergism of a DNA and an RNA virus: enhanced tissue infiltration of the begomovirus *Abutilon mosaic virus* (AbMV) mediated by *Cucumber mosaic virus* (CMV). **Virology**, New York, v. 357, p. 10–28, 2007.

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**, Oxford, v. 33, p.271-283, 2003.

WHITHAM, S.A.; YANG, C.; GOODIN, M.M.; Global impact: elucidating plant responses to viral infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n.11, p.1207-1215, 2006.

WILDERMUTH, M.C.; DEWDNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F.M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, New York, v. 414, p. 562-565, 2001.

WU, J.; BALDWIN, I. T. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. **Annual Review of Genetics,** Palo Alto, v. 44, p. 1–24, 2010.

WU, Y.; ZHANG, D.; CHU, J.Y.; BOYLE, P.; WANG, Y.; BRINDLE, I.D.; DE LUCA, V. DESPRES, C. The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. **Cell Reports,** Cambridge v. 1, p. 639–647, , 2012.

XU, Q.; CHEN, L.; RUAN, X.; CHEN, D.; ZHU, A.; CHEN, C.; BERTRAND, D.; JIAO, W.; HAO, B.; PLYON, M.; CHEN, J.; GAO, S.; XING, F.; LAN, H.; CHANG, J.; GE, X.; LE, Y.; HU, Q.; MIAO, Y.; WANG, L.; XIAO, S.; BISWAS, M. K.; ZENG, W.; GUO, F.; CAO, H.; YANG, X.; XU, X. W.; CHENG, Y.; XU, J.; LIU, J.; LUO, O. J.; TANG, Z.; GUO, W. W.; KUANG, H.; ZHANG, H.; ROOSE, M. L.; NAGARAJAN, N.; DENG, X. X.; RUAN, Y. The draft genome of sweet orange (Citrus sinensis). **Nature Genetics,** New York**,** v.45, p. 59 – 66, 2013.

XIE, Z.; FAN, B.; CHEN, C.; CHEN, Z. An important role of an inducible RNAdependent RNA polymerase in plant antiviral defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** Washington**,** v. 98, p. 6516–6521, 2001.

XIE, Z.; KASSCHAU, K.D.; CARRINGTON, J.C. Negative feedback regulation of Dicer-like1 in Arabidopsis by microRNA guided mRNA degradation. **Current Biology**, London, v. 13, p. 784–789, 2003.

YAN, H.; DENG, X.; CAO, Y.; HUANG, J.; MA, L.; ZHAO, B. A novel approach for the construction of plant amiRNA expression vectors. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 151, p.9-14, 2011.

YANG, C.; GUO, R.; JIE, F.; NETTLETON, D.; PENG, J.; CARR, T.; YEAKLEY, J. M.; FAN, J. B.; WHITHAM, S. A. Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** Saint Paul, v.20, p. 359–370, 2007.

YU, K.; SOARES, J. M.; MANDAL, M. K.; WANG, C.; CHANDA, B.; GIFFORD, A. N.; FOWLER, J. S.; NAVARRE, D.; KACHROO, A.; KACHROO, P. A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and AZI1 mediates azelaic-acid-induced systemic immunity. **Cell Reports**, Cambridge, v.3, p. 1266-1278, 2013.

ZANDER M.; LA CAMERA S.; LAMOTTE O.; METRAUX J.P.; GATZ C. *Arabidopsis thaliana* class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. **Plant J**ournal, Oxford *v.* 61, p. 200–210, 2009.

ZARATE, S.I.; L. A. KEMPEMA, WALLING, L L. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology,** Minneapolis, v. 143, n.2, p. 866-875, 2007.

ZHANG, P.J.; BROEKGAARDEN, C.; ZHENG, S.-J.; SNOEREN, T.A.L.; VAN LOON, J.J.A.; GOLS, R.; DICKE, M. Jasmonate and ethylene signaling mediate whitefly-induced interference with indirect plant defense in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, Cambridge, v.197, p.1291–1299, 2013.

ZHANG, X.; YUAN, Y.R.; PEI, Y.; LIN, S.S.; TUSCHL, T.; PATEL, D,J.; CHUA, N.H. *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. **Genes & Development**, New York, v. 20, p. 3255–3268, 2006.

ZHANG, X.; ZHANG, X.; SINGH, J.; LI, D.; QU, F. Temperature-dependent survival of *Turnip crinkle virus*-infected Arabidopsis plants relies on an RNA Silencing-based defense that requires DCL2, AGO2, and HEN1. **Journal of Virology**, Washington, v. 86, p. 6847-6854, 2012.

ZHANG, P.J.; ZHENG, S.J.; VAN LOON, J.J.A.; BOLAND, W.; DAVID, A.; MUMM, R.; DICKE, M. Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, n. 21, p.202–221, 2009.

ZHANG, S.; ZHOU, J.; HAN, S.; YANG, W.; LI, W.; WEI, H.; LI, X.; Q. I. L. Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of Larix leptolepis **Biochemical and Biophysical Research Communications,** Orlando**,** v. 398, p.355-360, 2010.

ZHAO, Y.; DELGROSSO, L.; YIGIT, E.; DEMPSEY, D.A.; KLESSIG, D.F.; WOBBE, K.K. The amino terminus of the coat protein of Turnip crinkle virus is the AVR factor recognized by resistant arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactios**, Saint Paul, v. 13, p. 1015–1018, 2000.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology,** New York**, v.** 12, n.8, p.1045-62, 2005**.**

ZHAO, X.C.; QU, X.; MATHEWS, D.E.; SCHALLER, G. . Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 130, p. 1983–1991, 2002.

ZHU, Z.; GUO, H. Genetic basis of ethylene perception and signal transduction in Arabidopsis. **Journal of Integrative Plant Biology,** Beijing**,** v. 50, p. 808–815, 2008.

ZHUROV, V.; M. NAVARRO.; BRUINSMA, K. A.; ARBONA, A.; SANTAMARIA, M. E.; CAZAUX, M.; WYBOUW, N.; OSBORNE, E. J.; ENS, C.; RIOJA, C.; VERMEIRSSEN, V.; RUBIO-SOMOZA, I.; KRISHNA, P.; DIAZ, I.; SCHMID, M.; GÓMEZ-CADENAS, A.; VAN DE PEER, Y.; GRBIĆ, M.; CLARK, R. M.; VAN LEEUWEN, T.; GRBIĆ, V. Reciprocal Responses in the Interaction between Arabidopsis and the Cell-Content-Feeding Chelicerate Herbivore Spider Mite. **Plant Physiology** , Minneapolis, v. 164, n.1, p. 384-399,2014.

ZURBRIGGEN, M.D.; CARRILLO, N.; HAJIREZAEI, M-R. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for?. **Journal of Biotechnology,** Amsterdam, v.160, n.1/2, p. 80-90, 2012.