

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PAOLLA MENDES DO VALE DE ABREU

**ENVOLVIMENTO DE microRNAs NA INTERAÇÃO
Carica papaya L. E *Papaya meleira virus* COM
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

VITÓRIA – ES

2015



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Envolvimento de microRNAs na interação *Carica Papaya* L. e *Papaya meleira virus* com potencial biotecnológico

Paolla Mendes do Vale de Abreu

Vitória – ES

2015

Paolla Mendes do Vale de Abreu

**ENVOLVIMENTO DE microRNAs NA INTERAÇÃO
Carica papaya L. E *Papaya meleira virus* COM
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob orientação da Prof. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes como parte dos requisitos a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Vitória – ES

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Abreu, Paolla Mendes do Vale de, 1985 -

A158e Envolvimento de microRNAs na interação Carica papaya L. e
Papaya meleira virus com potencial biotecnológico / Paolla
Mendes do Vale de Abreu – 2015.

110 f. : il.

Orientador: Patricia Machado Bueno Fernandes.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. MicroRNAs. 2. Carica. 3. Biotecnologia. I. Fernandes,
Patricia Machado Bueno. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

PAOLLA MENDES DO VALE DE ABREU

**ENVOLVIMENTO DE microRNAs NA INTERAÇÃO *Carica papaya* L.
E *Papaya meleira virus* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dra. Maria Helena Bodanese Zanettini
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Examinadora

Prof. Dra. Maite Vaslin de Freitas Silva
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinadora

Prof. Dr. Silas Pessini Rodrigues
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador

Prof. Dr. Antônio Alberto Ribeiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à Prof. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes e ao Prof. A. Alberto Ribeiro Fernandes por acreditarem nas minhas capacidades como pesquisadora. Em especial agradeço à Prof. Patricia pela orientação, que permitiu o desenvolvimento da presente tese de doutorado, e ao Prof. Paulo C. G. Ferreira pela parceria e auxílio nas análises *in silico*.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio.

Ao meu marido, meu companheiro e amigo.

Aos meus pais e ao meu irmão por toda compreensão.

Às agências de apoio e financiamento: CNPq, FAPES, CAPES, FINEP e INCAPER.

RESUMO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais cultivadas e o mamão um dos frutos mais consumidos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mamão e está dentre os principais países exportadores. As doenças, no entanto, constituem os principais fatores limitantes da produção. A meleira do mamoeiro, causada pelo *Papaya meleira virus* (PMeV) é uma doença importante na produção de mamão capaz de causar a perda completa da produção. Apesar disso, pouco se conhece sobre os mecanismos de interação e de resposta do mamoeiro contra o PMeV e ainda não existe no mercado cultivares resistentes a este vírus. Sabe-se que a expressão de proteínas como a subunidade 20S do proteasoma é maior durante a infecção, sugerindo que a proteólise seja um mecanismo importante de resposta de defesa. Atualmente 10.598 microRNAs de plantas estão depositados no banco de dados *Plant miRNAs Database*, mas somente dois, miR162 e miR403 são codificados especificamente por *C. papaya*. Neste estudo, sequências conhecidas de microRNAs provenientes de diferentes espécies de plantas foram utilizadas na predição *in silico* de microRNAs no genoma de mamoeiro. Um total de 462 microRNAs foram preditos, representando 72 famílias de miRNAs conhecidas. A expressão de 11 microRNAs, cujos alvos estão envolvidos na degradação via proteasoma 20S e 26S e em outras vias de resposta a estresse, foi comparada por qRT-PCR em amostras de folhas de plantas saudáveis e infectadas com PMeV. A expressão de microRNAs envolvidos na degradação de proteínas via proteasoma aumentou em resposta a um baixo acúmulo relativo de PMeV e diminuiu com o aumento do acúmulo relativo viral. Por outro lado, a expressão de microRNAs envolvidos na resposta da planta ao estresse biótico diminuiu em resposta ao baixo acúmulo relativo viral e aumentou com o aumento do acúmulo relativo de PMeV. Os genes descritos como alvos de alguns dos miRNAs tiveram sua expressão modulada de uma maneira dependente. Diante dos resultados, alguns miRNAs foram apontados como importantes para a aplicação biotecnológica. Este estudo representa uma compreensiva predição de microRNAs em mamoeiro. A expressão diferencial de microRNAs específicos e a modulação de seus genes alvos é de grande ajuda para entender a interação particular entre o mamoeiro e o PMeV, responsável pelo desenvolvimento da meleira.

Palavras chave: MicroRNAs, proteasoma-ubiquitina, *Carica papaya*, PMeV.

ABSTRACT

Carica papaya L. is one of the most cultivated and consumed fruits in tropical and subtropical regions worldwide. Brazil is among the largest producers and exporters of papaya fruit. The pre-harvest diseases of papaya plants are the main limitation for fruit production. Papaya sticky disease is caused by the *Papaya meleira virus* (PMeV). It is a commercially important pathology in papaya culture potentially causing the complete loss of fruit production. Despite of this, little is known about the papaya interaction and response mechanisms against PMeV and there is not a papaya variety resistant to the virus. It is known that papaya 20S proteasome subunit levels of increase during PMeV infection, suggesting that proteolysis is an important feature of the plant defense response mechanisms. To date, 10,598 plant microRNAs have been identified in the Plant miRNAs Database (name of the DB), but only two microRNAs, miR162 and miR403, are from papaya. In this study, plant microRNA sequences were used to search for putative microRNAs in the papaya genome. A total of 462 microRNAs, representing 72 microRNA families, were predicted to occur in papaya. Out of these, the expression of 11 microRNAs, whose targets are known to be involved in 20S and 26S proteasomal degradation and in other stress response pathways, was estimated using real-time PCR, comparing healthy and infected papaya leaf tissues. The expression of miRNAs involved in proteasomal degradation increased in response to very low levels of PMeV titre and decreased as the viral titre increased. In contrast, biotic stress-related miRNAs levels decreased in papaya tissues infected with low virus titre and increased at high PMeV levels. Corroborating this results, analysed target genes for this miRNAs had their expression modulated in a dependent manner. With the results, some miRNAs were identified as relevant to the biotechnological application. This study represents a comprehensive prediction of miRNAs in papaya. The data presented here might help to complement the available molecular and genomic tools for the study of papaya. The differential expression of specific miRNAs and the modulation of their target genes will be helpful for understanding the particular interaction of PMeV and papaya responsible of disease development.

Key words: MicroRNAs, proteasome-ubiquitin, *Carica papaya*, PMeV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintomas da infecção por PMeV em mamoeiros (<i>Carica papaya</i>)	17
Figura 2. O sistema UPS	21
Figura 3. Esquema de imunidade antiviral baseada no silenciamento do RNA	24
Figura 4. Síntese de microRNAs e seu mecanismo de regulação de RNAs mensageiros	26
Figura 5. Esquema para busca por homologia de miRNAs no genoma de <i>Carica papaya</i>	29
Figura 6. Exemplos de supressão do silenciamento por diferentes viroses de planta	31
Figura 7. Estratégias para avaliar o envolvimento de miRNAs na interação mamoeiro-PMeV e no desenvolvimento dos sintomas da meleira	35
Figura 8. Experimento de campo conduzido na fazenda experimental do INCAPER em Sooretama-ES	38
Figura 9. Coleta de amostras de folha em plantas cultivadas no campo	39
Figura 10. Estabilidade dos genes de referência em mamoeiros infectados com PMeV	42
Figura 11. Seleção de genes alvos de determinados miRNAs para análise em <i>C. papaya</i>	48
Figura 12. Procedimento para busca de microRNAs e de seus alvos no genoma de <i>Carica papaya</i>	47
Figura 13. Termos do <i>Gene Ontology</i> (GO) relacionados aos alvos dos miRNAs em <i>Carica papaya</i>	49
Figura 14. Quantificação relativa do acúmulo de PMeV em folhas de mamoeiros sadios e com sintomas da meleira	51
Figura 15. Relacionamento dos miRNAs e a degradação proteasomal	55
Figura 16. Quantificação relativa de miRNAs relacionados ao sistema UPS em folhas de mamoeiros sadios e com sintomas da meleira	60
Figura 17. Quantificação relativa de miRNAs relacionados vias de resposta a estresse em folhas de mamoeiros sadios e com sintomas da meleira	64
Figura 18. Quantificação de RNAs em folhas de mamoeiros sadios e com sintomas da meleira	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos iniciadores para análise da expressão dos genes alvos por qRT-PCR	48
Tabela 2. Sequências disponíveis comercialmente para análise de miRNAs em plantas. Estas sequências foram usadas para análise de miRNAs em <i>Carica papaya</i>	53
Tabela 3. Genes alvos dos miRNAs identificados em <i>Carica papaya</i> e usados para estudo da interação mamoeiro-PMeV	56

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGO	Argonauta
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CP	Proteína capsial (do inglês <i>Capsid protein</i>)
DCL	Enzima DICER (do inglês <i>Dicer-like</i>)
dsRNA	RNA dupla-fita (do inglês <i>Double-stranded RNA</i>)
DUB	Deubiquitinação
E1	Enzima de ativação da ubiquitina
E2	Enzima de conjugação da ubiquitina
E3	Ubiquitina ligase
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês <i>Food and agriculture organization of the united nations</i>)
GO	Ontologia do gene (do inglês <i>Gene Ontology</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HR	Resposta de hipersensibilidade (do inglês <i>Hypersensitive response</i>)
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
miRNA(s)	MicroRNA(s)
mRNA	RNA mensageiro (do inglês <i>Messenger RNA</i>)
NB-LRR	Proteínas de ligação a nucleotídeos ricas em repetição de leucina (do inglês <i>Nucleotide binding-leucine rich repeat</i>)
NO	Óxido nítrico (do inglês <i>Nitric oxide</i>)
nt	Nucleotídeo
pb	Pares de base

PCD	Morte celular programada (do inglês <i>Programmed cell death</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>)
PMeV	<i>Papaya meleira virus</i>
PMRD	Banco de dados de miRNAs de plantas (do inglês <i>Plant microRNA database</i>)
pre-miRNA	Precursor de microRNA (do inglês <i>Precursor-microRNA</i>)
pri-miRNA	MicroRNA primário (do inglês <i>Primary-microRNA</i>)
PTGS	Silenciamento pós-transcricional do gene (do inglês <i>Post-transcriptional gene silencing</i>)
PVX	<i>Potato virus X</i>
qRT-PCR	Transcrição reversa-Reação em cadeia da polimerase quantitativa (do inglês <i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RISC	Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>Reactive oxygen species</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa-Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
siRNA(s)	Pequeno(s) RNA(s) de interferência (do inglês <i>Small interfering RNA</i>)
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
UPS	Sistema proteasoma-ubiquitina (do inglês <i>Ubiquitin-proteasome system</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. A importância econômica do mamão na fruticultura	15
1.2. A meleira do mamoeiro, doença causada pelo Papaya meleira virus.....	15
1.3. O sistema proteasoma 26S-Ubiquitina e sua participação na defesa contra vírus em plantas.....	19
1.4. Mecanismos naturais de defesa das plantas contra viroses	23
1.5. Predição de miRNAs no genoma de planta	27
1.6. Supressores virais do silenciamento	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Geral	33
2.1. Específicos.....	33
3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	35
4. METODOLOGIA	37
4.1. Busca in silico de miRNAs e de seus genes alvos em Carica papaya.....	37
4.2. Cultivo de plantas de Carica papaya no campo.....	37
4.3. Avaliação do acúmulo relativo do PMeV por qRT-PCR	39
4.4. Extração e purificação de miRNAs e RNAs	42
4.5. Síntese da fita complementar do DNA (cDNA)	43
4.6. Análise quantitativa dos miRNAs e de seus genes alvos por qRT-PCR	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Identificação in silico de miRNAs e de seus genes alvos em Carica papaya..	46
5.2. Diagnóstico molecular do PMeV nas plantas selecionadas para estudo	50
5.3. Identificação in silico de miRNAs que regulam importantes vias de defesa contra patógenos	51
5.4. Expressão dos miRNAs envolvidos na degradação proteasomal.....	59
5.5 Expressão dos miRNAs envolvidos em diferentes vias de resposta a estresse	63
6. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	69
7. CONCLUSÕES	72
8. PERSPECTIVAS.....	74

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
10. ANEXOS	88
Anexo 1. Resultados do qRT-PCR usados para avaliar o melhor gene de referência para as análises em amostras de folhas de mamoeiros assintomáticos e com sintomas de meleira.	88
Anexo 2. Resultados do qRT-PCR usados para avaliar a expressão de miRNAs envolvidos na via Proteasoma-Ubiquitina em amostras de folha de mamoeiros assintomáticos e com sintomas da meleira.....	91
Anexo 3. Resultados do qRT-PCR usados para avaliar a expressão de miRNAs envolvidos em diferentes vias de resposta a estresse em amostras de folha de mamoeiros assintomáticos e com sintomas da meleira.	97
Anexo 4. Resultados do qRT-PCR usados para avaliar a expressão de mRNAs envolvidos em diferentes vias de resposta a estresse em amostras de folha de mamoeiros assintomáticos e com sintomas da meleira.	102
Anexo 5. Representação esquemática dos mecanismos de defesa da planta contra patógenos	104
Anexo 6. Artigo científico publicado (PlosOne).	105
Anexo 7. Artigo científico submetido (Viruses).....	106
Anexo 8. Capítulo de livro publicado (Nova Science Publishers).....	108
Anexo 9. Capítulo de livro em publicação (Editora Edgard Blücher).....	109

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância econômica do mamão na fruticultura

A demanda do mercado por frutos tropicais frescos vem crescendo de forma constante ao longo das duas últimas décadas. No ano de 2012 a produção mundial atingiu 20 milhões de toneladas, levando a um rendimento de 8 bilhões de dólares (FAOSTAT, 2012).

O mamão é uma das frutos com maior produção no mundo, com 11,96 milhões de toneladas e rendimento de 3,4 bilhões de dólares (FAOSTAT, 2012). A produção brasileira é responsável por 1,5 milhões de toneladas, ficando atrás apenas da Índia (FAOSTAT, 2012).

Os últimos dados publicados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) ainda apontam que as exportações desse fruto no mundo superaram 250 mil toneladas e causaram a movimentação de cerca de 185 milhões de dólares, sendo o Brasil o segundo maior exportador (FAOSTAT, 2011).

A área cultivada com mamão no Brasil é superior a 30 mil hectares (FAOSTAT, 2012), sendo que as maiores plantações estão localizadas no estado do Espírito Santo, onde chegou a ultrapassar 10 mil hectares.

A demanda por frutos de alta qualidade é grande, sendo os principais importadores de mamão brasileiro os Estados Unidos. No entanto, a cultura é bastante suscetível a doenças causadas por patógenos, um dos principais fatores limitantes da produção. Os vírus constituem o principal grupo de microrganismos que causam doenças no mamoeiro, podendo levar à destruição total das plantações infectadas.

1.2. A meleira do mamoeiro, doença causada pelo *Papaya meleira virus*

O vírus da meleira, *Papaya meleira virus* (PMeV), cujo genoma é um RNA dupla-fita (dsRNA, do inglês *double-stranded RNA*) (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2003), é um dos principais que infectam o mamoeiro no Brasil. A meleira do mamoeiro foi relatada na década de 80 nos estados brasileiros da Bahia e do Espírito Santo. Em poucos anos a doença atingiu os estados de Pernambuco e do Ceará. Atualmente

esta doença ocorre no Espírito Santo, Bahia, Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Minas Gerais (DALTRO et al., 2014). Fora do Brasil, o México é o único país onde a meleira do mamoeiro também foi relatada (PEREZ-BRITO et al., 2012).

Ainda não está claro se o PMeV pode ser transmitido para as plântulas germinadas a partir de sementes. A transmissão por sementes foi estudada e não foi detectado PMeV em *pools* de plântulas derivadas de sementes sadias e infectadas de mamoeiros cv. Golden (ABREU et al., 2012). Por outro lado, um estudo recente com sementes de mamoeiro cv. Maradol mostrou que o PMeV é transmitido para a próxima geração através de sementes contaminadas, o que poderia explicar o aparecimento do vírus no México (TUSSELL et al., 2014). Há de se considerar, no entanto, que sementes de mamão têm uma estrutura muito “enrugada”, e em plantas com sintomas de meleira no México, elas ficam embebidas em látex infectado. Por isso, ainda é necessário confirmar se o PMeV está no embrião ou no invólucro exterior da semente.

O PMeV reside nos laticíferos (KITAJIMA et al., 1993). Todos os órgãos do mamoeiro possuem laticíferos, cujas células são capazes de produzir látex. Normalmente, essas células estão sob alta pressão de turgência e o látex produzido tem uma consistência leitosa. A exsudação de látex de plantas sadias ocorre somente por meio de lesões no tecido. Ao contrário, na meleira a exsudação ocorre espontaneamente em frutos e folhas e o látex é aquoso e fluido (VENTURA et al., 2003). Já foi demonstrado que o PMeV altera os níveis de potássio e o balanço osmótico, levando à ruptura das células e à exsudação de látex (RODRIGUES et al., 2009). Uma vez exposto à atmosfera, esse látex oxida rapidamente e escurece, dando o aspecto de “melado” ao fruto, o que o compromete comercialmente (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004) (Figura 1 A,B).



Figura 1. Sintomas da infecção por PMeV em mamoeiros (*Carica papaya*). O PMeV reside nos laticíferos, onde ele modifica os níveis de potássio e o balanço osmótico, levando à ruptura das células e à exsudação de látex fluido e aquoso de frutos e folhas jovens. O látex é oxidado ao entrar em contato com o ar atmosférico, dando o aspecto de melado ao frutos (A, B), o que o torna inaceitável para o consumo, e resultando em pequenas lesões necróticas na ponta de folhas jovens (C).

Atualmente, o único método de controle da meleira do mamoeiro no campo é a destruição das plantas com sintomas visíveis da doença (*roguing*). Um dos primeiros sintomas detectados são pequenas lesões necróticas nas extremidades das folhas mais novas, causadas pela oxidação do látex (VENTURA et al., 2003) (Figura 1C). No entanto, os sintomas da meleira só são manifestados após o florescimento e, portanto, muitas plantas infectadas permanecem no campo constituindo importantes fontes de inóculo.

O primeiro método molecular que permitiu a detecção precoce do PMeV foi realizado através da extração do dsRNA viral a partir do látex das plantas sintomáticas para a meleira (RODRIGUES et al., 2005). Também foram descritos os procedimentos para a coleta e armazenamento de amostras de látex no campo visando sensibilidade máxima no diagnóstico (RODRIGUES et al., 2009). Mais recentemente, foram propostos dois novos métodos de diagnóstico utilizando-se RT-PCR e RT-PCR

quantitativo (qRT-PCR, do inglês *quantitative RT-PCR*), expandindo-se o diagnóstico do PMeV para tecidos de mamoeiros, tornando-o ainda mais sensível (ABREU et al., 2012). Essa sensibilidade permitiu identificar diversas plantas no campo que passaram pelo processo de florescimento, assintomáticas para a meleira, mas infectadas com o PMeV.

No entanto, mesmo com o aprimoramento das ferramentas de diagnóstico do PMeV, há uma carência de informações sobre os aspectos chave na interação planta x vírus, o que impossibilita a implementação de estratégias mais efetivas de controle da meleira. Até o momento, os fatores envolvidos no aparecimento dos sintomas dessa doença são desconhecidos e não foram identificadas variedades de mamoeiro resistentes ao PMeV.

O PMeV é o único vírus que foi descrito infectando laticíferos (ARAÚJO et al., 2007; MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2003; RODRIGUES et al., 2009), um tecido especializado na produção e estoque de látex, rico em proteínas de defesa e metabólitos (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008). O látex de mamoeiro é composto de várias cisteíno-proteínases, carboidratos, sais, lipídeos e glutatona. As proteínases são sintetizadas como precursores inativos que são convertidos em enzimas maduras após o ferimento e a exsudação de látex (EL MOUSSAOUI et al., 2001). A habilidade de o PMeV habitar um ambiente tão hostil, sugere, portanto, uma intrigante interação com o mamoeiro.

Na tentativa de entender os mecanismos envolvidos na interação mamoeiro-PMeV, estudou-se os efeitos causados por este vírus nos laticíferos de plantas infectadas. Análises de proteômica comparativa de látex de mamoeiros sadios e infectados mostraram que o vírus reduz os níveis e a atividade de cisteíno-proteases (tipo quimopapaína), sugerindo seu papel importante na interação planta-vírus (RODRIGUES et al., 2012).

Já foi demonstrado o acúmulo de cristais de oxalato de cálcio no látex de mamoeiros infectados com PMeV e o aumento da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nos laticíferos e nas células companheiras do floema destas plantas (RODRIGUES et al., 2009). Isso indica a ativação das vias de sinalização desencadeadas por

H₂O₂, mostrando o efeito sistêmico do PMeV em mamoeiros (RODRIGUES et al., 2009), e conseqüentemente, o estabelecimento de respostas de defesa.

As respostas do mamoeiro à infecção por PMeV e o papel do óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) neste processo foram avaliadas (BUSS et al., 2011). O NO induz o aumento de peroxidases, compostos fenólicos e carboidratos em plantas infectadas, mostrando a indução de respostas de defesa antioxidantes, importantes na defesa da planta contra vírus (BUSS et al., 2011).

Ainda, visando compreender as vias regulatórias moduladas pelo PMeV, amostras de plantas doentes coletadas no campo foram analisadas utilizando abordagens complementares de proteômica (eletroforese bi-dimensional, 2-DE e marcação fluorescente diferencial, DIGE, seguidas de espectrometria de massas, LC-MS/MS) (RODRIGUES et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011). A comparação entre plantas saudáveis e com sintomas da meleira revelou várias proteínas expressas diferencialmente. Proteínas relacionadas ao metabolismo são reprimidas enquanto proteínas de resposta a estresse são superexpressas em plantas sintomáticas para a meleira do mamoeiro. A calreticulina e as proteínas da via do proteassoma (subunidades 20S e RPT5a, principalmente) são superexpressas em resposta à infecção com PMeV, sugerindo uma tentativa do mamoeiro em controlar a infecção, possivelmente endereçando proteínas virais para degradação via proteassoma (RODRIGUES et al., 2011). No entanto, esse mecanismo de resistência não é suficiente para impedir a infecção do PMeV, já que severos sintomas da meleira são desencadeados no campo (RODRIGUES et al., 2011).

1.3. O sistema proteasoma 26S-Ubiquitina e sua participação na defesa contra vírus em plantas

Vários estudos mostram o envolvimento do sistema proteasoma 26S-ubiquitina (UPS, do inglês *Ubiquitin-Proteasome System*) na sinalização e regulação de interações entre plantas e patógenos (CITOVSKY et al., 2009; DIELEN et al., 2010; MARINO; PEETERS; RIVAS, 2012), particularmente a exploração e interferência viral com este sistema (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN, 2012; ISAACSON; PLOEGH, 2009; RANDOW; LEHNER, 2009).

A ubiquitina é uma pequena proteína altamente conservada entre os eucariotos (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN, 2012) que se liga covalentemente a uma proteína alvo, modificando assim sua estabilidade, localização ou função. O processo de ligação da ubiquitina à proteína alvo é controlado por três classes de enzimas: a enzima de ativação da ubiquitina (E1), a enzima de conjugação da ubiquitina (E2) e a ubiquitina ligase (E3). Durante o processo de ativação, a ubiquitina é transferida à E1. Após isso, ela é transferida para a enzima E2 e daí, com auxílio da ubiquitina ligase E3, é transferida para a proteína alvo (Figura 2). A ubiquitina é transferida à proteína alvo por uma ligação entre o resíduo de glicina C-terminal e um aceptor da proteína alvo, que é em muitos casos um resíduo de lisina. O resíduo de lisina da ubiquitina pode funcionar como um sítio para a adição de novas moléculas de ubiquitina, gerando cadeias poliubiquitiniladas (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN, 2012). Sete resíduos de lisina (Lis-6, Lis-11, Lis-27, Lis-29, Lis-33, Lis-48 e Lis-63) podem funcionar como um aceptor de novas moléculas de ubiquitina. Destes, o resíduo Lis-48 é o mais bem estudado e a cadeia de poliubiquitina nesse caso está associada à degradação pelo proteasoma (Figura 2). As demais cadeias são destinadas para outros processos celulares, muitos dos quais ainda permanecem desconhecidos (IKEDA; DIKIC, 2008).

A enzima E3 é na verdade uma grande família de proteínas que medeia a especificidade da ligação entre a ubiquitina e a proteína de interesse (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN, 2012). Dependendo se o processo foi de mono ou poliubiquitinação e do tamanho da cadeia de ubiquitina, a ubiquitinação de proteínas pode ter diferentes funções dentro da célula (Figura 2) (IKEDA; DIKIC, 2008).

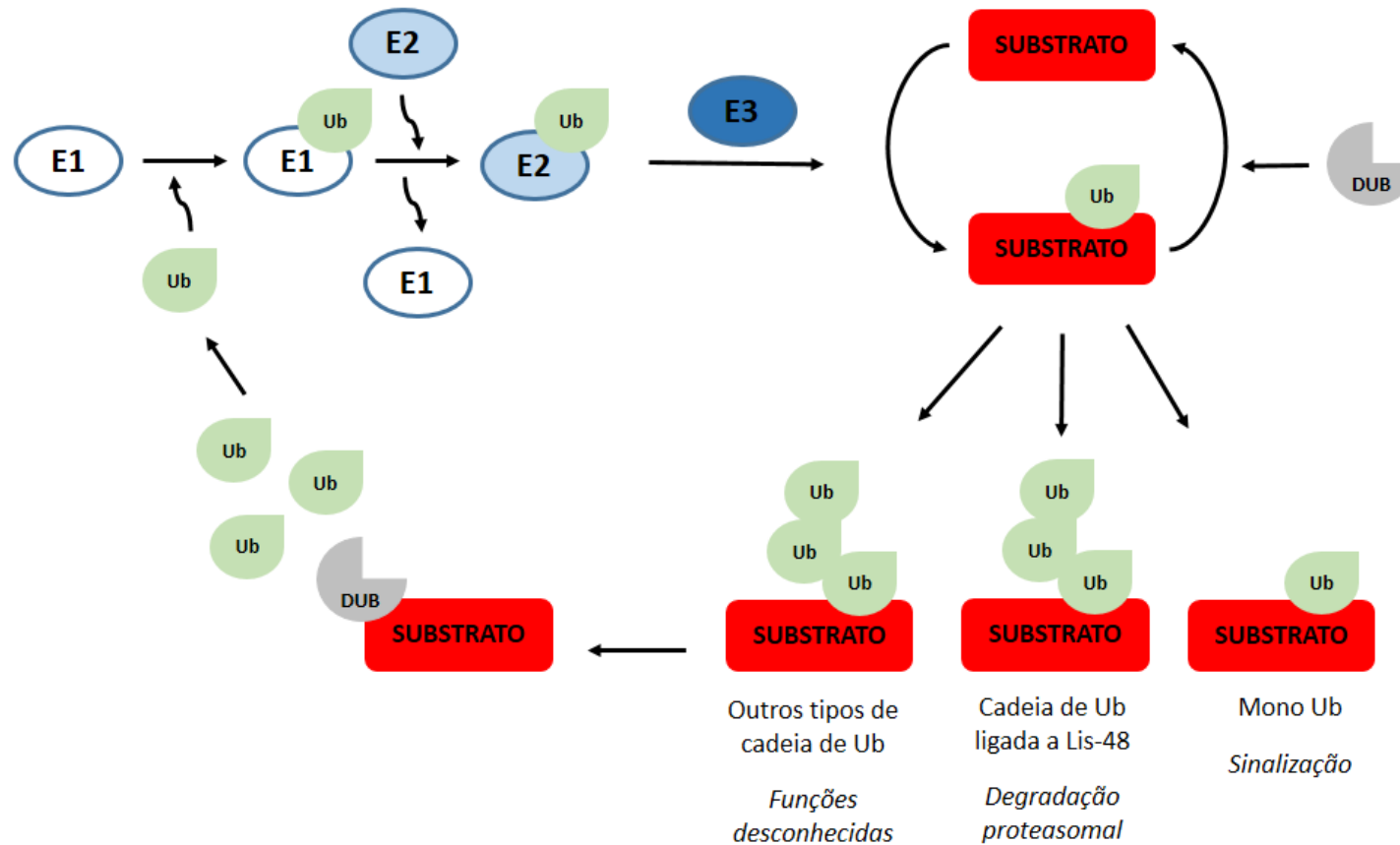


Figura 2. O sistema UPS. A ubiquitinação de uma proteína alvo ocorre por meio da ação sequencial de três classes de enzimas: a enzima de ativação da ubiquitina (E1), a enzima de conjugação da ubiquitina (E2) e a ubiquitina ligase (E3). A ubiquitinação pode ser revertida pela ação de enzimas de deubiquitinação (DUBs). A monoubiquitinação está associada aos processos de sinalização celular. O resíduo de lisina (Lis) da ubiquitina pode funcionar como um sítio para a adição de novas moléculas de ubiquitina, gerando cadeias poliubiquitiniladas. O resíduo Lis-48 é o mais bem estudado e a cadeia de poliubiquitina nesse caso está associada à degradação pelo proteasoma. As demais cadeias são destinadas para outros processos celulares, muitos dos quais ainda permanecem desconhecidos.

A ubiquitinação pode ser revertida pela ação de enzimas conhecidas como enzima de deubiquitinação (DUB) (KOMANDER; CLAGUE; URBE, 2009). Essas enzimas são responsáveis por controlar processos celulares como a estabilização da proteína e a homeostase da ubiquitina dentro da célula (Figura 2) (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN, 2012).

A degradação mediada por ubiquitina é muito conservada nos eucariotos e tem um importante papel nas interações das plantas com patógenos. O sistema UPS é usado pela planta nos processos de defesa antiviral levando, por exemplo, proteínas virais à degradação. Por outro lado, esse sistema também pode ser usado pelo vírus, que é capaz de prejudicar o processo de defesa da planta, como por exemplo, aquele desencadeado pela via de silenciamento do RNA. Em alguns casos, as proteínas virais usam o sistema UPS para levar proteínas do hospedeiro à degradação e, em outros, as proteínas virais são elas mesmas alvos da degradação proteasomal. Ainda não se sabe se esses eventos de ubiquitinação são importantes no ciclo de vida viral ou se são tentativas falhas do hospedeiro para conter a infecção (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN, 2012).

Diferentes viroses de planta exploram o sistema UPS em seu próprio benefício usando diferentes mecanismos. Alguns deles são a modificação do ciclo celular (LAI et al., 2009), a perturbação de vias de sinalização hormonal e de desenvolvimento vegetal (EINI et al., 2009), a modificação nas respostas de defesa desencadeadas por hormônios (LOZANO-DURAN et al., 2011a; LOZANO-DURAN et al., 2011b), a inibição da via de silenciamento do RNA (CHIU et al., 2010; FUSARO et al., 2012), a regulação de respostas de defesa (THIEL; VARRELMANN, 2009) e da replicação viral (CHENON et al., 2012). Interessantemente, várias proteínas relacionadas ao sistema UPS são induzidas durante a infecção viral em plantas (ARANDA et al., 1996; RODRIGUES et al., 2011; TAKIZAWA; GOTO; WATANABE, 2005; WHITHAM et al., 2003; YE et al., 2011; YE; VERCHOT, 2011).

1.4. Mecanismos naturais de defesa das plantas contra viroses

As plantas possuem diversos mecanismos de defesa, que podem ser de natureza estrutural, química e/ou baseada em proteínas e RNAs, desenhados para detectar organismos invasores e interromper a infecção antes que ela cause grandes danos. A resposta de defesa antiviral está baseada no silenciamento do RNA, conhecido em plantas como silenciamento pós-transcricional do gene (PTGS, do inglês *Post-transcriptional gene silencing*).

As vias de silenciamento do RNA estão baseadas em pequenas moléculas de RNA (21-24 nucleotídeos), que podem ser microRNAs (miRNAs) ou siRNAs (do inglês *small interfering RNAs*). Esses pequenos RNAs controlam a expressão pós-transcricional de alguns genes específicos e contribuem para a defesa contra vírus (DING, 2010; DUAN; WANG; GUO, 2012; HOHN; VAZQUEZ, 2011; LLAVE, 2010), viróides (NAVARRO et al., 2012) e transposons (MOSHER; MELNYK, 2010).

O silenciamento do RNA envolve: (1) o processamento de RNA dupla-fita (dsRNA), pela proteína DICER, em pequenos RNAs dupla-fita, (2) a captura de uma das fitas (fita guia) pela proteína Argonauta (AGO) para formar o complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*) e (3) o reconhecimento de sequências homólogas de RNA por RISC (MALLORY; VAUCHERET, 2010; VAZQUEZ; LEGRAND; WINDELS, 2010; VOINET, 2009).

Em plantas, as vias de síntese de miRNAs ou siRNAs são caracterizadas pela atividade de enzimas DICER (DCL) específicas. Quatro diferentes DCLs são descritas em plantas com cada uma gerando pequenos RNAs de tamanhos determinados. DCL1 gera miRNAs de 21-22 nt e DCL3 gera longos miRNAs de 23-24 nt (BOUTET et al., 2003; PARK et al., 2002; VAZQUEZ et al., 2008). DCL2, DCL3 e DCL4 geram siRNAs de 21 e 22 nt (CHELLAPPAN et al., 2010; VAZQUEZ et al., 2008).

Moléculas de dsRNA são produzidas durante a infecção viral, especialmente quando ocorre o processo de replicação do genoma do vírus invasor nas células da planta infectada (PURKAYASTHA; DASGUPTA, 2009; SIDAHMED; WILKIE, 2010). Essas moléculas são reconhecidas pela planta, que inicia a degradação das mesmas em pequenas moléculas de siRNAs por meio da atividade da DICER. Os siRNAs

derivados de sequências virais, então, guiam uma imunidade antiviral específica, uma vez que elas selecionam e destroem um mRNA alvo por pareamento de bases (DING, 2010) (Figura 3).

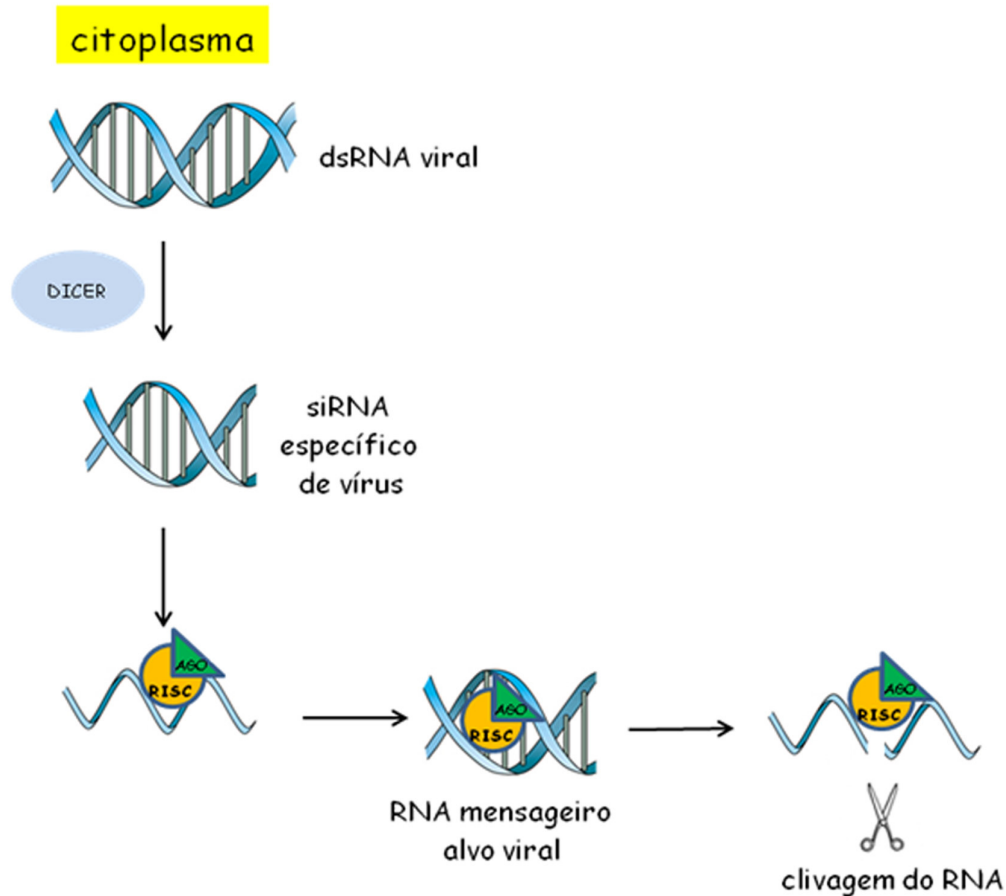


Figura 3. Esquema de imunidade antiviral baseada no silenciamento do RNA. No citoplasma, moléculas de dupla-fita de RNA (dsRNA) virais são reconhecidas pela planta, que inicia a degradação das mesmas em pequenas moléculas de dupla-fita de RNA (siRNAs) por meio da atividade da enzima DICER. Uma das fitas do siRNA é incorporada ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) junto com a proteína Argonauta (AGO). Essa fita é guiada a uma molécula de mRNA alvo viral, que é selecionado por pareamento de bases. O mRNA é, então, clivado/silenciado, impedindo o progresso da infecção viral.

Os siRNAs também estão envolvidos na sinalização celular. Acredita-se que siRNAs derivados de vírus sejam responsáveis pela resposta de defesa antiviral sistêmica da planta. O pequeno tamanho desses siRNAs facilita o transporte tanto por meio do plasmodesmo como do floema. Entretanto, o transporte através do floema não é passivo, sendo necessárias proteínas transportadoras. Assim, siRNA pode ser transportado e agir sistemicamente a longas distâncias para mediar a proteção antiviral em células não infectadas (BROSNAN; VOINNET, 2011; MELNYK; MOLNAR; BAULCOMBE, 2011).

Para avaliar o efeito do dsRNA do PMeV no progresso da infecção viral em mamoeiros, mudas de mamoeiro foram co-inoculadas com látex infectado com PMeV e dsRNA purificado deste mesmo vírus. Em um intervalo de 57 dias pós-inoculação com PMeV, o acúmulo viral foi menor em plantas co-inoculadas do que em plantas inoculadas apenas com vírus, mostrando, portanto, que o dsRNA induz uma resposta de defesa em mamoeiros, podendo levar à inibição da replicação viral. (ABREU et al., 2012).

Ao contrário dos siRNAs, os miRNAs são RNAs endógenos. No processo de síntese, os microRNAs são inicialmente transcritos como longos RNAs que contêm estruturas em forma de grampo (*hairpin*) imperfeitas (Figura 4). Esses são os miRNAs primários (pri-miRNA, do inglês *primary miRNAs*), transcritos ainda no núcleo da célula. Os pri-miRNAs são processados pela enzima DCL1 em precursores de miRNAs (pre-miRNAs, do inglês *precursor miRNAs*) (Figura 4). Estes são transportados ao citoplasma por proteínas presentes na membrana nuclear. No citoplasma, a enzima DICER processa os pre-miRNAs em miRNAs maduros (Figura 4).

Cada miRNA maduro é derivado de uma porção dupla-fita do *hairpin* e é inicialmente um duplex de dois RNAs com ~22 nt. Um destes RNAs é o miRNA maduro enquanto o outro, conhecido como miRNA*, vem do braço oposto do *hairpin* (KHVOROVA; REYNOLDS; JAYASENA, 2007; REINHART et al., 2002; SCHWARZ et al., 2007). O miRNA* é degradado enquanto uma das fitas, miRNA maduro, é incorporada no complexo RISC junto com a proteína AGO (KHVOROVA; REYNOLDS; JAYASENA, 2007; SCHWARZ et al., 2007). Este complexo tem como alvo RNAs mensageiros com sequências idênticas ou muito similares à sequência do miRNA, levando respectivamente, à completa degradação ou alteração da tradução do mRNA (Figura 4).

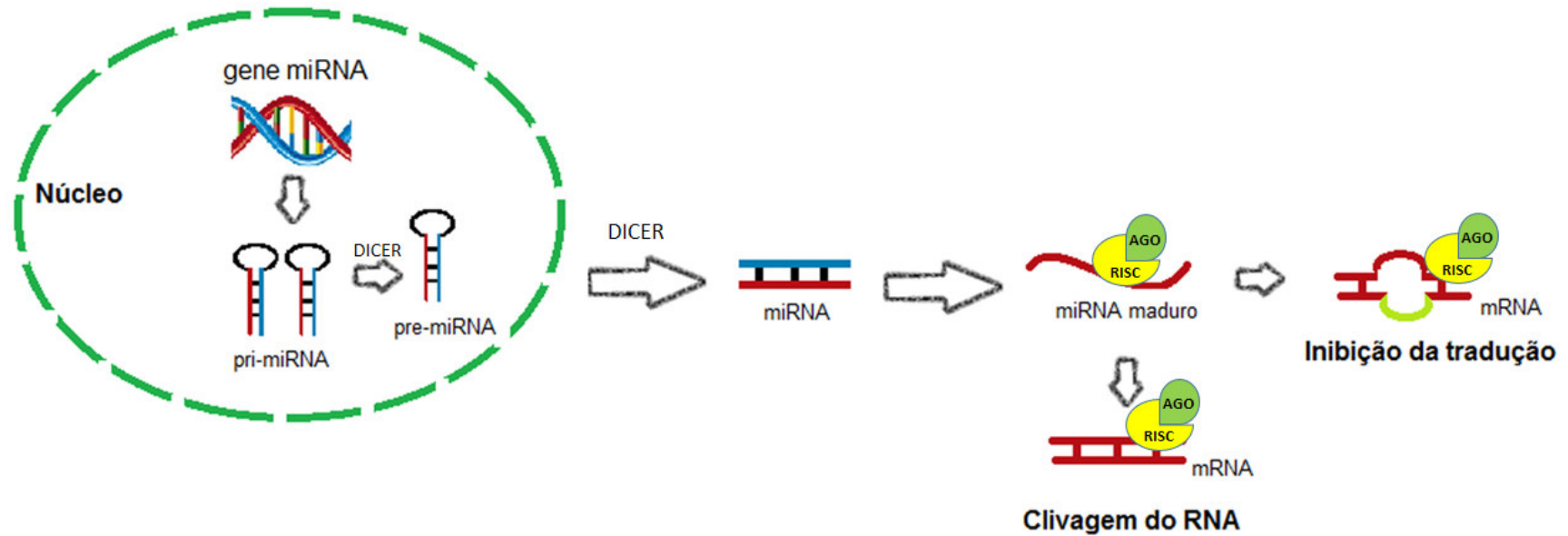


Figura 4. Síntese de microRNAs e seu mecanismo de regulação de RNAs mensageiros. Os microRNAs são inicialmente transcritos como longos RNAs que contêm estruturas em forma de grampo (*hairpin*) imperfeitas. Esses são os miRNAs primários (pri-miRNA), transcritos ainda no núcleo da célula. Os pri-miRNAs são processados pela enzima DICER em precursores de miRNAs (pre-miRNAs). Estes são transportados ao citoplasma por proteínas presentes na membrana nuclear. No citoplasma, a enzima DICER processa os pre-miRNAs em miRNAs maduros. Cada miRNA maduro é derivado de uma porção dupla-fita do *hairpin* e é inicialmente um duplex de dois RNAs com ~22 nt. Uma destas fitas de RNA é incorporada no Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) junto com a proteína Argonauta (AGO) e tem como alvo mRNAs com sequências idênticas ou muito similares ao miRNA levando, respectivamente, à completa degradação ou alteração da tradução do mRNA.

Já se sabe que os miRNAs estão envolvidos no desenvolvimento (CARRINGTON; AMBROS, 2003; CHEN, 2005; FUJII et al., 2005; JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006; JOVER-GIL; CANDELA; PONCE, 2005; LAI, 2003) e nas respostas a estresse abiótico (CHEN, 2005; FUJII et al., 2005; JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006).

Já foi relatado que a infecção viral provoca mudanças na expressão de miRNAs em *Arabidopsis* (TAGAMI et al., 2007) e está relacionada ao desenvolvimento de sintomas de doença em *Nicotiana tabacum* (BAZZINI et al., 2007) e em tomate (NAQVI; HAQ; MUKHERJEE, 2010), por exemplo. Também já foi relatado tanto aumento quanto queda na expressão de miRNAs em plantas de tabaco infectadas com vírus, havendo aumento da expressão de alguns miRNAs envolvidos no aparecimento de sintomas (LANG et al., 2011). Sabe-se que os miRNAs são capazes de regular genes de resistência nas plantas, como aqueles que codificam para receptores imunes intracelulares NB-LRR, sendo portanto, indiretamente candidatos para induzir resistência viral.

Teoricamente é possível que os miRNAs tenham como alvo genes virais, como fazem os siRNAs. Uma abordagem de bioinformática mostrou que miRNAs presentes em diferentes plantas têm atividade antiviral por terem como alvo genomas de vírus que codificam para, por exemplo, proteína da cápsula protéica (CP) (PEREZ-QUINTERO et al., 2010). No entanto, isso não retrata muito bem o que ocorre naturalmente porque os vírus têm alta capacidade de mutação, podendo escapar rapidamente da ação dos miRNAs (SIMON-MATEO; GARCIA, 2006).

1.5. Predição de miRNAs no genoma de planta

Existem diferentes métodos para identificar miRNAs, como a clonagem, o sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*) e a bioinformática, baseada em abordagens computacionais. Atualmente, métodos de bioinformática estão sendo muito aplicados para identificar miRNAs (BEREZIKOV; CUPPEN; PLASTERK, 2006; ZHOU et al., 2009), especialmente porque alguns miRNAs têm baixa expressão e, portanto, são difíceis de serem detectados usando as técnicas experimentais disponíveis (MAGHULY; RAMKAT; LAIMER, 2014).

As abordagens computacionais podem ser divididas em três tipos: a) a abordagem baseada em algoritmos, b) a abordagem genômica comparativa baseada na conservação evolutiva e c) a predição baseada na sequência e nas características estruturais (BEREZIKOV; CUPPEN; PLASTERK, 2006). No entanto, uma abordagem integrada, que usa duas ou mais abordagens computacionais, melhoram a sensibilidade e a especificidade das predições (XIAO et al., 2009).

Usando uma abordagem baseada em algoritmos é possível identificar miRNAs no genoma de planta. Para isso, primeiramente considera-se apenas porções do genoma que tenham repetições invertidas imperfeitas, capazes de formar a estrutura *hairpin*. A estrutura secundária dessas repetições podem ser preditas usando o algoritmo RNAfold e checadas contra o MIRcheck, um algoritmo escrito para identificar regiões com o potencial de codificar para miRNAs em plantas (JONES-RHOADES; BARTEL, 2004).

O MIRcheck funciona quando são fornecidas a sequência do provável *hairpin*, a sua estrutura secundária e uma sequência dentro do *hairpin* a ser considerada como um potencial miRNA. É possível ajustar os parâmetros do MIRcheck para restringir o número total de nucleotídeos não pareados no provável miRNA (normalmente não mais que 4), dentre outros parâmetros (JONES-RHOADES; BARTEL, 2004).

No entanto, atualmente, muitas sequências de miRNAs de plantas já são conhecidas e estão depositadas em diferentes bancos de dados. Um importante banco de miRNAs de planta é o *Plant MicroRNA database* (<http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD/>).

Sequências de miRNAs tem sido identificadas em diferentes genomas, incluindo *Glycine max* (ZHANG et al., 2005), *Solanum tuberosum* (GUO et al., 2007) e *Malus domestica* (GLEAVE et al., 2008). Em *Carica papaya*, foram identificados 24 (ARYAL et al., 2012) e 75 (LIANG et al., 2013) miRNAs usando o método de sequenciamento de pequenos RNAs.

A conservação dos miRNAs no decorrer do processo evolutivo tem permitido a sua identificação em diferentes genomas usando uma abordagem genômica comparativa. Uma busca por homologia entre as sequências depositadas de miRNAs de plantas com o genoma da planta que se deseja estudar pode ser feita

usando o algoritmo PatScan. Em seguida, somando-se uma predição baseada na sequência e características estruturais dos miRNAs, o RNAfold pode ser usado para prever a estrutura secundária das sequências encontradas pelo PatScan. Para esta análise, a sequência analisada considera vários nucleotídeos (~300 nt) em cada lado do miRNA encontrado. O MIRcheck, então, é usado para avaliar se a sequência encontrada é capaz de formar o miRNA *hairpin*. Finalmente, as sequências de miRNAs maduros encontradas por homologia são, então, usadas para buscar potenciais mRNAs alvos no genoma da planta estudada, como por exemplo *Carica papaya*, usando o algoritmo psRNAtarget (Figura 5).

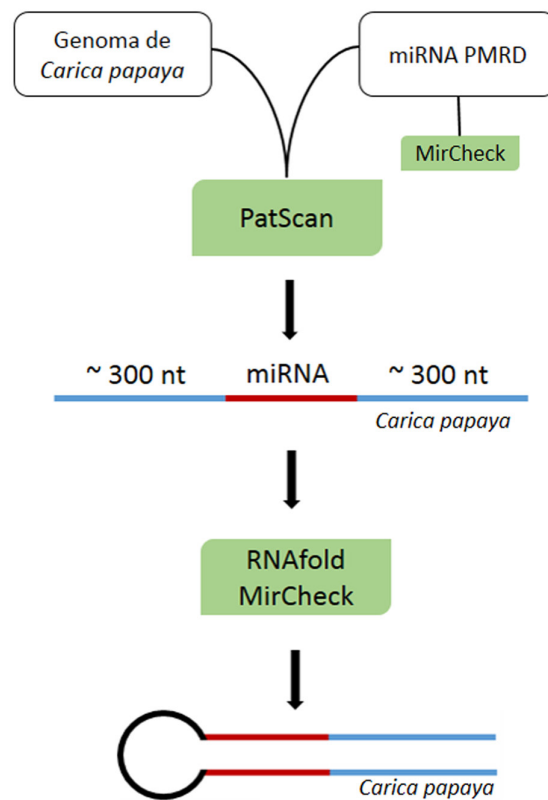


Figura 5. Esquema para busca por homologia de miRNAs no genoma de *Carica papaya*. O algoritmo PatScan é usado para buscar sequências homólogas de miRNAs comparando diferentes espécies de plantas. Em seguida, somando-se uma predição baseada na sequência e características estruturais dos miRNAs, o RNAfold pode ser usado para prever a estrutura secundária das sequências encontradas pelo PatScan. Para esta análise, a sequência analisada considera vários nucleotídeos (~300 nt) em cada lado do miRNA encontrado. O MIRcheck, então, é usado para avaliar se a sequência encontrada é capaz de formar o miRNA *hairpin*.

A alta complementaridade, dada pelo pareamento de bases, entre os miRNAs de plantas (mas não de animais) (GUO et al., 2007) e seus genes alvos (KIDNER; MARTIENSSEN, 2005) permite prever seus alvos bem como sua função dentro da planta (VAUCHERET, 2006). A função pode ser inferida usando o *Gene Ontology*

(GO), uma ferramenta de bioinformática que usa um vocabulário controlado, que pode ser aplicado a todos os eucariontes. O GO permite relacionar genes e proteínas, muitos dos quais são conservados em muitos ou em todos os organismos vivos. A função é dada baseada em três ontologias: processo biológico, função molecular e componente celular (ASHBURNER et al., 2000).

1.6. Supressores virais do silenciamento

Os vírus desenvolveram diversos mecanismos para evitar o silenciamento do RNA, principalmente expressando proteínas conhecidas como supressoras do silenciamento. Recentemente também foram identificadas proteínas supressoras em bactérias que infectam plantas, mostrando que a interferência no silenciamento é uma estratégia geral de virulência dos patógenos de plantas (PUMPLIN; VOINNET, 2013). Em geral, os supressores virais interferem em uma ou mais etapas da via de silenciamento para causar a doença.

Uma das classes de proteínas supressoras comprometem a síntese de siRNAs e miRNAs porque inibem a atividade de AGO. Esse é o caso da proteína P38 codificada por *Turnip crinkle virus* (TCV) (SCHOTT et al., 2012) (Figura 6a). A proteína P25 codificada por *Potato virus X* (PVX) promove a degradação de AGO pelo sistema proteasoma-ubiquitina (CHIU et al., 2010) (Figura 6b). Já a proteína P6 de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) interage com o cofator de DCL, impedindo a síntese de siRNAs a partir de dsRNA (HAAS et al., 2008) (Figura 6c). Algumas viroses, como *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), por exemplo, inibem a produção de dsRNA dirigida pelo hospedeiro. Uma proteína conhecida como V2 se liga à SGS3, necessária para o funcionamento da RNA polimerase, inibindo a atividade da mesma (GLICK et al., 2009) (Figura 6d). *Tobacco mosaic virus* (TMV) codifica para uma replicase cuja subunidade P126 inibe a estabilização dos siRNAs por interferir em HEN1, responsável por metilar o siRNA e mantê-lo estável na célula (VOGLER et al., 2007) (Figura 6e). A proteína P19 de tombusvirus sequestra siRNAs e/ou miRNAs prevenindo que eles se liguem a AGO, não ocorrendo portanto, o silenciamento (VARGASON et al., 2003; YE; MALININA; PATEL, 2003) (Figura 6f).

As viroses de planta, portanto, frequentemente modificam a via de pequenos RNAs de seus hospedeiros devido a ação de supressores virais do silenciamento do RNA

(CHEN et al., 2004; LEWSEY et al., 2007). Isto é, em grande parte, responsável pelo desenvolvimento dos sintomas da doença viral.

Assim, para entender a interação única entre *C. papaya* e PMeV e consequentemente os mecanismos envolvidos no aparecimento dos sintomas da meleira, decidiu-se investigar a resposta de miRNAs e discutir a interferência de supressores do silenciamento na infecção por PMeV em mamoeiros.

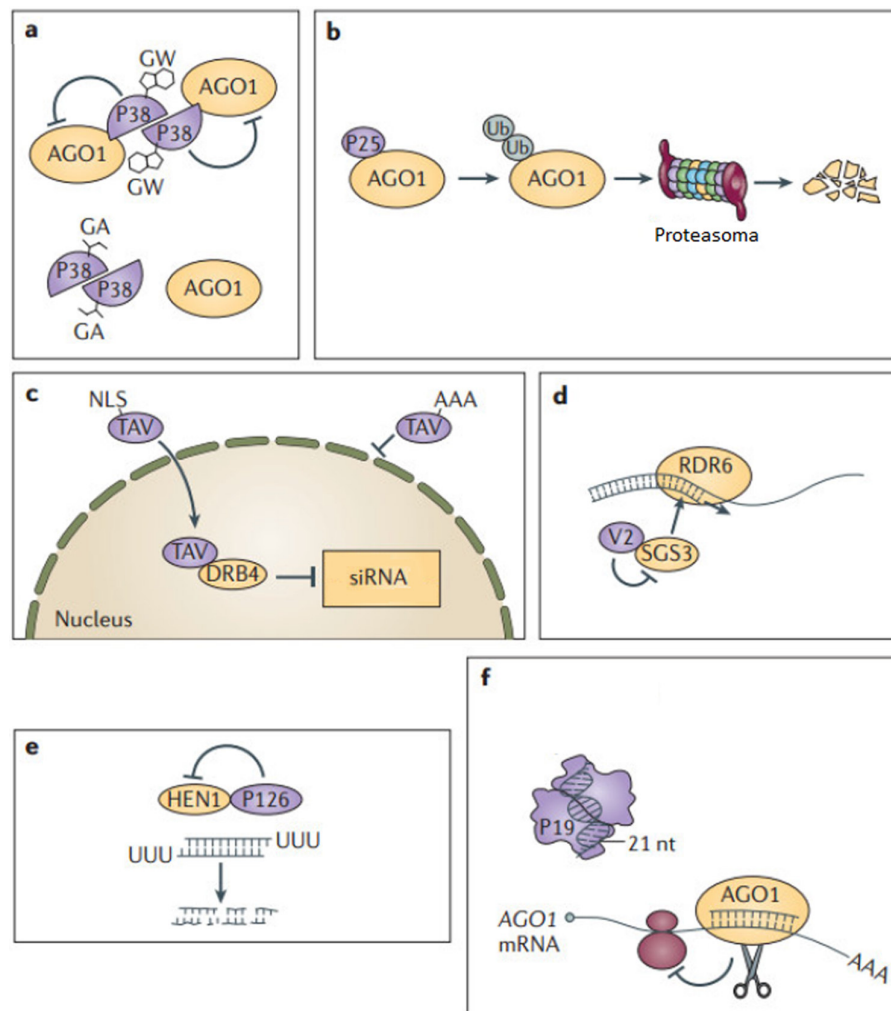


Figura 6. Exemplos de supressão do silenciamento por diferentes vírus de planta. a) A proteína P38 de *Turnip crinkle virus* se liga e inibe a proteína AGO, comprometendo a síntese de pequenos RNAs; b) A ubiquitinação da proteína AGO é induzida pela P25 de *Potato virus X* levando-a à degradação pelo proteassoma; c) A proteína de *Cauliflower mosaic virus* (P6 – TAV) interage com o cofator de DCL (DRB4) impedindo a síntese de siRNAs; d) A proteína V2 de *Tomato yellow leaf curl virus* se liga ao cofator da polimerase (SGS3) prevenindo a síntese de novos dsRNAs; e) A P126 codificada por *Tobacco mosaic virus* previne a atividade de metilase de HEN1, levando os pequenos RNAs à degradação; f) A proteína P19 de tombusvirus sequestra siRNAs e/ou miRNAs prevenindo que eles se liguem a AGO, não ocorrendo portanto, o silenciamento. Fonte: PUMPLIN E VOINET, 2013.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o envolvimento de moléculas de miRNAs na interação mamoeiro-PMeV e no desencadeamento dos sintomas da meleira do mamoeiro após o florescimento.

2.1. Específicos

- Identificar, *in silico*, sequências de potenciais miRNAs codificados por mamoeiro (*Carica papaya*);
- Identificar, *in silico*, as sequências dos mRNAs alvos dos miRNAs identificados;
- Avaliar, *in silico*, dentre os mRNAs identificados, aqueles que podem estar associados às respostas da planta contra a infecção por vírus;
- Selecionar, *in silico*, sequências de miRNAs cujos alvos sejam importantes nas respostas de defesa da planta contra vírus;
- Extrair e purificar miRNAs e mRNAs de folhas de mamoeiros sadios e com sintomas da meleira;
- Avaliar a expressão dos miRNAs selecionados e de seus mRNAs alvos em folhas de mamoeiros sadios e com sintomas da meleira;
- Discutir o envolvimento dos miRNAs na interação mamoeiro-PMeV e no desenvolvimento dos sintomas da meleira do mamoeiro.

3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

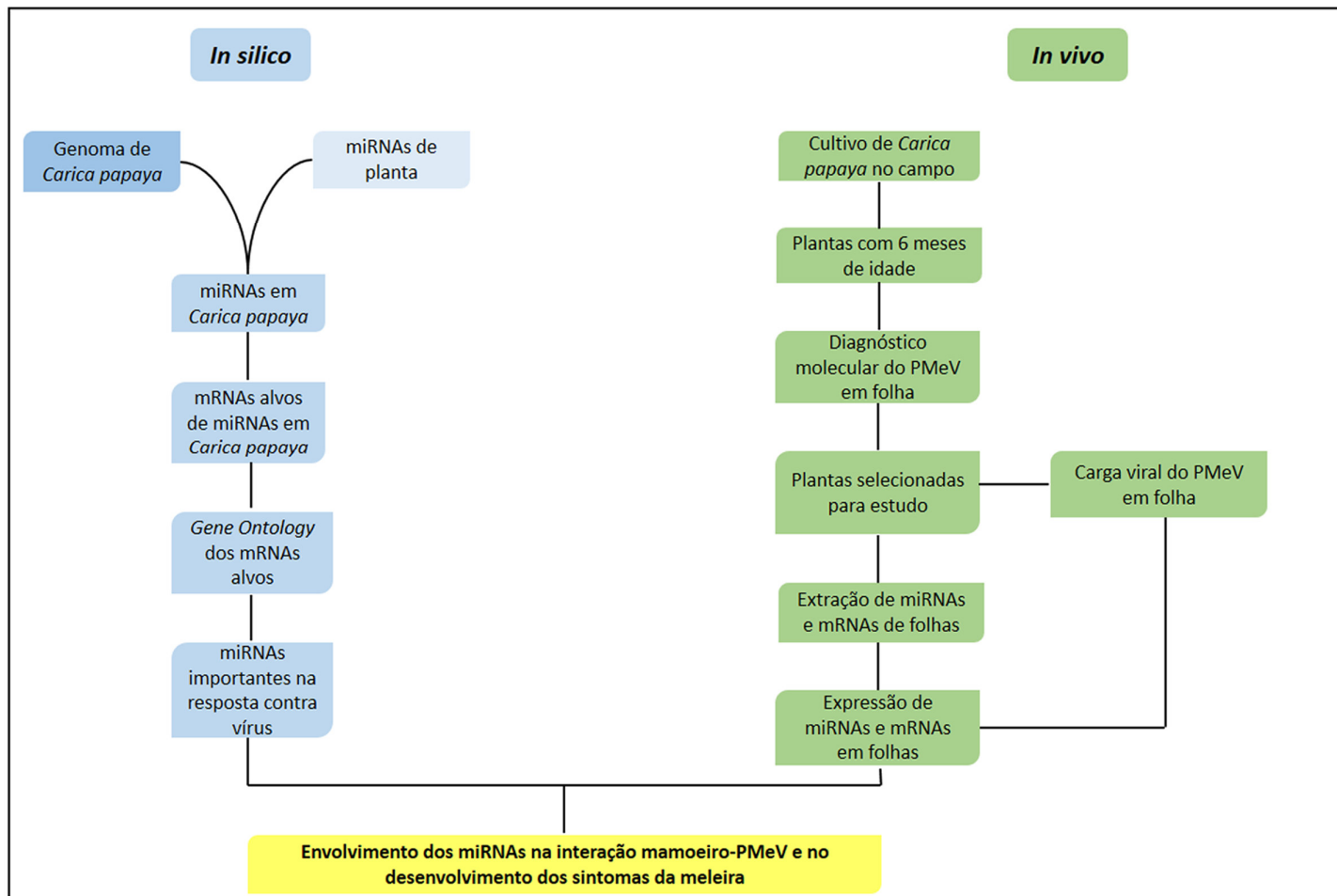


Figura 7. Estratégias para avaliar o envolvimento de miRNAs na interação mamoeiro-PMeV e no desenvolvimento dos sintomas da meleira.

4. METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. Busca *in silico* de miRNAs e de seus genes alvos em *Carica papaya*

A busca *in silico* por potenciais sequências de miRNAs bem como de seus genes alvos no genoma de mamoeiro foi feita em parceria com o grupo do Prof. Dr. Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Sequências de miRNAs maduros de plantas foram obtidas do banco de dados *Plant MicroRNA database* (<http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD/>) e usadas para predizer, por homologia, potenciais miRNAs no genoma de mamoeiro. As sequências encontradas foram avaliadas quanto à condição de formar estrutura secundária (*hairpin*).

Considerando o pareamento de bases entre o microRNA e seus genes alvos, as sequências maduras dos miRNAs foram usadas para identificar potenciais genes alvos no mamoeiro. Os genes alvos identificados foram, então, submetidos à análise de ontologia (GO), usada posteriormente para identificar miRNAs importantes na resposta da planta contra vírus.

4.2. Cultivo de plantas de *Carica papaya* no campo

Um grupo de quarenta plantas do mesmo cultivar (*Carica papaya* L., cultivar Golden) tiveram suas sementes germinadas e foram crescidas simultaneamente no campo, na fazenda experimental do INCAPER em Sooretama-ES (Figura 8).



Figura 8. Experimento de campo conduzido na fazenda experimental do INCAPER em Sooretama-ES. Um grupo de 40 plantas de *Carica papaya* L., cultivar Golden, foram cultivadas no campo. As sementes foram germinadas e as plantas foram crescidas simultaneamente.

Aos 2 meses de idade pós-plantio, dez plantas foram inoculadas com látex infectado com PMeV diluído em tampão fosfato de sódio pH 7,0 e outras dez plantas apenas com tampão fosfato de sódio pH 7,0. Amostras de folhas destas plantas, com 6 meses de idade pós-plantio (Figura 9), foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para o transporte até o laboratório. As amostras foram estocadas a -80 °C até o isolamento do RNA. Durante a coleta, a presença ou a ausência dos sintomas da meleira do mamoeiro foram anotadas.



Figura 9. Coleta de amostras de folha em plantas cultivadas no campo. A, B) Mamoeiro com 6 meses de idade pós-plantio no campo; C) Amostras de folhas jovens foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido para transporte ao laboratório, onde as análises foram realizadas.

4.3. Avaliação do acúmulo viral relativo do PMeV por qRT-PCR

A presença e o acúmulo relativo do PMeV nas amostras de folhas foi avaliada por qRT-PCR. Para a extração do dsRNA do PMeV, 100 mg de folha, de cada amostra coletada, foi submetida ao tratamento de lise celular com nitrogênio líquido. A cada amostra lisada foram adicionados 1 ml de tampão de extração composto de 1 % de CTAB, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 100 µl de uma solução 1 M de tris-HCl pH 6,8 e 1% de β- mercaptoetanol. O tampão ainda foi suplementado com 1,5% de PVP em microtubos de 1,5 ml. Procedeu-se com breve agitação e com centrifugação a 10.000 x

g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e submetido a duas extrações com 500 µl de fenol pH 4,3/clorofórmio/álcool isoamílico (24:12:1) e uma extração com 500 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) sempre mantendo as condições de agitação, centrifugação e coleta do sobrenadante já descritas. Após a última extração, o sobrenadante final foi precipitado em 600 µl de álcool absoluto gelado e 6 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,2. As amostras foram armazenadas a -20°C e, quando usadas para análise, foram centrifugadas a 10.000 x g por 50 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi descartada e o precipitado resultante foi lavado com 500 µl de etanol 70 % e centrifugado por 5 minutos. O álcool foi descartado e o precipitado foi seco ao ar por aproximadamente 20 min e depois ressuscendido em 200 µl de água DEPC (ABREU et al., 2012).

Subsequentemente, os ácidos nucleicos extraídos foram purificados usando o mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foi adicionado 250 µL de etanol 100% ao RNA extraído. Essa mistura foi aplicada na coluna de purificação e centrifugada por 15 s a 10000 x g. O filtrado foi descartado. A coluna foi lavada separadamente com duas diferentes soluções de lavagem e o RNA foi eluído em água DEPC previamente aquecida a 95 °C.

A qualidade e quantidade do RNA purificado foi determinada usando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Carlsbad, EUA). Uma alíquota de 2 µl de RNA foi submetida às leituras nos comprimentos de onda de 260 nm e varredura de 220 nm a 350 nm. Os resultados foram avaliados no programa NanoDrop® 2000.

Para síntese da fita complementar do DNA (cDNA), 600 ng de RNA foram misturados com 2 µL de iniciadores randômicos (50 µM), 1 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM) (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) e água DEPC para um volume final de 12 µL. As amostras foram incubadas a 96 °C por 3 min, e o cDNA foi sintetizado usando o Super Script III kit (Invitrogen, Carlsbad, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, cada amostra recebeu 4 µL de SuperScript 5× buffer, 2 µL de DTT (0.1 M), 0.1 µL de RNaseOUT (40 U µL⁻¹), 1.3 µL de água DEPC e 0.6 µL de 5× Super Script III (200 U µL⁻¹) em um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas por 10 min a 25 °C, 50 min a 50 °C e 5 min a 85 °C.

A presença e expressão do PMeV nas amostras coletadas foram avaliadas por qRT-PCR no equipamento 7500 Fast Real-time PCR (Life Technologies, Carlsbad, EUA) usando os iniciadores PMeVreal, cujas sequências são 5' GTG GGT TTC CTG GAG CTA AA 3' (*Forward*) e 5' TAA GGC TCC CCT TTT GTT CA 3' (*Reverse*) (ABREU et al., 2012). Dez microlitros (10 μ L) de SYBR Green PCR Kit Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) e 1 μ L de uma solução a 10 μ M de cada iniciador foram adicionados ao cDNA (3.5 μ l). Essa mistura foi incubada a 95 $^{\circ}$ C por 10 min seguida por 40 ciclos a 95 $^{\circ}$ C por 15 s e 60 $^{\circ}$ C por 1 min. Uma curva, conhecida como curva de melt, a 95 $^{\circ}$ C por 15 s, 60 $^{\circ}$ C por 1 min e 95 $^{\circ}$ C por 15 s foi produzida e os dados foram analisados usando o SDS Software System (7500 version 2.0.1, Applied Biosystems, Carlsbad, EUA).

A expressão relativa de vírus nas amostras foi estimada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este é um conveniente método usado para analisar a expressão gênica relativa em diferentes amostras. Ele requer que sejam usados um ou mais genes de referência, que são uniformemente e constantemente expressos em todas as amostras analisadas, incluindo na amostra de referência. A expressão gênica das amostras é, então, comparada com a expressão da amostra de referência.

Para esta análise, o gene para ciclofilina (CYP, do inglês *cyclophilin*) foi usado como gene de referência. Sabe-se que CYP, S-adenosil metionina descarboxilase (SAMDC, do inglês *S-adenosyl methionine decarboxylase*) e Fator de iniciação 4A (EIF, do inglês *eukaryotic initiation factor 4A*) estão entre os genes mais estáveis quando o mamoeiro está sob estresse biótico (ZHU et al., 2012). Cada um desses genes, então, foi avaliado, usando o algoritmo geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), como possível gene de referência para avaliar amostras de mamoeiros sadios e infectados com PMeV (Figura 10, Anexo 1). Seguindo a comparação, o gene para CYP foi o que apresentou o menor valor de geNorm M, sendo, portanto, escolhido para normalização. Cada amostra foi analisada em triplicata.

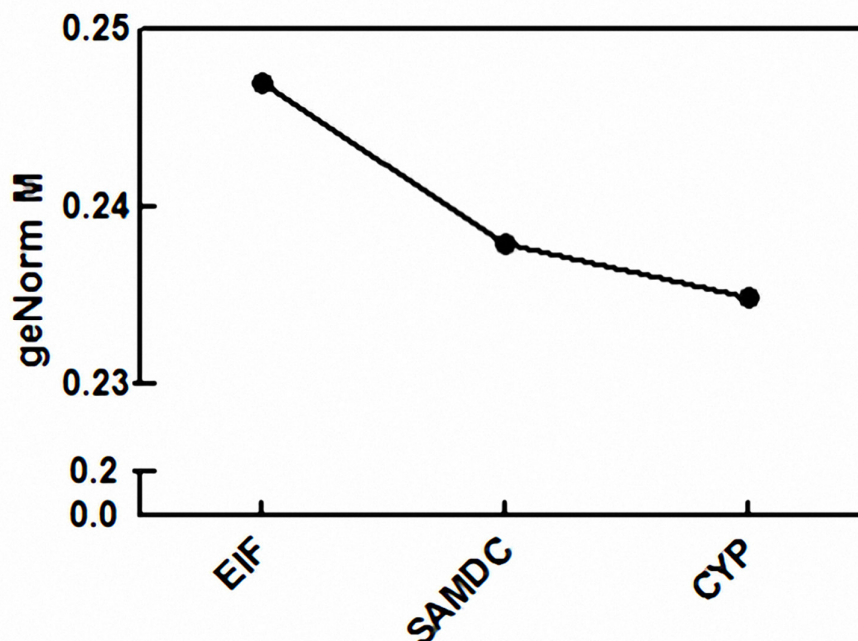


Figura 10. Estabilidade dos genes de referência em mamoeiros infectados com PMeV. Três genes foram testados como possíveis genes de referência para mamoeiro: Ciclofilina (CYP), S-adenosil metionina descarboxilase (SAMDC) e Fator de iniciação 4A (EIF). Destes, o gene para ciclofilina foi o mais estável em plantas saudas e infectadas com PMeV. A estabilidade da expressão foi avaliada pelo geNorm.

4.4. Extração e purificação de miRNAs e RNAs

Cem miligramas (100 mg) de tecido de folha foram trituradas em nitrogênio líquido para extração e purificação tanto de pequenos RNAs (menores que 200 nt) quanto de RNAs maiores que 200 nucleotídeos usando o *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, a extração passou pelos processos de lise celular com tampão específico, de extração orgânica com fenol/clorofórmio seguidos do isolamento de pequenos e grandes RNAs, nessa ordem, com auxílio de colunas específicas de purificação.

O isolamento de pequenos RNAs é inicialmente acompanhado pela imobilização de grandes RNAs na coluna, quando é adicionado uma baixa concentração de etanol, permitindo a coleta, portanto, dos pequenos RNAs. Posteriormente, mais etanol é adicionado à solução com pequenos RNAs, que passa por uma segunda coluna onde agora os pequenos RNAs ficam imobilizados.

As colunas com os pequenos e grandes RNAs imobilizados são lavadas inicialmente com 700 µL de “solução de lavagem” e centrifugadas a 10000 x g por 10 seg. Proceder-

se com mais duas etapas de lavagem dos RNAs com 500 μL da mesma solução. Finalmente, as amostras de cada um desses grupos de RNAs são, então, eluídas separadamente com 100 μL de água DEPC.

A determinação da concentração e a relação de pureza dos RNAs extraídos foram realizadas no espectrofotômetro NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Carlsbad, EUA). Uma alíquota de 2 μl de RNA foi submetida às leituras nos comprimentos de onda de 260 nm e varredura de 220 nm a 350 nm. Os resultados foram avaliados no programa NanoDrop® 2000.

4.5. Síntese da fita complementar do DNA (cDNA)

A síntese do cDNA foi feita usando o TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies, Carlsbad, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, foram preparadas duas diferentes misturas de reação (15 μL cada) para pequenos (menores que 200 nt) ou grandes RNAs (maiores que 200 nt).

Para a síntese de cDNA a partir dos pequenos RNAs, a mistura continha 10 ng de pequenos RNAs, 3 μL de TaqMan Small RNA Assay RT-primers e 1 μL de Multiscribe reverse transcriptase. Já para sintetizar cDNA a partir de RNAs maiores, a mistura foi feita da mesma maneira, mas com 3 μL de iniciadores randômicos (125 ng/ μL). Ambas, foram incubadas a 16 °C por 30 min, seguida por incubações a 42 °C por 30 min e 85 °C por 5 min.

4.6. Análise quantitativa dos miRNAs e de seus genes alvos por qRT-PCR

A reação de qRT-PCR foi realizada no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, EUA).

Para análise dos miRNAs foi usado o TaqMan Small RNA Assay kit (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A reação consistiu de 1,33 μL de produto da síntese do cDNA, 10 μl de TaqMan Universal PCR Master Mix II (2X), 1 μl de iniciadores (TaqMan Small RNA Assay) e água DEPC para 20 μl . Por outro lado, os genes alvos de alguns miRNAs foram selecionados e, posteriormente, avaliados usando SYBR Green (Life Technologies, Carlsbad, EUA) com dois iniciadores específicos.

A sequência de cada um desses iniciadores foi desenhada usando o programa Primer Express (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Essa reação consistiu de 1,33 µL de produto da síntese do cDNA, 10 µl de Sybr Green PCR Master Mix, 1 µl de cada iniciador, *forward* e *reverse*, a 10 µM e água DEPC para 20 µl.

Para ambas as análises, as amostras foram incubadas a 50 °C por 20 s e 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s. A análise da curva de melt para a reação com Sybr green foi avaliada após incubação a 95 °C por 15 s, 60 °C por 60 s e 95 °C por 15 s.

A curva de amplificação foi plotada e o gene para ciclofilina foi usado para normalização. Cada miRNA e cada gene alvo foi analisado em duplicata. A expressão relativa de cada miRNA ou gene alvo em plantas saudias e infectadas foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A expressão de miRNA/mRNA na planta em que o vírus não foi detectado (controle) foi definida como 1,0 e a expressão de miRNA/mRNA das demais plantas foi ajustada relativamente a este valor. Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância ANOVA e pelo teste de Tukey (P <0,05).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação *in silico* de miRNAs e de seus genes alvos em *Carica papaya*

Recentemente, 24 (ARYAL et al., 2012) e 75 (LIANG et al., 2013) miRNAs foram sequenciados a partir do genoma de *C. papaya*. Diferentemente, neste trabalho foram usadas várias abordagens de bioinformática para encontrar miRNAs conservados no genoma de mamoeiro.

As abordagens de bioinformática usadas para buscar miRNAs conservados e seus alvos no genoma de mamoeiro foram realizadas em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, sob coordenação do Prof. Dr. Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira.

Foram preditas no genoma de *C. papaya* 462 sequências de miRNAs maduros em 537 sequências de precursores de miRNA (Figura 11). Uma lista com as sequências dos precursores de miRNA está disponível em <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103401#s5> – Table S2).

Estes miRNAs foram classificados em 72 diferentes famílias de miRNAs. Baseado no pareamento de bases entre o miRNA e seus alvos, 439 miRNAs tiveram genes alvos identificados (Figura 11). Uma lista com as sequências dos miRNAs e com a descrição de seus respectivos alvos está disponível em <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103401#s5> – Table S3).

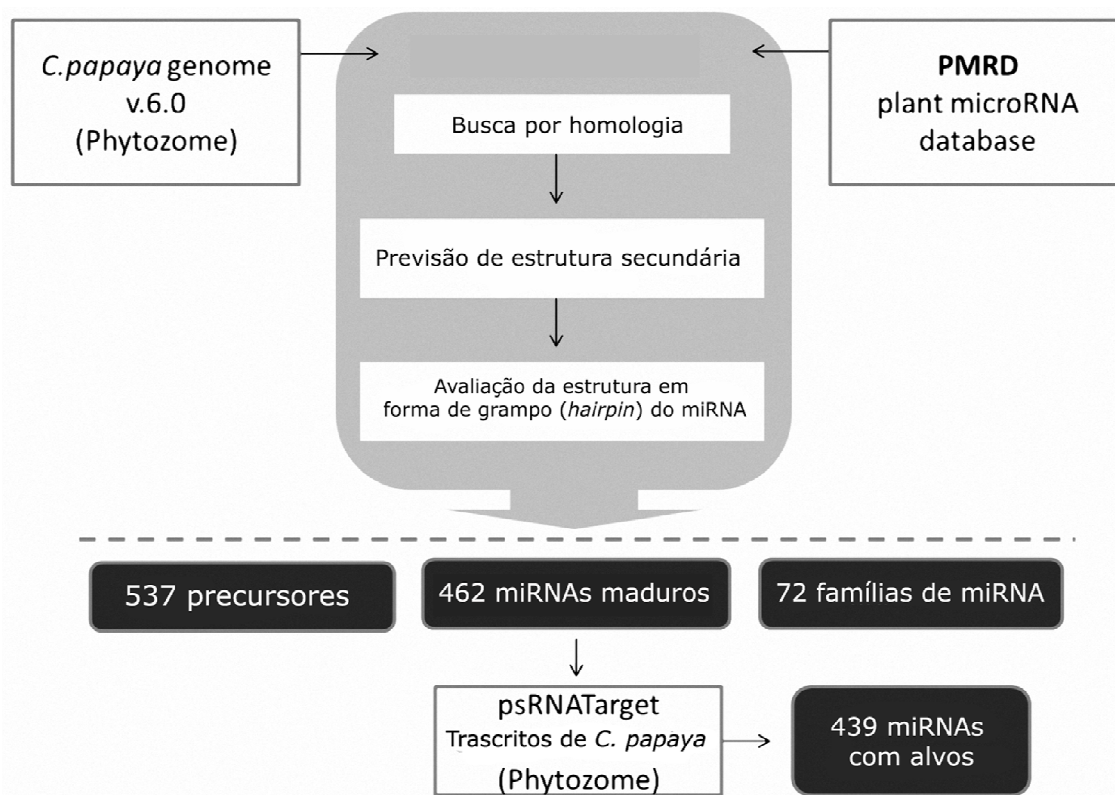


Figura 11. Procedimento para busca de microRNAs e de seus alvos no genoma de *Carica papaya*. Fluxograma dos principais passos para a predição de estruturas secundárias de miRNAs conhecidos e seus alvos no genoma de *C. papaya*. Parte do fluxograma representa o MirCheck.

As sequências de nucleotídeos dos genes alvos estudados em *C. papaya* foram encontradas a partir da: 1) Obtenção, a partir do banco de dados Uniref100, da sequência de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes alvos de determinado miRNA (Lista com a descrição dos alvos disponível em <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103401#s5> - Table S3); 2) Obtenção da sequência de aminoácidos destas proteínas em *C. papaya* no banco de dados do Phytozome (http://www.phytozome.net/search.php?show=blast&method=Org_Cpapaya), usando o programa BLASTP; 3) Obtenção da sequência de nucleotídeos destes genes (Figura 12). Essas sequências, então, foram usadas como alvo para desenhar iniciadores específicos para cada gene, listados na Tabela 1.

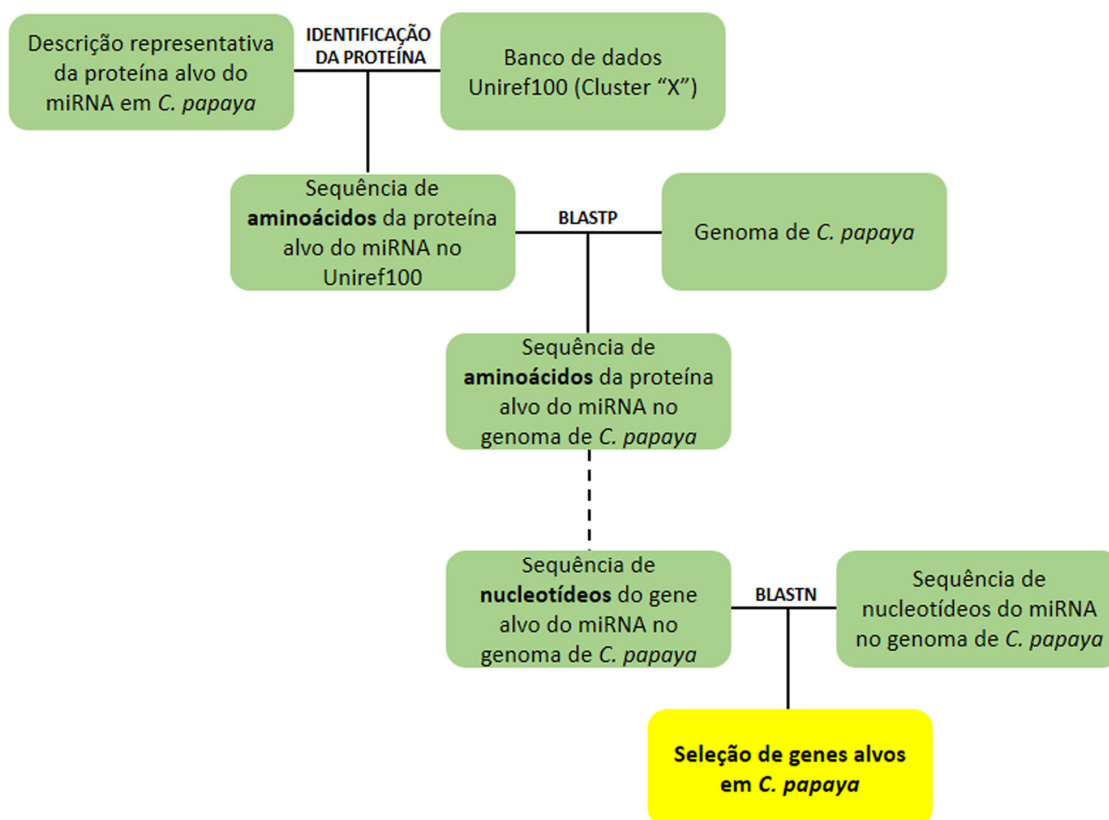


Figura 12. Seleção de genes alvos de miRNAs em *C. papaya*.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores para análise da expressão dos genes alvos por qRT-PCR.

Gene alvo	Iniciador <i>forward</i>	Iniciador <i>reverse</i>
HIRP	ACTGTTTGCCTTGGTGTGTTGG	ACTGTTGCACACGTAACGAGAGA
CAP	AGGCGTATCCGCAAGTGAGT	TCCTCTAAGCTTCCTCTTACATTTCTC
NPK1	GATCATTCACGCGCAAAT	GAGCTAACCCGTTTGAATGAAGA

A seleção desses genes alvos em *C. papaya* foi feita após avaliar a complementaridade entre cada sequência de miRNA estudado com seus respectivos alvos, usando o programa BLASTN (Figura 12).

Setenta e cinco miRNAs de *C. papaya* foram sequenciados por Liang e colaboradores (2013). Dentre estes, 66 foram preditos nesta análise *in silico*, incluindo todos os 11 miRNAs estudados neste trabalho.

Os miRNAs transcritos em plantas regulam a expressão de diversos genes, muitos dos quais são fatores de transcrição que, por sua vez, regulam vários outros genes

(IVASHUTA et al., 2011; MENG; SHAO; CHEN, 2011). Isso mostra, portanto, que os miRNAs têm um importante papel nas redes de regulação gênica nas plantas (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006)

Dentre os diferentes genes alvos dos miRNAs encontrados no genoma de mamoeiro, alguns estão envolvidos na regulação de processos metabólicos e transcricionais, atestando, portanto, a qualidade dos resultados da busca *in silico* (Figura 13).

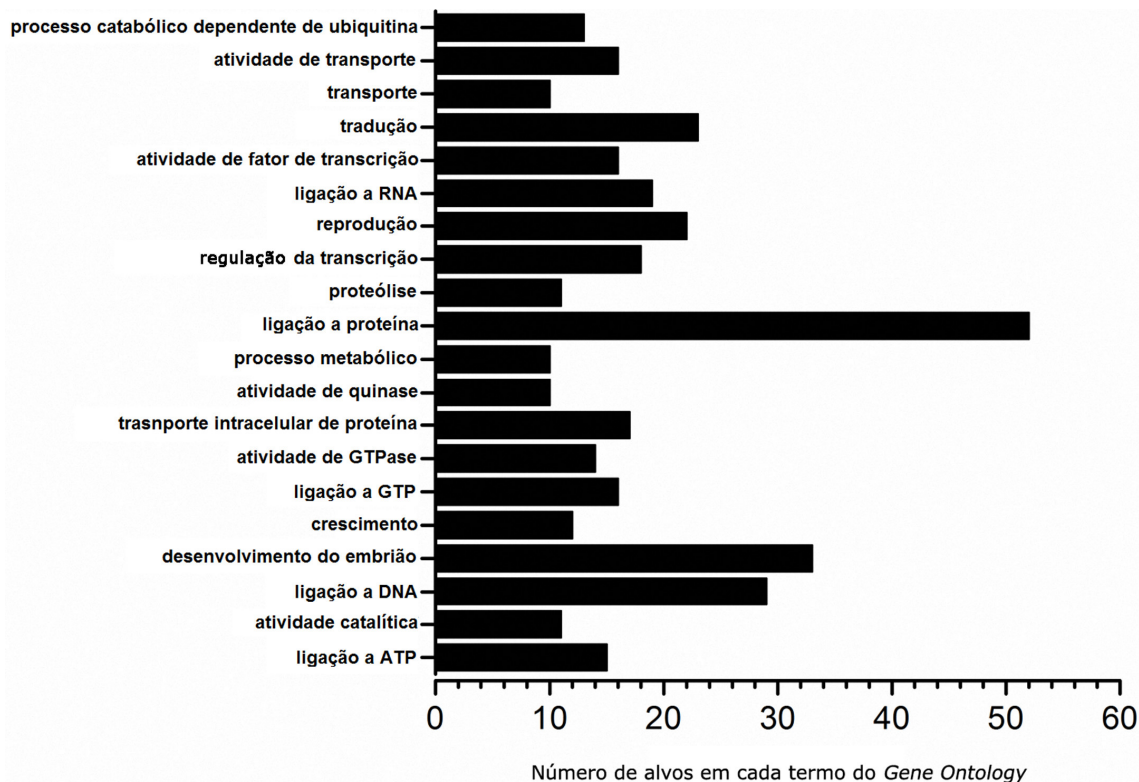


Figura 13. Termos do Gene Ontology (GO) relacionados aos alvos dos miRNAs em *Carica papaya*. As barras indicam o número de GOs anotados como únicos em *C. papaya*.

Além disso, dentre os alvos que não são fatores de transcrição em plantas, muitos codificam para proteínas relacionadas à ubiquitinação, mostrando o papel dos miRNAs na regulação da estabilidade das proteínas na célula (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006).

Alguns dos alvos encontrados em mamoeiro estão envolvidos no processo de degradação proteolítica via proteasoma-ubiquitina (Figura 13, Lista com a descrição dos alvos disponível em <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103401#s5> – Table S3). Várias evidências indicam que as plantas usam esse processo durante a resposta

imune contra a invasão de patógenos, enfatizando, portanto, o papel desta via durante as interações planta-patógeno.

Os resultados apresentados aqui mostram que miRNAs de *C. papaya*, assim como os miRNAs encontrados em plantas em geral, têm o potencial de regular alvos envolvidos em diferentes funções biológicas, estando inclusive envolvidos na regulação da defesa contra patógenos (JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006).

5.2. Diagnóstico molecular do PMeV nas plantas selecionadas para estudo

Após determinar a expressão relativa (RQ, do inglês *relative quantification*) de PMeV, as seguintes amostras foram selecionadas para as análises relacionadas aos miRNAs: 1 – Planta sem vírus e sem sintomas de meleira (controle); 2 – Planta com baixo acúmulo relativo viral ($\text{Log}_{10}\text{RQ} \sim 1.4$) e sem sintomas de meleira; 3 – Planta com alto acúmulo relativo viral ($\text{Log}_{10}\text{RQ} \sim 4$) e com sintomas de meleira; e 4 – Planta com altíssimo acúmulo relativo viral ($\text{Log}_{10}\text{RQ} \sim 5.5$) e com sintomas de meleira (Figura 14).

Os resultados do qRT-PCR, portanto, mostraram uma grande diferença no acúmulo relativo de PMeV entre as plantas usadas neste estudo. Os diferentes acúmulos virais em mamoeiros assintomáticos e sintomáticos para a meleira foram consideradas como representativas do progresso da infecção viral.

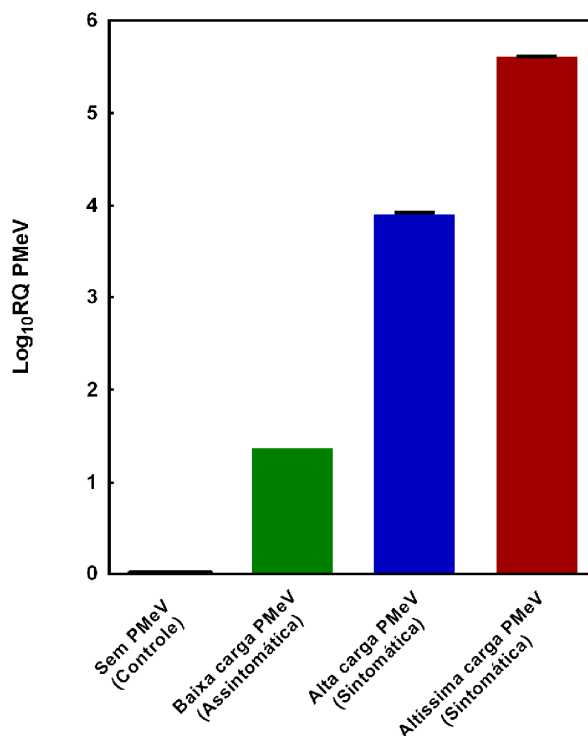


Figura 14. Quantificação relativa do acúmulo de PMeV em folhas de mamoeiros sadios e com sintomas da meleira. Quantificação relativa de PMeV por qRT-PCR. A curva de amplificação foi avaliada, e o gene que codifica para ciclofilina foi usado para normalização. A expressão de PMeV normalizada na amostra controle foi determinada como 1,0 e os acúmulos virais das demais amostras foram calculadas relativamente a este valor. Estas foram as quatro amostras selecionadas para estudo: 1 – Sem PMeV e sem sintomas de meleira (controle negativo); 2 – Baixo acúmulo viral e sem sintomas de meleira; 3 – Alto acúmulo viral e com sintomas de meleira; 4 – Altíssima acúmulo viral e com sintomas de meleira.

5.3. Identificação *in silico* de miRNAs que regulam importantes vias de defesa contra patógenos

Vários miRNAs e seus respectivos genes alvos foram identificados no genoma de mamoeiro. Dentre estes, alguns foram selecionados para o estudo da interação mamoeiro-PMeV e do desencadeamento dos sintomas da meleira porque seus alvos participam de importantes vias de defesa contra patógenos.

Para avaliar a resposta de miRNAs à infecção por PMeV, da lista de miRNAs e seus alvos, onze microRNAs, cujos alvos codificam para proteínas envolvidas no controle da degradação proteasomal e em outras vias de resposta a estresse, foram estudados em plantas assintomáticas e com sintomas visíveis da meleira.

As seqüências de nucleotídeos de todos esses miRNAs são as mesmas usadas em ensaios TaqMan para análise de miRNAs em outras plantas (TaqMan® MicroRNA Assays da Life Technologies, Carlsbad, EUA) (Tabela 2). Por isso, esses ensaios foram usados para análise dos miRNAs em mamoeiro.

Tabela 2. Sequências disponíveis comercialmente para análise de miRNAs em plantas. Estas sequências foram usadas para análise de miRNAs em *Carica papaya*.

Nome do ensaio TaqMan para miRNA	Sequência do miRNA	Organismo
ath-miR162a	UCGAUAAACCUCUGCAUCCAG	<i>Arabidopsis thaliana</i>
osa-miR408	CUGCACUGCCUCUUCCCUGGC	<i>Oryza sativa</i>
ath-miR156a	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	<i>Arabidopsis thaliana</i>
aqc-miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	<i>Aquilegia caerulea</i>
ath-miR164a	UGGAGAAGCAGGGCAGUGCA	<i>Arabidopsis thaliana</i>
vvi-miR166a	UCGGACCAGGCUUCAUUC	<i>Vitis vinífera</i>
aly-miR172c#	GGAGCAUCAUCAAGAUUCACA	<i>Arabidopsis lyrata</i>
ath-miR390a	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ath-miR396a	UCCACAGCUUUCUUGAACUG	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ath-miR396b	UCCACAGCUUUCUUGAACUU	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ath-miR397a	UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ath-miR399f	UGCCAAAGGAGAUUUGCCCGG	<i>Arabidopsis thaliana</i>

O sistema UPS tem um importante papel nas interações planta-vírus. Em mamoeiros, a expressão proteica das subunidades 20S e 26S do proteasoma é maior durante a infecção por PMeV (RODRIGUES et al., 2011). Considerando que os vírus podem manipular a via dos miRNAs do hospedeiro em seu próprio benefício (CHAPMAN et al., 2004; KASSCHAU et al., 2003; WANG et al., 2012), decidiu-se investigar a expressão de determinados miRNAs cujos alvos estão envolvidos na via de degradação via proteasoma e em outras vias de resposta a estresse. Esta análise foi conduzida em amostras de folha de mamoeiros com diferentes acúmulos relativos de PMeV, assintomáticas e sintomáticas para a meleira, representando diferentes estágios da infecção viral.

Quatro miRNAs foram identificados com genes alvos tendo papel na via do sistema UPS, miR156, miR162, miR398 e miR408 (Figura 15). A análise *in silico* indicou que os genes alvos desses miRNAs codificam para proteína de degradação da ubiquitina (miR156), poliubiquitina (miR162), subunidade beta do proteasoma (miR398) e subunidade alfa do proteasoma (miR408) (Tabela 3, Lista com a descrição dos alvos disponível em

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103401#s5> – Table S3).

Outros sete miRNAs, 164, 172, 390, 396, 397, 399 e miRNA 166, cujos alvos codificam para proteínas envolvidas em importantes vias de resposta a estresse, também foram estudados em mamoeiros infectados com PMeV. A análise *in silico* indicou que os alvos desses miRNAs são, dentre outros, genes que codificam para cistatina (CYS, do inglês *cystatin*), proteína quinase NPK-1 (NPK1), proteína de resposta induzida por hipersensibilidade (HIRP, do inglês *hypersensitive-induced response protein*), proteína de ligação a GTP (GBP, do inglês *GTP-binding protein*), ascorbato peroxidase citosólica (CAP, do inglês *cytosolic ascorbate peroxidase*), difenol oxidase (DO) e extensina (EXT) (Tabela 3, Lista com a descrição dos alvos disponível em <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103401#s5> – Table S3).

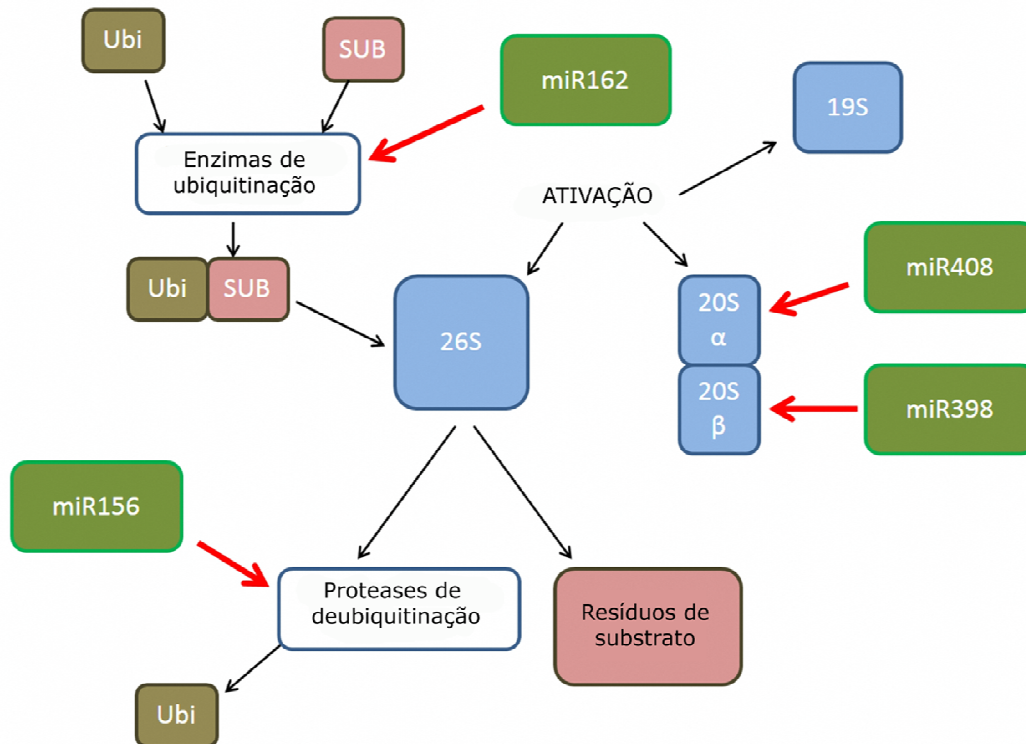


Figura 15. Relacionamento dos miRNAs e a degradação proteasomal. Um esquema mostrando o relacionamento dos miRNAs 156, 398, 408 e 162 com a degradação proteasomal. As setas vermelhas indicam os genes alvos dos miRNAs. A degradação proteasoma-ubiquitina envolve a ligação da ubiquitina (Ubi) ao substrato (SUB). Proteínas poliubiquitiniladas são reconhecidas e degradadas pelo proteasoma 26S, que consiste da porção regulatória 19S, que reconhece, seleciona e se liga às proteínas poliubiquitiniladas, clivam esta cadeia e encaminha o polipeptídeo para a porção 20S, onde ocorre a degradação proteolítica.

As sequências de cada um desses miRNAs escolhidos para estudo são idênticas àquelas de outras plantas e estão disponíveis comercialmente como diferentes TaqMan® MicroRNA Assays (Life Technologies, Carlsbad, EUA) (Tabela 2).

Tabela 3. Genes alvos dos miRNAs identificados em *Carica papaya* e usados para estudo da interação mamoeiro-PMeV.

miRNA	Fragmento de alinhamento ao miRNA	Fragmento de alinhamento ao alvo	Inibição	Alvo	Alvo <i>Carica papaya</i> (Phytosome)
miR156/miR157	UGACAGAAGAGAGUGAGCA	UGCUCGCUCUCGUCUGUUU	Clivagem	homologue to UniRef100_Q307X2 Cluster: Ubiquitin fusion-degradation protein-like; n=1; Solanum tuberosum Rep: Ubiquitin fusion-degradation protein-like - Solanum tuberosum (Potato), partial (63%)	evm.model.supercontig_150.14
miR162	UCGAUAAACCUCUGCAUCC	GGAUGCAGAUUUUUGUCGA	Tradução	UniRef100_A1X1E5 Cluster: Polyubiquitin; n=1; Thlaspi caerulescens Rep: Polyubiquitin - Thlaspi caerulescens (Alpine penny-cress) (Thlaspi calaminare), partial (33%)	evm.TU.contig_27582.1
miR398	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	CCGAGGAGACCUGAGAACAUA	Clivagem	homologue to UniRef100_A2Q2I3 Cluster: Proteasome subunit beta type; n=1; Medicago truncatula Rep: Proteasome subunit beta type - Medicago truncatula (Barrel medic), partial (30%)	evm.model.supercontig_130.66
miR408	CUGCACUGCCUCUJCCCUGG	CAAGGGAGGAGGCGGUUCAG	Clivagem	homologue to UniRef100_A5BSR0 Cluster: Proteasome subunit alpha type; n=1; Vitis vinifera Rep: Proteasome subunit alpha type - Vitis vinifera (Grape), partial (90%)	evm.model.supercontig_8.261
miR164	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA	UAUAUGUCUCUUGCUUCUCCA	Clivagem	similar to UniRef100_P25973 Cluster: Cystatin; n=1; Glycine max Rep: Cystatin - Glycine max (Soybean), partial (27%)	evm.model.supercontig_34.199

miR165/miR166	UCGGACCAGGCUUCAUUC	GAAUUGGAGCCUGGUUUGA	Clivagem	weakly similar to UniRef100_Q9FLQ2 Cluster: Similarity to NPK1-related protein kinase; n=1; Arabidopsis thaliana Rep: Similarity to NPK1-related protein kinase - Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress), partial (38%)	evm.model.supercontig_2253.1
miR172*	GGAGCAUCAUCAAGAUUCACA	UGGGAAGUUUGAUGAUGUUCU	Clivagem	homologue to UniRef100_Q6UNT3 Cluster: Hypersensitive-induced response protein; n=1; Cucumis sativus Rep: Hypersensitive-induced response protein - Cucumis sativus (Cucumber), partial (93%)	evm.model.supercontig_5.273
miR390	AAACUCAGGAUAGAUAGC	UCUGUCUAUGUUGAGUUU	Tradução	homologue to UniRef100_P54766 Cluster: GTP-binding nuclear protein Ran1B; n=1; Lotus japonicus Rep: GTP-binding nuclear protein Ran1B - Lotus japonicus, partial (36%)	evm.model.supercontig_427.2
miR396	UCCACAGCUUUCUUGAACUG	CAGAUCAAGAAAGCUGAGGGA	Clivagem	homologue to UniRef100_Q6UNT3 Cluster: Hypersensitive-induced response protein; n=1; Cucumis sativus Rep: Hypersensitive-induced response protein - Cucumis sativus (Cucumber), partial (39%)	evm.model.supercontig_5.273
miR396	UCCACAGCUUUCUUGAACUU	GAGUACCAGAAGGCUGUGGAG	Clivagem	homologue to UniRef100_A7KIX5 Cluster: Cytosolic ascorbate peroxidase	evm.TU.contig_30593.1

				1; n=1; Gossypium hirsutum Rep: Cytosolic ascorbate peroxidase 1 - Gossypium hirsutum (Upland cotton) (Gossypium mexicanum), partial (57%)	
miR397	UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG	CAUCAAUGCUGCACUCAAUGA	Clivagem	similar to UniRef100_P93366 Cluster: Diphenol oxidase; n=1; Nicotiana tabacum Rep: Diphenol oxidase - Nicotiana tabacum (Common tobacco), partial (51%)	evm.model.supercontig_84.5
miR399	UGCCAAAGGAGAUUUGCCCGG	UCUGGUUAAUCUCCUUCGGCA	Clivagem	homologue to UniRef100_Q39599 Cluster: Extensin; n=1; Catharanthus roseus Rep: Extensin - Catharanthus roseus (Rosy periwinkle) (Madagascar periwinkle), partial (32%)	

5.4. Expressão dos miRNAs envolvidos na degradação proteasomal

Os miRNAs foram isolados de folha de mamoeiro e a expressão de um grupo selecionado de miRNAs envolvidos na regulação da via proteasoma-ubiquitina foram avaliadas por qRT-PCR. A Figura 16 mostra a expressão relativa de miR156, miR398, miR162, e miR408. A expressão de cada miRNA foi quantificada em relação à expressão do respectivo miRNA na planta sem vírus (grupo 1 – controle), cuja expressão foi determinada como 1,0.

O padrão de expressão em relação ao acúmulo relativo de PMeV variou entre os miRNAs. Três dos quatro miRNAs estudados envolvidos na degradação proteasomal, 162, 398 e 408, aumentaram em resposta a um baixo acúmulo viral (grupo 2, sem sintomas), especialmente miR398 (Figura 16, Anexo 2).

No grupo com alto acúmulo relativo viral (grupo 3, com sintomas de meleira), a expressão dos miRNAs 162, 398 e 408 foi consideravelmente reduzida e a expressão de miR162 foi significativamente menor que em plantas não infectadas (Figura 16). Sob altíssimo acúmulo relativo viral (grupo 4, com sintomas de meleira) a expressão dos miRNAs 162 e 408 não apresentou diferença comparada com o grupo controle. Não houve diferença significativa na expressão de miR398 e miR408 entre plantas com alto e altíssimo acúmulo relativo viral, mas a expressão de miR162 aumentou (Figura 16).

O sistema UPS participa eficientemente no processo de infecção da planta como um mecanismo de defesa contra patógenos, incluindo viroses (CITOVSKY et al., 2009; DIELEN et al., 2010). Basicamente, as células precisam remover proteínas indesejadas. Estas proteínas são marcadas com uma cadeia polimérica de ubiquitina, são reconhecidas e se tornam alvo da degradação proteolítica via proteasoma (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN, 2012; DIELEN et al., 2010). Nesse contexto, as plantas podem inibir o progresso da infecção viral pela degradação de proteínas virais que são importantes para a infecção. Por exemplo, a replicase (RNA polimerase dependente de RNA, RdRp) de *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) é alvo do sistema UPS em plantas infectadas, o que afeta a eficiência da replicação viral (CAMBORDE et al., 2010).

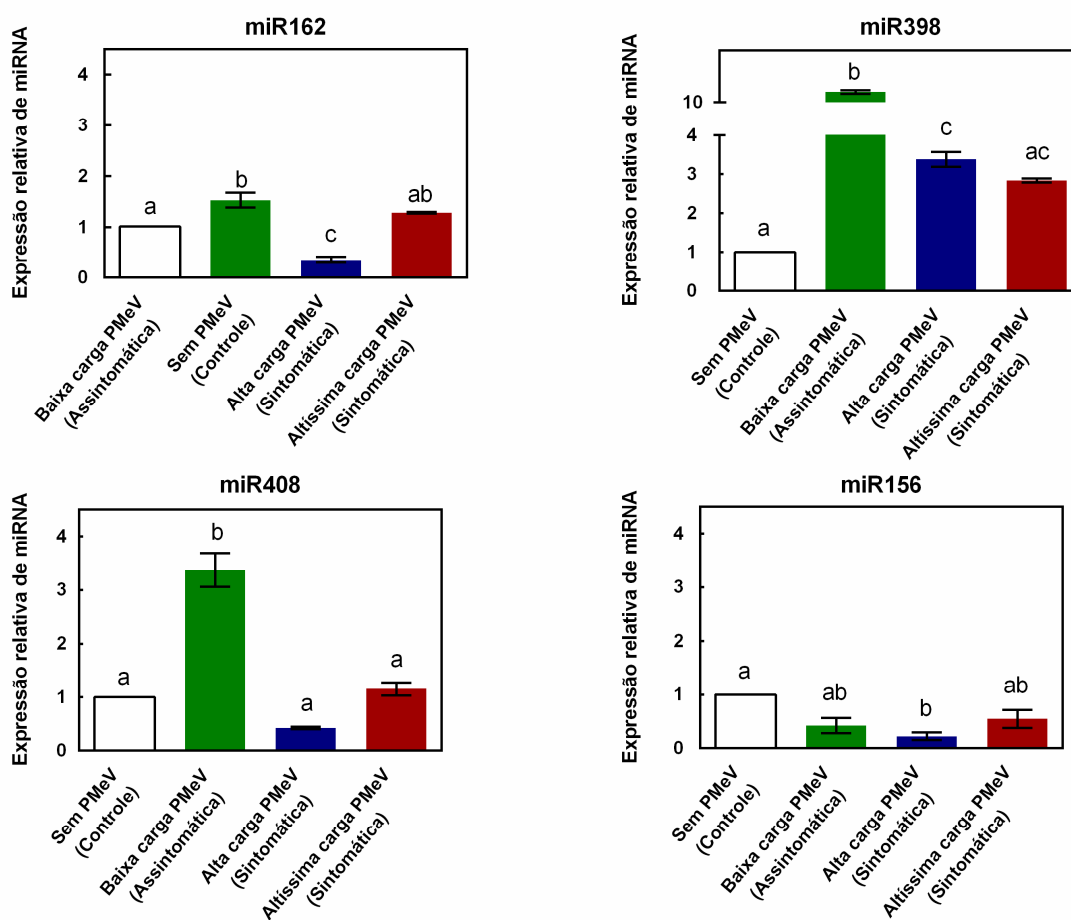


Figura 16. Quantificação relativa de miRNAs relacionados ao sistema UPS em folhas de mamoeiros sadios e com sintomas da meleira. MiRNAs foram isolados de folhas e o acúmulo de um grupo de miRNAs associados com a via de degradação proteasoma-ubiquitina foi avaliado por qRT-PCR usando o kit TaqMan Small RNA Assay (Life Technologies). Foram comparadas quatro amostras: i) Sem PMSV; ii) Baixo acúmulo relativo de PMSV; iii) Alto acúmulo relativo de PMSV e iv) Altíssimo acúmulo relativo de PMSV. Os níveis de miRNAs foram normalizadas com o mRNA que codifica para ciclofilina. A expressão de miRNA normalizada na amostra controle foi determinada como 1,0 e a expressão dos miRNAs foi calculada relativamente a este valor.

O PMeV, portanto, altera o acúmulo de miRNAs envolvidos na modulação de genes relacionados ao sistema UPS. Houve um marcante acúmulo de miR162, miR398 e miR408 em plantas com baixo acúmulo relativo viral e sem sintomas (grupo 2), enquanto o acúmulo desses miRNAs em plantas com sintomas da meleira (grupos 3 e 4) foi menor.

O aumento inicial na expressão de miRNAs envolvidos no sistema UPS, provavelmente reduzindo a resposta UPS, a princípio parece ir contra o interesse da planta já que proteínas virais deixariam de ser alvo da degradação proteolítica. Entretanto, trabalhos prévios indicam que a supressão da maquinaria de ubiquitinação do hospedeiro aumenta a resistência da planta contra a infecção de *Tobacco mosaic virus* (TMV) (BECKER et al., 1993). Já o movimento sistêmico de TMV e *Turnip mosaic virus* (TuMV) em *Nicotiana benthamiana* foi prevenido quando o proteasoma 26S foi silenciado usando o silenciamento do gene induzido por vírus (VIGS, do inglês *virus-induced gene silencing*) (JIN; LI; VILLEGAS, 2006). Os resultados apresentados aqui suportam essa hipótese já que o grupo 2 não manifesta sintomas de doença, sugerindo que a planta foi de alguma maneira resistente ao PMeV. Esse fenômeno é ainda mais claro para miR398 possivelmente porque seu gene alvo, subunidade beta do proteasoma, tem atividades proteolíticas (ISAACSON; PLOEGH, 2009). Esses resultados ainda corroboram bem com o trabalho de Bazzini e colaboradores (2007), que reportaram um aumento similar na expressão de miRNAs em *Nicotiana tabacum* infectada com várias viroses.

Em contraste, o sistema UPS pode representar uma oportunidade para o patógeno aumentar sua infectividade. Em alguns casos, proteínas virais usam UPS para induzir a degradação de proteínas do hospedeiro e interferir em vias de sinalização celular, inibindo, portanto, mecanismos de defesa da planta. Em outras circunstâncias, proteínas virais são elas mesmas alvos da ubiquitinação porque o seu acúmulo é prejudicial ao hospedeiro. Assim, remover o excesso de proteínas virais cria um ambiente celular favorável e mantém a viabilidade do hospedeiro (CITOVSKY et al., 2009; ISAACSON; PLOEGH, 2009; RANDOW; LEHNER, 2009). A expressão de miR162 no grupo 3, quando os sintomas já aparecem, foi menor que no grupo controle, sugerindo que o processo de ubiquitinação, que é necessário para manutenção do sistema UPS, foi superexpresso. Entretanto, se proteínas do PMeV são alvo do sistema

de degradação proteasoma-ubiquitina em mamoeiro, isto não foi suficiente para impedir o progresso da infecção desse vírus neste caso. Uma explicação para isto é que o vírus usa o sistema UPS para seu próprio benefício, promovendo a ubiquitinação de proteínas virais em excesso ou de proteínas do hospedeiro durante a infecção.

Além disso, os vírus codificam para proteínas supressoras do silenciamento que impedem o acúmulo de miRNAs no hospedeiro (WANG et al., 2012). *Arabidopsis* transgênicas expressando a proteína supressora HCPro de TuMV mostraram um acúmulo alterado de miRNAs e sintomas similares ao de plantas mutantes em Dicer-Like 1 (DCL1), sugerindo que HCPro suprime um ou mais passos do processo dependente de DCL1 (KASSCHAU et al., 2003). As proteínas supressoras também podem interferir na clivagem dos mRNAs alvos guiada por miRNA, inibindo assim, o silenciamento do mRNA alvo. Por exemplo, as proteínas supressoras p21 de *Beet yellows virus* e p19 de *Tomato bushy stunt virus* interagem com o miRNA inibindo a sua incorporação ao complexo RISC ativo e, portanto, a clivagem do alvo (CHAPMAN et al., 2004).

Proteínas supressoras são fatores de patogenicidade e, portanto, determinam o aparecimento de sintomas de doença. Elas podem interferir com a via do miRNA no hospedeiro, que é necessária para o desenvolvimento normal da planta (MOISSIARD; VOINNET, 2004; WANG et al., 2012). Além disso, já foi relatado que a proteína supressora HcPro de *Papaya ringspot virus*, por exemplo, interage e inibe as atividades da subunidade 20S do proteasoma, levando ao acúmulo desse vírus no seu hospedeiro natural, o mamoeiro (SAHANA et al., 2012). Assim, a queda na expressão de miRNA e o aparecimento de sintomas da meleira nos grupos 3 e 4, concomitante com um maior acúmulo relativo viral, pode ser uma consequência da expressão e acúmulo de proteínas supressoras virais.

Para entender o efeito sistêmico do PMeV em mamoeiros, Rodrigues e colaboradores (2011) conduziram uma abrangente análise proteômica em amostras de folha de mamoeiros saudáveis e com meleira. Eles mostraram que a subunidade 20S do proteasoma está superexpressa durante a infecção. Adicionalmente, as expressões de miR398 e miR408, cujos alvos em mamoeiro são as subunidades do proteasoma 20S, foram reduzidas em resposta a um maior acúmulo relativo de PMeV (grupos 3 e 4), promovendo a superexpressão de genes que codificam para as subunidades do

proteasoma 20S. Esses resultados, portanto, corroboram bem com o trabalho de Rodrigues e colaboradores (2011) e reforçam a idéia de que o PMeV poderia usurpar o sistema UPS em seu próprio benefício, aumentando sua infectividade em mamoeiro. Esta hipótese parece ser ainda mais provável porque os grupos 3 e 4 apresentam os sintomas da doença.

A expressão de miR162, miR398 e miR408 no grupo 4, com altíssimo acúmulo relativo viral e sintomática para a meleira, foi similar à expressão no grupo controle, sem PMeV (Figura 16), possivelmente porque o vírus já passou pelo processo de replicação e a infecção está bem estabelecida na planta. Assim, interferir no sistema UPS não é mais necessário.

De maneira interessante, a resposta de miR156 foi significativamente diferente dos outros miRNAs estudados, já que sua expressão foi menor em resposta à infecção por PMeV (Figura 16). A expressão reduzida desse miRNA em mamoeiros infectados possivelmente ocorreu porque este miRNA está envolvido no processo de deubiquitinação, um processo potencialmente útil ao vírus. Por exemplo, a deubiquitinação *in vivo* da proteína RdRP de *Turnip yellow mosaic virus* levou à sua estabilidade, o que contribuiu para o aumento da infectividade viral em células vegetais (CHENON et al., 2012).

5.5 Expressão dos miRNAs envolvidos em diferentes vias de resposta a estresse

Diferente do que ocorreu com os miRNAs envolvidos na degradação proteolítica, a expressão dos miRNAs envolvidos em outras vias de resposta a estresse foi reduzida no grupo 2 (assintomática para a meleira). Houve uma marcante queda na expressão dos miRNAs 164, 396, 397, 399 e 390, enquanto a expressão de miR166 não diferiu do grupo controle (Figura 17, Anexo 3).

A Figura 17 mostra o acúmulo relativo de miR164, miR172, miR396 e miR399 em plantas com sintomas de meleira (grupos 3 e 4), mais marcadamente de miR399 que aumentou mais que 5 vezes no grupo 3, com alto acúmulo relativo viral. Quando o acúmulo viral foi muito alto (grupo 4) a expressão de miR396 e miR399 não diferiu do grupo controle. A expressão de miR397 em plantas infectadas foi significativamente menor quando comparada com o grupo controle, enquanto a expressão de miR166 não diferiu do grupo controle.

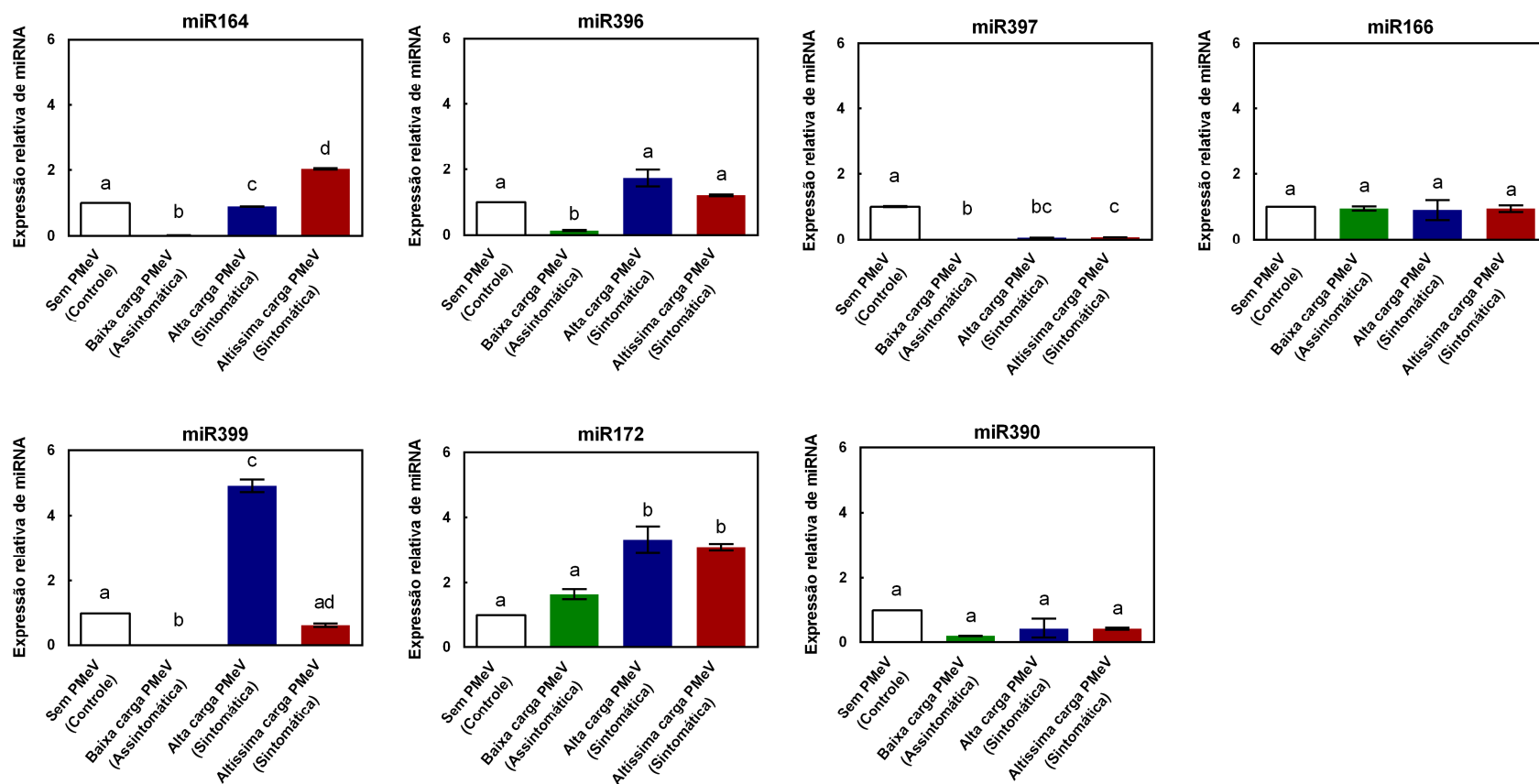


Figura 17. Quantificação relativa de miRNAs relacionados vias de resposta a estresse em folhas de mamoeiros sadios e com sintomas da meleira. MiRNAs foram isolados de folhas e o acúmulo de um grupo de miRNAs associados com diferentes vias de resposta a estresse foi avaliado por qRT-PCR usando o kit TaqMan Small RNA Assay (Life Technologies). Foram comparadas quatro amostras: i) Sem PMeV; ii) Baixo acúmulo relativo de PMeV; iii) Alto acúmulo relativo de PMeV e iv) Altíssimo acúmulo relativo de PMeV. Os níveis de miRNAs foram normalizadas com o mRNA que codifica para ciclofilina. A expressão de miRNA normalizada na amostra controle foi determinada como 1,0 e a expressão dos miRNAs foi calculada relativamente a este valor.

Esse trabalho mostrou que o PMeV modificou o acúmulo de vários miRNAs envolvidos em diferentes vias de resposta a estresse. A infecção por PMeV levou à alteração na expressão de miRNAs que modulam genes envolvidos na via de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). Por exemplo, houve uma queda na expressão de miR396, cujos alguns dos alvos são proteína de resposta a hipersensibilidade (HIRP) e ascorbato peroxidase citosólica (CAP) (Lista com a descrição dos alvos disponível em <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103401#s5> – Table S3), no grupo 2 (baixo acúmulo relativo viral) (Figura 17). Evidências sugerem que ROS tem as funções de sinalização, mediante a ativação de genes de defesa, e de estabelecimento de defesas adicionais, por controlar fatores de transcrição ou por interagir com outros componentes de sinalização, como a cascata de fosforilação (KOVTON et al., 2000; MOU; FAN; DONG, 2003).

Sabe-se que para se defenderem do ataque de patógenos, as plantas ativam uma cascata de sinalização que desencadeia uma série de respostas relacionadas ao patógeno, como a elevação dos níveis de cálcio intracelular, a produção de ROS, a ativação de várias quinases, inclusive MAPKs, mudanças na fosforilação de muitas proteínas celulares e mudanças na regulação gênica, o que leva à síntese de várias moléculas anti-microbianas (Anexo 5) (RAFIQI et al., 2009; ZVEREVA; POOGGIN, 2012).

Os resultados apresentados aqui mostram que a expressão dos alvos de miR396 bem como de miR166 (proteína quinase NPK1) é maior no início da infecção (grupo 2), quando o acúmulo relativo viral ainda é baixo (Figura 18). Assim, a provável produção de ROS e a sinalização pela cascata de fosforilação indica uma tentativa de controlar a infecção. ROS estão envolvidos na sinalização de cálcio e na superexpressão de proteínas de detoxificação, como peroxidases (exemplo, CAP). Em mamoeiros, já foi demonstrado o aumento de cristais de oxalato de cálcio e de H₂O₂ nos laticíferos de plantas infectadas com PMeV na tentativa de controlar a infecção viral (RODRIGUES et al., 2009).

Por outro lado, após o aparecimento dos sintomas da meleira, a expressão de miR396 aumenta novamente diminuindo a expressão de genes relacionados à produção de

ROS. Isso indica uma interferência do PMeV na regulação das respostas de defesa, levando ao desencadeamento dos sintomas da meleira.

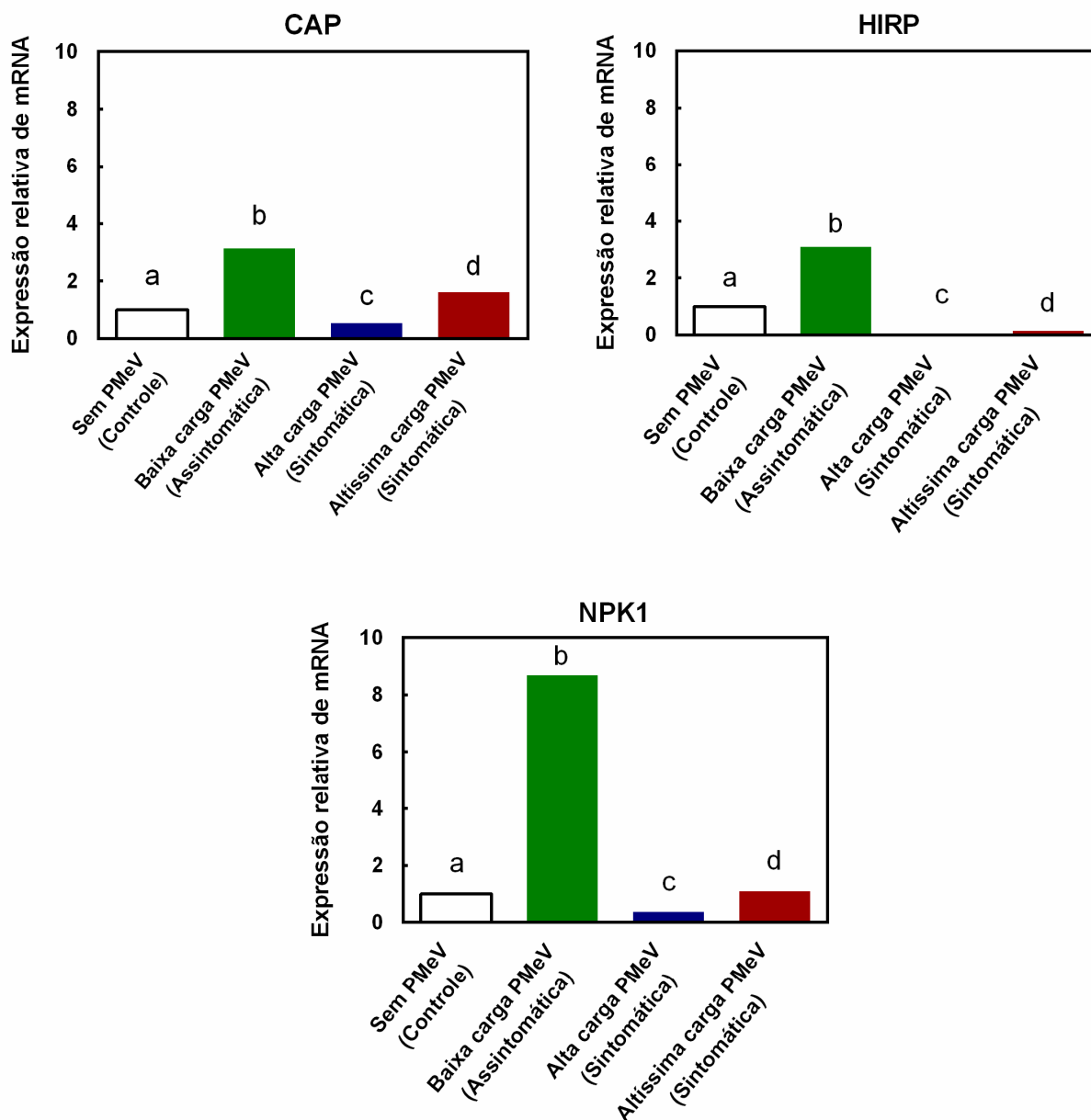


Figura 18. Quantificação de mRNAs em folhas de mamoeiros sadios e com sintomas da meleira. mRNAs foram isolados de folhas e o acúmulo de um grupo de mRNAs envolvidos com diferentes vias de resposta a estresse foi avaliado por qRT-PCR usando Sybr Green (Life Technologies) com um grupo de dois iniciadores para PCR que flanqueiam a região alvo do gene de interesse. Foram comparadas quatro amostras: i) Sem PMeV; ii) Baixo acúmulo relativo de PMeV; iii) Alto acúmulo relativo de PMeV e iv) Altíssimo acúmulo relativo de PMeV. Os níveis de mRNA foram normalizadas com o gene que codifica

para ciclofilina. A expressão de mRNA normalizada na amostra controle foi determinada como 1,0 e a expressão dos mRNAs foi calculada relativamente a este valor.

O aumento no acúmulo relativo de PMeV alterou a expressão de todos estes miRNAs estudados. MiRNAs de plantas regulam negativamente mRNAs que codificam para importantes fatores de regulação do desenvolvimento, resposta a estresse e mecanismos de defesa contra patógenos (CARRINGTON; AMBROS, 2003; ZHANG et al., 2005). Assim, a alteração na expressão e função dos miRNAs pode causar um desenvolvimento anormal da planta, resultando em sintomas de doença (KASSCHAU et al., 2003). Os miRNAs usados nesse estudo estão envolvidos na modulação de diferentes genes relacionados à via de desenvolvimento. Por exemplo, miR162 tem como alvo o gene que codifica para a proteína DCL1 em *Arabidopsis thaliana* (XIE; KASSCHAU; CARRINGTON, 2003). DCL1 é uma proteína envolvida na formação de miRNAs (HANNON, 2002; SCHAUER et al., 2002), então, miR162 também participa na formação de miRNAs em plantas. Alternativamente, miR398 tem um importante papel na resposta a estresse abiótico, tal como salinidade, inibindo a expressão de superóxido dismutase Cu/Zn (JAGADEESWARAN; SAINI; SUNKAR, 2009). Isso mostra que os miRNAs analisados nesse estudo estão envolvidos em diferentes vias de resposta da planta.

6. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

6. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

A atividade dos miRNAs está envolvida não somente no desenvolvimento da planta, mas também, dentre outros fatores, na sinalização e nos processos de interação com patógenos. Já se sabe que os vírus são capazes de alterar ou inibir as vias de miRNA (CHAPMAN et al., 2004) e que a modificação de vários miRNAs durante a infecção viral está relacionada ao desenvolvimentos de sintomas (BAZZINI et al., 2007).

Diante desse contexto, diferentes metodologias de modificação genética tem sido desenvolvidas para explorar a biologia do miRNA. A manipulação de miRNAs é atualmente um dos importantes caminhos para a biotecnologia de nova geração de plantas (DEBAT; DUCASSE, 2014). Atualmente, tem-se usado a biotecnologia principalmente para superexpressar miRNAs naturais, gerar miRNAs artificiais e inibir a atividade de miRNAs através de alvos artificiais (Tecnologia *target mimicry*) (DEBAT; DUCASSE, 2014).

Considerando a importância dos miRNAs na regulação de vias de resposta do mamoeiro ao PMeV, modificar a expressão de determinados miRNAs representa uma alternativa para induzir resistência a este vírus.

Os resultados apresentados aqui mostram que em mamoeiros infectados, sem sintomas de meleira há uma maior expressão de miR398. Estas plantas parecem responder à infecção, dificultando/impedindo o aparecimento dos sintomas, mostrando, portanto, alguma resistência contra o PMeV.

Um dos genes alvos do miR398 em mamoeiro é a subunidade beta do proteasoma 20S, estreitamente envolvida no sistema UPS. Como previamente relatado, esse sistema é usado por diferentes vírus para promover a virulência e, por outro lado, também pode ser usado pelo hospedeiro para promover a imunidade antiviral (MANDADI; SCHOLTHOF, 2013).

Diante disso, uma proposta para avaliar a resistência em mamoeiros contra o PMeV é superexpressar miR398, mimetizando a condição das plantas infectadas, mas sem sintomas. Isso seria responsável, dentre outros fatores, por reduzir a expressão de

proteínas envolvidas no sistema UPS, levando à queda da virulência e à possível resistência ao PMeV.

A metodologia usada para superexpressar miRNAs naturais em plantas está baseada na transformação com fortes promotores que direcionam a transcrição do precursor do miRNA de interesse, resultando assim no maior acúmulo do miRNA e na redução do mRNA alvo (DEBAT; DUCASSE, 2014).

Outra proposta para avaliar a resistência ao PMeV é inibir o acúmulo de miR396. Um dos alvos desse miRNA é o gene que codifica para inibidor de cisteíno-protease em mamoeiro. As cisteíno-proteases têm um papel essencial no ciclo de replicação de muitas viroses, conseqüentemente, a expressão de inibidores de cisteíno-proteases em plantas pode levar à resistência viral (GUTIERREZ-CAMPOS et al., 1999).

Para inibir o acúmulo de determinado miRNA, uma metodologia é mimetizar o gene alvo no hospedeiro. Essa metodologia conhecida como “target mimicry” consiste na expressão de genes alvos artificiais, que é capaz de sequestrar o miRNA de interesse e, portanto, previne a degradação do alvo (DEBAT; DUCASSE, 2014).

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- A anotação de miRNAs e de seus alvos no genoma de mamoeiro é uma ferramenta útil para complementar os dados genômicos e moleculares para o estudo da interação *Carica papaya*-PMeV.
- Esse estudo analisou a expressão de miRNAs em diferentes níveis de acúmulo relativo viral. Ele demonstra que a resposta da planta pode variar dependendo do acúmulo relativo viral e do momento da infecção e que o vírus é capaz de manipular vias do hospedeiro através dos miRNAs.
- A infecção por PMeV alterou o acúmulo de miRNAs envolvidos no sistema UPS e em diferentes vias de resposta a estresse em *Carica papaya*, sugerindo que esse vírus pode explorar e interferir com essas vias.
- Os dados apresentados aqui sugerem que o PMeV usa a resposta UPS da planta como uma estratégia para favorecer sua replicação e manter a viabilidade do hospedeiro e modifica a expressão de miRNAs que modulam importantes genes de resposta a estresse.
- A expressão de genes alvos envolvidos na via de ROS, importante nas vias de sinalização das plantas, mudou durante a infecção por PMeV.
- A alteração no acúmulo de miRNAs envolvidos no sistema UPS e na resposta a estresse em geral pode ser desencadeada pelo vírus, podendo estar estreitamente relacionada com o aparecimento dos sintomas da meleira do mamoeiro.
- A análise de miRNAs é útil para estudar a infecção por PMeV. Este vírus pode manipular a expressão de miRNAs e, portanto, regular direta ou indiretamente importantes vias de resposta de *C. papaya*.

8. PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

Para complementar o desenvolvimento e responder a alguns questionamentos resultantes dessa pesquisa, estão listados a seguir alguns pontos importantes a serem estudados:

- Identificar a proteína supressora do silenciamento do RNA de PMeV e avaliar se ela interfere no acúmulo de miRNAs, especialmente daqueles cujos alvos estão envolvidos na via do sistema UPS e em diferentes vias de resposta a estresse.
- Inibir o proteasoma usando inibidor específico e avaliar o acúmulo de PMeV para entender se a modulação da atividade proteolítica é crucial para auxiliar no aumento do acúmulo viral na célula.
- Avaliar se a proteína supressora do PMeV interage e interfere diretamente nas atividades do proteasoma 20S.
- Avaliar o acúmulo dos miRNAs usados nesse estudo, dos genes que codificam para proteínas da via do sistema UPS e a carga viral em plantas assintomáticas e sintomáticas para a meleira durante os diferentes estágios de desenvolvimento (antes, durante e após o florescimento). Isso poderá indicar em que momento as respostas da planta são modificadas pelo PMeV a ponto de os sintomas da meleira serem desencadeados.
- Avaliar se o PMeV interfere no acúmulo de miRNAs que modulam os processos de florescimento/frutificação a ponto de modificar o tempo de florescimento e causar os sintomas da meleira.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, P. et al. Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 180, n. 1, p. 11-17, 2012.
2. ALCAIDE-LORIDAN, C.; JUPIN, I. Ubiquitin and plant viruses, let's play together! . **Plant Physiol** v. 160, p. 72-82, 2012.
3. ARANDA, M.A. et al. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 26, p. 15289-15293, 1996.
4. ARAÚJO, M.M.M.D. et al. Molecular detection of Papaya meleira virus in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 146, n. 1, p. 305-310, 2007.
5. ARYAL, R. et al. Asymmetric purine-pyrimidine distribution in cellular small RNA population of papaya. **Bmc Genomics**, v. 13, 2012.
6. ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25-29, 2000.
7. BAZZINI, A.A. et al. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 29, p. 12157-12162, 2007.
8. BECKER, F. et al. Altered Response to Viral-Infection by Tobacco Plants Perturbed in Ubiquitin System. **Plant Journal**, v. 3, n. 6, p. 875-881, 1993.
9. BEREZIKOV, E.;CUPPEN, E.; PLASTERK, R.H.A. Approaches to microRNA discovery. **Nature Genetics**, v. 38, p. S2-S7, 2006.
10. BOUTET, S. et al. Arabidopsis HEN1: A genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. **Current Biology**, v. 13, n. 10, p. 843-848, 2003.
11. BROSNAN, C.A.; VOINNET, O. Cell-to-cell and long-distance siRNA movement in plants: mechanisms and biological implications. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 5, p. 580-587, 2011.

12. BUSS, D.S. et al. Oxidative Stress Defence Response of *Carica papaya* Challenged by Nitric Oxide, Papaya meleira virus and *Saccharomyces cerevisiae*. **The Open Nitric Oxide Journal**, v. 3, p. 55-64, 2011.
13. CAMBORDE, L. et al. The Ubiquitin-Proteasome System Regulates the Accumulation of Turnip yellow mosaic virus RNA-Dependent RNA Polymerase during Viral Infection. **Plant Cell**, v. 22, n. 9, p. 3142-3152, 2010.
14. CARRINGTON, J.C.; AMBROS, V. Role of microRNAs in plant and animal development. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 336-338, 2003.
15. CHAPMAN, E.J. et al. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. **Genes & Development**, v. 18, n. 10, p. 1179-1186, 2004.
16. CHELLAPPAN, P. et al. siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 20, p. 6883-6894, 2010.
17. CHEN, J. et al. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of MicroRNA in host gene expression. **Plant Cell**, v. 16, n. 5, p. 1302-1313, 2004.
18. CHEN, X.M. microRNA biogenesis and function in plants. **Febs Letters**, v. 579, n. 26, p. 5923-5931, 2005.
19. CHENON, M. et al. A viral deubiquitylating enzyme targets viral RNA-dependent RNA polymerase and affects viral infectivity. **Embo Journal**, v. 31, n. 3, p. 741-753, 2012.
20. CHIU, M.H. et al. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. **Mol Plant Pathol**, v. 11, n. 5, p. 641-649, 2010.
21. CITOVSKY, V. et al. Proteasomal degradation in plant-pathogen interactions. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 9, p. 1048-1054, 2009.
22. DALTRO, C.B. et al. Genetic diversity studies of Papaya meleira virus. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 1, p. 104-108, 2014.
23. DEBAT, H.J.; DUCASSE, D.A. Plant microRNAs: Recent Advances and Future Challenges. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, n. 6, p. 1257-1269, 2014.

24. DIELEN, A.S. et al. The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hide-and-see game. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 2, p. 293-308, 2010.
25. DING, S.W. RNA-based antiviral immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 9, p. 632-644, 2010.
26. DUAN, C.G.;WANG, C.H.; GUO, H.S. Application of RNA silencing to plant disease resistance. **Silence**, v. 3, n. 1, p. 5, 2012.
27. EINI, O. et al. Interaction with a host ubiquitin-conjugating enzyme is required for the pathogenicity of a geminiviral DNA beta satellite. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 22, n. 6, p. 737-746, 2009.
28. EL MOUSSAOUI, A. et al. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 4, p. 556-570, 2001.
29. FAOSTAT. Crop Production. 2012. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>, acesso em 02jan15.
30. FAOSTAT. Exports Trade. 2011. <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>, acesso em 02jan15.
31. FUJII, H. et al. A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. **Current Biology**, v. 15, n. 22, p. 2038-2043, 2005.
32. FUSARO, A.F. et al. The Enamovirus P0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation. **Virology**, v. 426, n. 2, p. 178-187, 2012.
33. GLEAVE, A.P. et al. Identification and characterisation of primary microRNAs from apple (*Malus domestica* cv. Royal Gala) expressed sequence tags. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 2, p. 343-358, 2008.
34. GLICK, E. et al. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein (vol 105, pg 157, 2007). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 11, p. 4571-4571, 2009.
35. GUO, Q. et al. Bioinformatic identification of microRNAs and their target genes from *Solanum tuberosum* expressed sequence tags. **Chinese Science Bulletin**, v. 52, n. 17, p. 2380-2389, 2007.

36. GUTIERREZ-CAMPOS, R. et al. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 1223-1226, 1999.
37. HAAS, G. et al. Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. **Embo Journal**, v. 27, n. 15, p. 2102-2112, 2008.
38. HAGEL, J.M.;YEUNG, E.C.; FACCHINI, P.J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 12, p. 631-639, 2008.
39. HANNON, G.J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244-251, 2002.
40. HOHN, T.; VAZQUEZ, F. RNA silencing pathways of plants: silencing and its suppression by plant DNA viruses. **Biochim Biophys Acta**, v. 1809, n. 11-12, p. 588-600, 2011.
41. IKEDA, F.; DIKIC, I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. **EMBO Rep**, v. 9, n. 6, p. 536-542, 2008.
42. ISAACSON, M.K.; PLOEGH, H.L. Ubiquitination, Ubiquitin-like Modifiers, and Deubiquitination in Viral Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 6, p. 559-570, 2009.
43. IVASHUTA, S. et al. Regulation of Gene Expression in Plants through miRNA Inactivation. **PlosOne**, v. 6, n. 6, p. e21330, 2011.
44. JAGADEESWARAN, G.;SAINI, A.; SUNKAR, R. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis. **Planta**, v. 229, n. 4, p. 1009-1014, 2009.
45. JIN, H.L.;LI, S.T.; VILLEGAS, A. Down-regulation of the 26S proteasome subunit RPN9 inhibits viral systemic transport and alters plant vascular development. **Plant Physiology**, v. 142, n. 2, p. 651-661, 2006.
46. JONES-RHOADES, M.W.; BARTEL, D.P. Computational identification of plant MicroRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. **Molecular Cell**, v. 14, n. 6, p. 787-799, 2004.
47. JONES-RHOADES, M.W.;BARTEL, D.P.; BARTEL, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 19-53, 2006.

48. JOVER-GIL, S.;CANDELA, H.; PONCE, M.R. Plant microRNAs and development. **International Journal of Developmental Biology**, v. 49, n. 5-6, p. 733-744, 2005.
49. KASSCHAU, K.D. et al. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. **Developmental Cell**, v. 4, n. 2, p. 205-217, 2003.
50. KHVOROVA, A.;REYNOLDS, A.; JAYASENA, S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias (Reprinted from Cell, vol 115, pg 209-216, 2003). **Cell**, v. 131, n. 4, p. 41-49, 2007.
51. KIDNER, C.A.; MARTIENSSEN, R.A. The developmental role of microRNA in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 38-44, 2005.
52. KITAJIMA, E.W. et al. Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers, with "meleira" ("Sticky disease") of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 118-122, 1993.
53. KOMANDER, D.;CLAGUE, M.J.; URBE, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 8, p. 550-563, 2009.
54. KOVTUN, Y. et al. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 6, p. 2940-2945, 2000.
55. LAI, E.C. microRNAs: Runts of the genome assert themselves. **Current Biology**, v. 13, n. 23, p. R925-R936, 2003.
56. LAI, J. et al. RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. **Plant J**, v. 57, n. 5, p. 905-917, 2009.
57. LAM, E.;KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 848-853, 2001.
58. LANG, Q.L. et al. Tobacco microRNAs prediction and their expression infected with Cucumber mosaic virus and Potato virus X. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 3, p. 1523-1531, 2011.

59. LEWSEY, M. et al. Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. **Plant J**, v. 50, n. 2, p. 240-252, 2007.
60. LIANG, G. et al. Identification of miRNAs and miRNA-mediated regulatory pathways in *Carica papaya*. **Planta**, v. 238, n. 4, p. 739-752, 2013.
61. LLAVE, C. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. **Trends Plant Sci**, v. 15, n. 12, p. 701-707, 2010.
62. LOZANO-DURAN, R. et al. Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v. 23, n. 3, p. 1014-1032, 2011a.
63. LOZANO-DURAN, R. et al. Identification of host genes involved in geminivirus infection using a reverse genetics approach. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22383, 2011b.
64. MACIEL-ZAMBOLIM, E. et al. Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, v. 52, n. 3, p. 389-394, 2003.
65. MAGHULY, F.;RAMKAT, R.C.; LAIMER, M. Virus versus Host Plant MicroRNAs: Who Determines the Outcome of the Interaction? **Plos One**, v. 9, n. 6, 2014.
66. MALLORY, A.; VAUCHERET, H. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. **Plant Cell**, v. 22, n. 12, p. 3879-3889, 2010.
67. MANDADI, K.K.; SCHOLTHOF, K.B.G. Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? **Plant Cell**, v. 25, n. 5, p. 1489-1505, 2013.
68. MARINO, D.;PEETERS, N.; RIVAS, S. Ubiquitination during Plant Immune Signaling. **Plant Physiology**, v. 160, n. 1, p. 15-27, 2012.
69. MELNYK, C.W.;MOLNAR, A.; BAULCOMBE, D.C. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. **Embo Journal**, v. 30, n. 17, p. 3553-3563, 2011.
70. MENG, Y.;SHAO, C.; CHEN, M. Toward microRNA-mediated gene regulatory networks in plants. **Briefings in Bioinformatics**, 2011.

71. MOISSIARD, G.; VOINNET, O. Viral suppression of RNA silencing in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 71-82, 2004.
72. MOSHER, R.A.; MELNYK, C.W. siRNAs and DNA methylation: seedy epigenetics. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 4, p. 204-210, 2010.
73. MOU, Z.; FAN, W.H.; DONG, X.N. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. **Cell**, v. 113, n. 7, p. 935-944, 2003.
74. NAQVI, A.R.; HAQ, Q.M.; MUKHERJEE, S.K. MicroRNA profiling of tomato leaf curl New Delhi virus (toLCDV) infected tomato leaves indicates that deregulation of mir159/319 and mir172 might be linked with leaf curl disease. **Virology**, v. 7, p. 281, 2010.
75. NAVARRO, B. et al. Viroids: How to infect a host and cause disease without encoding proteins. **Biochimie**, v. 94, n. 7, p. 1474-1480, 2012.
76. PARK, W. et al. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Current Biology**, v. 12, n. 17, p. 1484-1495, 2002.
77. PEREZ-BRITO, D. et al. First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 71, p. 13564-13570, 2012.
78. PEREZ-QUINTERO, A.L. et al. Plant microRNAs and their role in defense against viruses: a bioinformatics approach. **BMC Plant Biology**, v. 10, 2010.
79. PUMPLIN, N.; VOINNET, O. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 745-760, 2013.
80. PURKAYASTHA, A.; DASGUPTA, I. Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. **Plant Physiol Biochem**, v. 47, n. 11-12, p. 967-976, 2009.
81. RAFIQI, M. et al. In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 9, p. 1017-1024, 2009.
82. RANDOW, F.; LEHNER, P.J. Viral avoidance and exploitation of the ubiquitin system. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 527-535, 2009.

83. REINHART, B.J. et al. MicroRNAs in plants. **Genes & Development**, v. 16, n. 13, p. 1616-1626, 2002.
84. RODRIGUES, S.P. et al. Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. **Plant cell reports**, v. 28, n. 5, p. 861-871, 2009.
85. RODRIGUES, S.P. et al. Simplified molecular method for the diagnosis of Papaya meleira virus in papaya latex and tissues. **Summa Phytopathologica**, v. 31, p. 281-283, 2005.
86. RODRIGUES, S.P. et al. Proteomic analysis of papaya (*Carica papaya* L.) displaying typical sticky disease symptoms. **Proteomics**, v. 11, n. 13, p. 2592-2602, 2011.
87. RODRIGUES, S.P. et al. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in the latex of sticky diseased *Carica papaya* L. plants. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 11, p. 3191-3198, 2012.
88. SAHANA, N. et al. Inhibition of the Host Proteasome Facilitates Papaya Ringspot Virus Accumulation and Proteasomal Catalytic Activity Is Modulated by Viral Factor HcPro. **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012.
89. SCHAUER, S.E. et al. DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 11, p. 487-491, 2002.
90. SCHOTT, G. et al. Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. **Embo Journal**, v. 31, n. 11, p. 2553-2565, 2012.
91. SCHWARZ, D.S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex (Reprinted from Cell, vol 115, pg 199-208, 2003). **Cell**, v. 131, n. 4, p. 30-40, 2007.
92. SIDAHMED, A.M.; WILKIE, B. Endogenous antiviral mechanisms of RNA interference: a comparative biology perspective. **Methods Mol Biol**, v. 623, p. 3-19, 2010.
93. SIMON-MATEO, C.; GARCIA, J.A. MicroRNA-Guided processing impairs Plum pox virus replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism. **Journal of Virology**, v. 80, n. 5, p. 2429-2436, 2006.

94. TAGAMI, Y. et al. Specific enrichment of miRNAs in *Arabidopsis thaliana* infected with Tobacco mosaic virus. **DNA Research**, v. 14, n. 5, p. 227-233, 2007.
95. TAKIZAWA, M.;GOTO, A.; WATANABE, Y. The tobacco ubiquitin-activating enzymes NtE1A and NtE1B are induced by tobacco mosaic virus, wounding and stress hormones. **Mol Cells**, v. 19, n. 2, p. 228-231, 2005.
96. THIEL, H.; VARRELMANN, M. Identification of Beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor-interacting sugar beet proteins that represent putative virus targets or components of plant resistance. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 22, n. 8, p. 999-1010, 2009.
97. TUSSELL, R. et al. Seed transmission of Papaya meleira virus in papaya (*Carica papaya*) cv. Maradol. **Plant Pathology**, 2014.
98. VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 2002.
99. VARGASON, J.M. et al. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 799-811, 2003.
100. VAUCHERET, H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. **Genes & Development**, v. 20, n. 7, p. 759-771, 2006.
101. VAZQUEZ, F. et al. Evolution of *Arabidopsis* MIR genes generates novel microRNA classes. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 20, p. 6429-6438, 2008.
102. VAZQUEZ, F.;LEGRAND, S.; WINDELS, D. The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. **Trends Plant Sci**, v. 15, n. 6, p. 337-345, 2010.
103. VENTURA, J.A. et al. Meleira do mamoeiro: etiologia, sintomas e epidemiologia. **Papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno. INCAPER, Vitória**, p. 267-276, 2003.
104. VENTURA, J.A.;COSTA, H.; TATAGIBA, J.S. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI, S. A. H. M. (Ed.). **Diseases of Fruits and Vegetables**. Springer, 2004. p. 201-268.

105. VOGLER, H. et al. Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 19, p. 10379-10388, 2007.
106. VOINNET, O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 669-687, 2009.
107. WANG, M.B. et al. RNA Silencing and Plant Viral Diseases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 10, p. 1275-1285, 2012.
108. WHITHAM, S.A. et al. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible Arabidopsis thaliana plants. **Plant J**, v. 33, n. 2, p. 271-283, 2003.
109. XIAO, F.F. et al. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D105-D110, 2009.
110. XIE, Z.X.; KASSCHAU, K.D.; CARRINGTON, J.C. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. **Current Biology**, v. 13, n. 9, p. 784-789, 2003.
111. YE, C. et al. The unfolded protein response is triggered by a plant viral movement protein. **Plant Physiol**, v. 156, n. 2, p. 741-755, 2011.
112. YE, C.; VERCHOT, J. Role of unfolded protein response in plant virus infection. **Plant Signal Behav**, v. 6, n. 8, p. 1212-1215, 2011.
113. YE, K.Q.; MALININA, L.; PATEL, D.J. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 874-878, 2003.
114. ZHANG, B.H. et al. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. **Cell Research**, v. 15, n. 5, p. 336-360, 2005.
115. ZHOU, M. et al. In silico detection and characteristics of novel microRNA genes in the Equus caballus genome using an integrated ab initio and comparative genomic approach. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 125-131, 2009.
116. ZHU, X.Y. et al. Evaluation of New Reference Genes in Papaya for Accurate Transcript Normalization under Different Experimental Conditions. **Plos One**, v. 7, n. 8, 2012.

117. ZVEREVA, A.S.; POOGGIN, M.M. Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. **Viruses-Basel**, v. 4, n. 11, p. 2578-2597, 2012.

10. ANEXOS

10. ANEXOS

Anexo 1. Resultados do qRT-PCR usados para avaliar o melhor gene de referência para as análises em amostras de folhas de mamoeiros assintomáticos e com sintomas de meleira.

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	Ct	Ct Mean	Ct SD	Automatic Ct Threshold	Ct Threshold	Automatic Baseline	Baseline Start	Baseline End	Efficiency
A1	Sadia 1	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.7974	25.63049	0.150869	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	19	1
A2	Sadia 1	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.5902	25.63049	0.150869	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	19	1
A3	Sadia 1	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.5038	25.63049	0.150869	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	19	1
A4	Sadia 1	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.47	31.06962	0.568502	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	25	1
A5	Sadia 1	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.1381	31.06962	0.568502	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	25	1
A6	Sadia 1	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.6008	31.06962	0.568502	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	25	1
A7	Sadia 1	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.4839	28.87646	1.219734	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	22	1
A8	Sadia 1	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.2441	28.87646	1.219734	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	23	1
A9	Sadia 1	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	27.9014	28.87646	1.219734	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	22	1
B1	Sadia 2	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.9369	25.92029	0.014726	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	19	1
B2	Sadia 2	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.9089	25.92029	0.014726	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	20	1
B3	Sadia 2	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.915	25.92029	0.014726	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	20	1
B4	Sadia 2	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.8052	31.06263	0.331549	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	25	1
B5	Sadia 2	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.946	31.06263	0.331549	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	25	1

B6	Sadia 2	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.4367	31.06263	0.331549	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	25	1
B7	Sadia 2	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.7754	28.6589	0.107757	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	22	1
B8	Sadia 2	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.5627	28.6589	0.107757	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	22	1
B9	Sadia 2	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.6386	28.6589	0.107757	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	22	1
C1	Meleira 1	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.9612	29.92215	0.082693	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	25	1
C2	Meleira 1	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.8272	29.92215	0.082693	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	22	1
C3	Meleira 1	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.9781	29.92215	0.082693	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	23	1
C4	Meleira 1	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.8924	31.08678	0.221229	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	25	1
C5	Meleira 1	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.0405	31.08678	0.221229	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	25	1
C6	Meleira 1	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.3275	31.08678	0.221229	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	25	1
C7	Meleira 1	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.5485	30.38556	0.172563	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	24	1
C8	Meleira 1	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.4034	30.38556	0.172563	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	24	1
C9	Meleira 1	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.2048	30.38556	0.172563	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	23	1
D1	Meleira 2	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.3228	32.43203	0.107327	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	25	1
D2	Meleira 2	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.4359	32.43203	0.107327	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	26	1
D3	Meleira 2	SAMDS	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.5374	32.43203	0.107327	FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	26	1
D4	Meleira 2	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.4389	33.43746	0.015032	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	28	1
D5	Meleira 2	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.4517	33.43746	0.015032	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	27	1
D6	Meleira 2	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.4218	33.43746	0.015032	FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	27	1

D7	Meleira 2	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.6038	32.49486	0.18632	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	27	1
D8	Meleira 2	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.6011	32.49486	0.18632	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	26	1
D9	Meleira 2	EIF4	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.2797	32.49486	0.18632	FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	26	1
E1		SAMDS	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined			FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	39	1
E2		SAMDS	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined			FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	39	1
E3		SAMDS	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined			FALSO	0.4338474	VERDADEIRO	3	39	1
E4		CYP	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined			FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	39	1
E5		CYP	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined			FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	39	1
E6		CYP	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined			FALSO	0.2738205	VERDADEIRO	3	39	1
E7		EIF4	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined			FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	39	1
E8		EIF4	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined			FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	39	1
E9		EIF4	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined			FALSO	0.4566095	VERDADEIRO	3	39	1

Analysis Type Singleplex
 Block Type 96fast
 Chemistry TAQMAN
 Experiment File Name C:\Experimentos_Paolla\Genes de referencia_Carica papaya_GeNorm.eds
 Instrument Type sds7500fast
 Passive Reference ROX

Anexo 2. Resultados do qRT-PCR usados para avaliar a expressão de miRNAs envolvidos na via Proteasoma-Ubiquitina em amostras de folha de mamoeiros assintomáticos e com sintomas da meleira.

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	C _T	C _T Mean	Automatic Ct Threshold	Ct Threshold	Automatic Baseline	Baseline Start	Baseline End	Efficiency
A1	Controle	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.31866	32.5188	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	29	1
A2	Controle	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.90038	32.5188	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	28	1
A3	Controle	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.33738	32.5188	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	30	1
A4	Baixa carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.09438	32.308	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	27	1
A5	Baixa carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.19247	32.308	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	28	1
A6	Baixa carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.637	32.308	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	30	1
A7	Alta carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.96811	33.47	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	29	1
A8	Alta carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.68367	33.47	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	29	1
A9	Alta carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.7587	33.47	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	30	1
A10	Altíssima carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.19638	34.5483	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	30	1
A11	Altíssima carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.8971	34.5483	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	33	1

A12	Altíssima carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.55146	34.5483	VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	27	1
B1	Controle	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	23.40007	22.9114	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	17	1
B2	Controle	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	22.71073	22.9114	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	16	1
B3	Controle	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	22.6234	22.9114	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	17	1
B4	Baixa carga PMeV	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.5412	26.5304	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	20	1
B5	Baixa carga PMeV	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.27458	26.5304	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	20	1
B6	Baixa carga PMeV	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.77533	26.5304	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	20	1
B7	Alta carga PMeV	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.7192	25.7386	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	20	1
B8	Alta carga PMeV	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.54064	25.7386	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	19	1
B9	Alta carga PMeV	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.95586	25.7386	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	20	1
B10	Altíssima carga PMeV	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.03978	25.3331	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	19	1
B11	Altíssima carga PMeV	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.58933	25.3331	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	19	1
B12	Altíssima carga PMeV	miR398b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.37	25.3331	VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	19	1
C1	Controle	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.38962	25.0511	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	20	1
C2	Controle	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	24.77112	25.0511	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	20	1
C3	Controle	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	24.99241	25.0511	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	20	1

C4	Baixa carga PMeV	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.09231	26.7648	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	20	1
C5	Baixa carga PMeV	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.84346	26.7648	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	22	1
C6	Baixa carga PMeV	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	27.35876	26.7648	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	22	1
C7	Alta carga PMeV	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.09957	28.0543	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	23	1
C8	Alta carga PMeV	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	27.96084	28.0543	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	23	1
C9	Alta carga PMeV	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.1	28.0543	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	23	1
C10	Altíssima carga PMeV	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	27.18494	27.1979	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	22	1
C11	Altíssima carga PMeV	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	27.3	27.1979	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	22	1
C12	Altíssima carga PMeV	miR408	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	27.10761	27.1979	FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	22	1
D1	Controle	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.89073	30.7891	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	24	1
D2	Controle	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.50612	30.7891	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	24	1
D3	Controle	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.97047	30.7891	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	25	1
D4	Baixa carga PMeV	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.27254	29.5818	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	24	1
D5	Baixa carga PMeV	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.62389	29.5818	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	23	1

D6	Baixa carga PMeV	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.84885	29.5818	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	23	1
D7	Alta carga PMeV	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.96136	31	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	24	1
D8	Alta carga PMeV	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.279	31	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	24	1
D9	Alta carga PMeV	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.78991	31	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	24	1
D10	Altíssima carga PMeV	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.52284	30.4476	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	24	1
D11	Altíssima carga PMeV	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.21	30.4476	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	24	1
D12	Altíssima carga PMeV	miR156a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.60994	30.4476	VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	23	1
E1	Controle	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.89977	28.7594	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	22	1
E2	Controle	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.43825	28.7594	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	21	1
E3	Controle	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.94	28.7594	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	22	1
E4	Baixa carga PMeV	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.55488	28.4555	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	22	1
E5	Baixa carga PMeV	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.32778	28.4555	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	22	1
E6	Baixa carga PMeV	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.48384	28.4555	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	21	1
E7	Alta carga PMeV	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.93932	28.7006	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	21	1
E8	Alta carga PMeV	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.53769	28.7006	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	21	1

E9	Alta carga PMeV	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.62488	28.7006	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	21	1
E10	Altíssima carga PMeV	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.72273	28.7748	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	22	1
E11	Altíssima carga PMeV	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.96168	28.7748	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	22	1
E12	Altíssima carga PMeV	miR162a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.64	28.7748	VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	21	1
F1	Controle	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.811	36.1413	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	35	1
F2	Controle	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.2899	36.1413	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	35	1
F3	Controle	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.3231	36.1413	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	35	1
F4	Baixa carga PMeV	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined	25.3746	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	37	1
F5	Baixa carga PMeV	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	37.89335	25.3746	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	35	1
F6	Baixa carga PMeV	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	12.8558	25.3746	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	35	1
F7	Alta carga PMeV	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined	36.0791	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	39	1
F8	Alta carga PMeV	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined	36.0791	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	38	1
F9	Alta carga PMeV	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.07906	36.0791	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	35	1
F10	Altíssima carga PMeV	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.56325	36.8347	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	35	1

F11	Altíssima carga PMeV	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	37.08582	36.8347	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	35	1
F12	Altíssima carga PMeV	miR171	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.85501	36.8347	VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	35	1
G1		CYP	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	39	1
G2		CYP	NTC	FAM	NFQ-MGB	39.65519		VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	35	1
G3		CYP	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.076720658	VERDADEIRO	3	39	1
G4		miR398b	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	39	1
G5		miR398b	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	39	1
G6		miR398b	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.374379492	VERDADEIRO	3	39	1
G7		miR408	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	39	1
G8		miR408	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	39	1
G9		miR408	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		FALSO	0.19585	VERDADEIRO	3	39	1
G10		miR156a	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	39	1
G11		miR156a	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	39	1
G12		miR156a	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.42349	VERDADEIRO	3	39	1
H1		miR162a	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	39	1
H2		miR162a	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	39	1
H3		miR162a	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.665968595	VERDADEIRO	3	39	1
H4		miR171	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	39	1
H5		miR171	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	39	1
H6		miR171	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.003779484	VERDADEIRO	3	39	1

Analysis Type Singleplex
 Endogenous Control CYP
 RQ Min/Max Confidence Level 95.0
 Reference Sample Controle
 Block Type 96fast
 Chemistry TAQMAN
 Experiment File Name C:\Experimentos_Paolla\Expressao miRNAs Prot-Ub em plantas Baixa carga PMeVs e infectadas com PMeV.eds
 Instrument Type sds7500fast
 Passive Reference ROX

Anexo 3. Resultados do qRT-PCR usados para avaliar a expressão de miRNAs envolvidos em diferentes vias de resposta a estresse em amostras de folha de mamoeiros assintomáticos e com sintomas da meleira.

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	Ct	Ct Mean	Automatic Ct Threshold	Ct Threshold	Automatic Baseline	Baseline Start	Baseline End	Efficiency
A1	Controle	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.95767	29.76546	VERDADEIRO	0.436157417	VERDADEIRO	3	23	1
A2	Controle	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.57324	29.76546	VERDADEIRO	0.436157417	VERDADEIRO	3	23	1
A3	Baixa carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.48942	28.53152	VERDADEIRO	0.436157417	VERDADEIRO	3	21	1
A4	Baixa carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.57361	28.53152	VERDADEIRO	0.436157417	VERDADEIRO	3	22	1
A5	Alta carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.97298	30.2076	VERDADEIRO	0.436157417	VERDADEIRO	3	24	1
A6	Alta carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.44222	30.2076	VERDADEIRO	0.436157417	VERDADEIRO	3	24	1
A7	Altíssima carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.1862	29.23214	VERDADEIRO	0.436157417	VERDADEIRO	3	22	1
A8	Altíssima carga PMeV	CYP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.27807	29.23214	VERDADEIRO	0.436157417	VERDADEIRO	3	23	1
A9	Controle	miR396b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.67935	29.58908	VERDADEIRO	0.496834255	VERDADEIRO	3	22	1
A10	Controle	miR396b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.4988	29.58908	VERDADEIRO	0.496834255	VERDADEIRO	3	22	1
A11	Baixa carga PMeV	miR396b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.96243	31.17846	VERDADEIRO	0.496834255	VERDADEIRO	3	24	1
A12	Baixa carga PMeV	miR396b	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.39448	31.17846	VERDADEIRO	0.496834255	VERDADEIRO	3	23	1
B1	Controle	miR396a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	24.82387	24.8853893280	VERDADEIRO	0.390385928	VERDADEIRO	3	19	1
B2	Controle	miR396a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	24.94691	24.8853893280	VERDADEIRO	0.390385928	VERDADEIRO	3	19	1
B3	Baixa carga PMeV	miR396a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.42087	25.43425	VERDADEIRO	0.390385928	VERDADEIRO	3	19	1

B4	Baixa carga PMeV	miR396a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	25.44763	25.43425	VERDADEIRO	0.390385928	VERDADEIRO	3	19	1
B5	Alta carga PMeV	miR396a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	23.21997	23.33772	VERDADEIRO	0.390385928	VERDADEIRO	3	17	1
B6	Alta carga PMeV	miR396a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	23.45547	23.33772	VERDADEIRO	0.390385928	VERDADEIRO	3	17	1
B7	Altíssima carga PMeV	miR396a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	23.71945	23.88946	VERDADEIRO	0.390385928	VERDADEIRO	3	18	1
B8	Altíssima carga PMeV	miR396a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	24.05946	23.88946	VERDADEIRO	0.390385928	VERDADEIRO	3	18	1
B9	Alta carga PMeV	miR396b	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	29.46575	29.25328	VERDADEIRO	0.496834255	VERDADEIRO	3	23	1
B10	Alta carga PMeV	miR396b	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	29.04081	29.25328	VERDADEIRO	0.496834255	VERDADEIRO	3	22	1
B11	Altíssima carga PMeV	miR396b	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	28.81674	28.78255	VERDADEIRO	0.496834255	VERDADEIRO	3	22	1
B12	Altíssima carga PMeV	miR396b	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	28.74835	28.78255	VERDADEIRO	0.496834255	VERDADEIRO	3	22	1
C1	Controle	miR397a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	24.48795	24.50621	VERDADEIRO	0.411763096	VERDADEIRO	3	18	1
C2	Controle	miR397a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	24.52447	24.50621	VERDADEIRO	0.411763096	VERDADEIRO	3	18	1
C3	Baixa carga PMeV	miR397a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	28.15652	28.19415	VERDADEIRO	0.411763096	VERDADEIRO	3	21	1
C4	Baixa carga PMeV	miR397a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	28.23178	28.19415	VERDADEIRO	0.411763096	VERDADEIRO	3	21	1
C5	Alta carga PMeV	miR397a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	28.98047	28.93383	VERDADEIRO	0.411763096	VERDADEIRO	3	23	1
C6	Alta carga PMeV	miR397a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	28.88719	28.93383	VERDADEIRO	0.411763096	VERDADEIRO	3	22	1
C7	Altíssima carga PMeV	miR397a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	27.73421	27.68966	VERDADEIRO	0.411763096	VERDADEIRO	3	21	1
C8	Altíssima carga PMeV	miR397a	UNKNOWN	FAM	NFQ- MGB	27.64512	27.68966	VERDADEIRO	0.411763096	VERDADEIRO	3	20	1
C9		miR397a	NTC	FAM	NFQ- MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.411763096	VERDADEIRO	3	39	1
C11		miR396a	NTC	FAM	NFQ- MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.390385928	VERDADEIRO	3	39	1

D1	Controle	miR399f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34.26405	34.1031	VERDADEIRO	0.988689877	VERDADEIRO	3	32	1
D2	Controle	miR399f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.94214	34.1031	VERDADEIRO	0.988689877	VERDADEIRO	3	32	1
D3	Baixa carga PMeV	miR399f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.988689877	VERDADEIRO	3	37	1
D4	Baixa carga PMeV	miR399f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.988689877	VERDADEIRO	3	39	1
D5	Alta carga PMeV	miR399f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.30764	32.83692	VERDADEIRO	0.988689877	VERDADEIRO	3	30	1
D6	Alta carga PMeV	miR399f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.36621	32.83692	VERDADEIRO	0.988689877	VERDADEIRO	3	31	1
D7	Altíssima carga PMeV	miR399f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34.33899	34.22129	VERDADEIRO	0.988689877	VERDADEIRO	3	31	1
D8	Altíssima carga PMeV	miR399f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34.1036	34.22129	VERDADEIRO	0.988689877	VERDADEIRO	3	31	1
D9		miR399f	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.988689877	VERDADEIRO	3	39	1
D11		miR396b	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.496834256	VERDADEIRO	3	39	1
E1	Controle	miR390a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.24616	26.18992	VERDADEIRO	0.527054652	VERDADEIRO	3	19	1
E2	Controle	miR390a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.13368	26.18992	VERDADEIRO	0.527054652	VERDADEIRO	3	19	1
E3	Baixa carga PMeV	miR390a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	27.19623	27.2984	VERDADEIRO	0.527054652	VERDADEIRO	3	20	1
E4	Baixa carga PMeV	miR390a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	27.40058	27.2984	VERDADEIRO	0.527054652	VERDADEIRO	3	21	1
E5	Alta carga PMeV	miR390a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.527054652	VERDADEIRO	3	39	1
E6	Alta carga PMeV	miR390a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	27.04911	27.04911	VERDADEIRO	0.527054652	VERDADEIRO	3	19	1
E7	Altíssima carga PMeV	miR390a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.73408	26.85316	VERDADEIRO	0.527054652	VERDADEIRO	3	20	1
E8	Altíssima carga PMeV	miR390a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.97226	26.85316	VERDADEIRO	0.527054652	VERDADEIRO	3	20	1
E9		miR390a	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.527054652	VERDADEIRO	3	39	1

E11		CYP	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.436157417	VERDADEIRO	3	35	1
F1	Controle	miR164a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.0722	28.08698	VERDADEIRO	0.495657547	VERDADEIRO	3	22	1
F2	Controle	miR164a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.1	28.08698	VERDADEIRO	0.495657547	VERDADEIRO	3	22	1
F3	Baixa carga PMeV	miR164a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.97815	31.87196	VERDADEIRO	0.495657547	VERDADEIRO	3	25	1
F4	Baixa carga PMeV	miR164a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.76577	31.87196	VERDADEIRO	0.495657547	VERDADEIRO	3	25	1
F5	Alta carga PMeV	miR164a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.67776	28.68737	VERDADEIRO	0.495657547	VERDADEIRO	3	22	1
F6	Alta carga PMeV	miR164a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.69698	28.68737	VERDADEIRO	0.495657547	VERDADEIRO	3	22	1
F7	Altíssima carga PMeV	miR164a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.5125	26.52859	VERDADEIRO	0.495657547	VERDADEIRO	3	19	1
F8	Altíssima carga PMeV	miR164a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.54468	26.52859	VERDADEIRO	0.495657547	VERDADEIRO	3	20	1
F9		miR164a	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.495657547	VERDADEIRO	3	39	1
G1	Controle	miR166a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.58768	26.55396	VERDADEIRO	0.573205957	VERDADEIRO	3	20	1
G2	Controle	miR166a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.52	26.55396	VERDADEIRO	0.573205957	VERDADEIRO	3	19	1
G3	Baixa carga PMeV	miR166a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.30564	25.4	VERDADEIRO	0.573205957	VERDADEIRO	3	18	1
G4	Baixa carga PMeV	miR166a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.49706	25.4	VERDADEIRO	0.573205957	VERDADEIRO	3	19	1
G5	Alta carga PMeV	miR166a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.73157	26.73157	VERDADEIRO	0.573205957	VERDADEIRO	3	20	1
G6	Alta carga PMeV	miR166a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined	26.73157	VERDADEIRO	0.573205957	VERDADEIRO	3	39	1
G7	Altíssima carga PMeV	miR166a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.96387	26.1119	VERDADEIRO	0.573205957	VERDADEIRO	3	19	1
G8	Altíssima carga PMeV	miR166a	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.25992	26.1119	VERDADEIRO	0.573205957	VERDADEIRO	3	19	1
G9		miR166a	NTC	FAM	NFQ-MGB	30.46111		VERDADEIRO	0.573205957	VERDADEIRO	3	23	1

H1	Controle	miR172f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.64695	36.3403	VERDADEIRO	0.052976628	VERDADEIRO	3	33	1
H2	Controle	miR172f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	37.03365	36.3403	VERDADEIRO	0.052976628	VERDADEIRO	3	34	1
H3	Baixa carga PMeV	miR172f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34.53511	34.39971	VERDADEIRO	0.052976628	VERDADEIRO	3	31	1
H4	Baixa carga PMeV	miR172f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34.26431	34.39971	VERDADEIRO	0.052976628	VERDADEIRO	3	31	1
H5	Alta carga PMeV	miR172f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.23132	35.05815	VERDADEIRO	0.052976628	VERDADEIRO	3	32	1
H6	Alta carga PMeV	miR172f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34.88499	35.05815	VERDADEIRO	0.052976628	VERDADEIRO	3	31	1
H7	Altíssima carga PMeV	miR172f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34.12795	34.17398	VERDADEIRO	0.052976628	VERDADEIRO	3	30	1
H8	Altíssima carga PMeV	miR172f	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34.22	34.17398	VERDADEIRO	0.052976628	VERDADEIRO	3	32	1
H9		miR172f	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined		VERDADEIRO	0.052976628	VERDADEIRO	3	39	1

Analysis Type Singleplex
 Endogenous Control CYP
 RQ Min/Max
 Confidence Level 95.0
 Reference Sample Controle
 Block Type 96fast
 Chemistry TAQMAN
 Experiment File
 Name C:\Experimentos_Paolla\miRNAs papaya_resposta a estresse_1.eds
 Instrument Type sds7500fast
 Passive Reference ROX

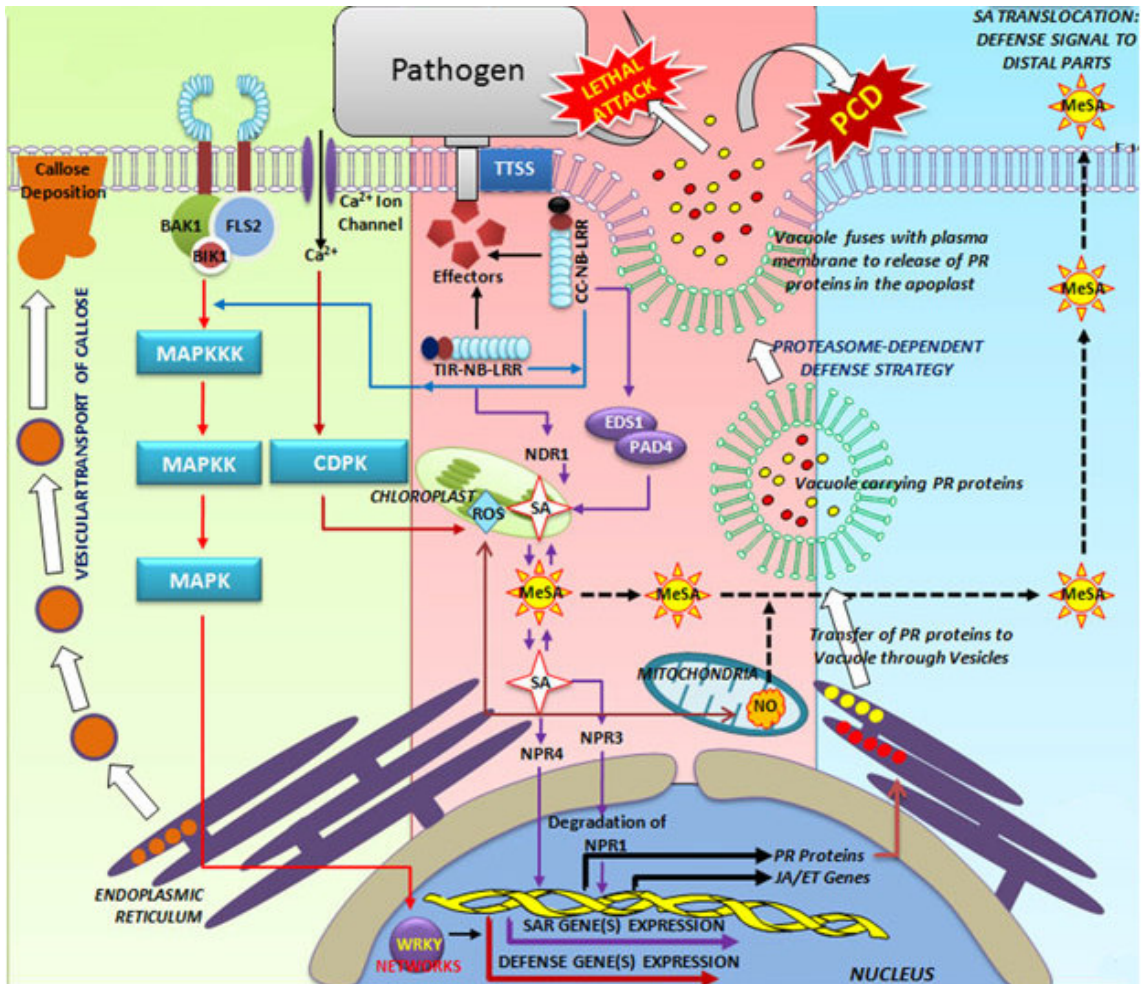
Anexo 4. Resultados do qRT-PCR usados para avaliar a expressão de mRNAs envolvidos em diferentes vias de resposta a estresse em amostras de folha de mamoeiros assintomáticos e com sintomas da meleira.

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	C _T	C _T Mean	Automatic Ct Threshold	Ct Threshold	Automatic Baseline	Baseline Start	Baseline End	Efficiency	Tm1
A1	Controle	HIRP	UNKNOWN	SYBR	None	25.87661	25.87661	FALSO	0.432845381	VERDADEIRO	3	20	1	78.27
A2	Baixa carga PMeV	HIRP	UNKNOWN	SYBR	None	24.44879	24.44879	FALSO	0.432845381	VERDADEIRO	3	18	1	78.45
A3	Alta carga PMeV	HIRP	UNKNOWN	SYBR	None	29.41157	29.41157	FALSO	0.432845381	VERDADEIRO	3	23	1	78.27
A4	Altíssima carga PMeV	HIRP	UNKNOWN	SYBR	None	27.95878	27.95878	FALSO	0.432845381	VERDADEIRO	3	21	1	78.45
B1	Controle	CAP	UNKNOWN	SYBR	None	25.94091	25.94091	FALSO	0.451131117	VERDADEIRO	3	20	1	75.96
B2	Baixa carga PMeV	CAP	UNKNOWN	SYBR	None	24.49527	24.49527	FALSO	0.451131117	VERDADEIRO	3	18	1	76.32
B3	Alta carga PMeV	CAP	UNKNOWN	SYBR	None	25.64241	25.64241	FALSO	0.451131117	VERDADEIRO	3	20	1	76.14
B4	Altíssima carga PMeV	CAP	UNKNOWN	SYBR	None	24.6329	24.6329	FALSO	0.451131117	VERDADEIRO	3	19	1	76.32
C1	Controle	PSAT	UNKNOWN	SYBR	None	27.6493	27.6493	FALSO	0.29115773	VERDADEIRO	3	23	1	78.27
C2	Baixa carga PMeV	PSAT	UNKNOWN	SYBR	None	26.05618	26.05618	FALSO	0.29115773	VERDADEIRO	3	20	1	78.63
C3	Alta carga PMeV	PSAT	UNKNOWN	SYBR	None	27.93994	27.93994	FALSO	0.29115773	VERDADEIRO	3	22	1	78.81

C4	Altíssima carga PMeV	PSAT	UNKNOWN	SYBR	None	26.9256	26.9256	FALSO	0.29115773	VERDADEIRO	3	22	1	2	78.99 23477
D1	Controle	NPK1	UNKNOWN	SYBR	None	29.08523	29.08523	FALSO	0.227248244	VERDADEIRO	3	24	1	3	75.07 32269
D2	Baixa carga PMeV	NPK1	UNKNOWN	SYBR	None	26.17163	26.17163	FALSO	0.227248244	VERDADEIRO	3	21	1	6	75.60 76507
D3	Alta carga PMeV	NPK1	UNKNOWN	SYBR	None	29.36154	29.36154	FALSO	0.227248244	VERDADEIRO	3	24	1	6	75.60 76507
D4	Altíssima carga PMeV	NPK1	UNKNOWN	SYBR	None	28.34509	28.34509	FALSO	0.227248244	VERDADEIRO	3	23	1	2	75.78 57971
E1	Controle	CYP	UNKNOWN	SYBR	None	25.21805	25.21805	FALSO	0.277078461	VERDADEIRO	3	20	1	7	80.23 93493
E2	Baixa carga PMeV	CYP	UNKNOWN	SYBR	None	25.42376	25.42376	FALSO	0.277078461	VERDADEIRO	3	20	1	3	80.59 56268
E3	Alta carga PMeV	CYP	UNKNOWN	SYBR	None	24.04204	24.04204	FALSO	0.277078461	VERDADEIRO	3	18	1	9	80.77 37731
E4	Altíssima carga PMeV	CYP	UNKNOWN	SYBR	None	24.60716	24.60716	FALSO	0.277078461	VERDADEIRO	3	19	1	9	80.77 37731

Analysis Type Singleplex
 Endogenous Control CYP
 RQ Min/Max Confidence Level 95.0
 Reference Sample Controle
 Block Type 96fast
 Chemistry SYBR_GREEN
 Experiment File Name C:\Experimentos_Paolla\Expressao genes resposta a estresse papaya.eds
 Instrument Type sds7500fast

Anexo 5. Representação esquemática dos mecanismos de defesa da planta contra patógenos. As respostas de defesa da planta envolvem a elevação dos níveis de cálcio intracelular, a produção de ROS, a ativação de várias quinases, inclusive MAPKs, mudanças na fosforilação de muitas proteínas celulares e mudanças na regulação gênica, o que leva à síntese de várias moléculas antimicrobianas. A comunicação entre o tecido infectado e o restante da planta é feita por um “sinal sistêmico” móvel, que pode ser metil salicilato, dentre outros. Fonte: MUTHAMILARASAN e PRASAD, 2013.



Anexo 6. Artigo científico publicado (PlosOne).

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Carica papaya MicroRNAs Are Responsive to *Papaya meleira virus* Infection



Paolla M. V. Abreu¹, Clícia G. Gaspar², David S. Buss¹, José A. Ventura^{1,3}, Paulo C. G. Ferreira², Patricia M. B. Fernandes^{1*}

1 Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil, **2** Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Vitória, Espírito Santo, Brazil

Abstract

MicroRNAs are implicated in the response to biotic stresses. *Papaya meleira virus* (PMeV) is the causal agent of sticky disease, a commercially important pathology in papaya for which there are currently no resistant varieties. PMeV has a number of unusual features, such as residence in the laticifers of infected plants, and the response of the papaya to PMeV infection is not well understood. The protein levels of 20S proteasome subunits increase during PMeV infection, suggesting that proteolysis could be an important aspect of the plant defense response mechanism. To date, 10,598 plant microRNAs have been identified in the Plant miRNAs Database, but only two, miR162 and miR403, are from papaya. In this study, known plant microRNA sequences were used to search for potential microRNAs in the papaya genome. A total of 462 microRNAs, representing 72 microRNA families, were identified. The expression of 11 microRNAs, whose targets are involved in 20S and 26S proteasomal degradation and in other stress response pathways, was compared by real-time PCR in healthy and infected papaya leaf tissue. We found that the expression of miRNAs involved in proteasomal degradation increased in response to very low levels of PMeV titre and decreased as the viral titre increased. In contrast, miRNAs implicated in the plant response to biotic stress decreased their expression at very low level of PMeV and increased at high PMeV levels. Corroborating with this results, analysed target genes for this miRNAs had their expression modulated in a dependent manner. This study represents a comprehensive identification of conserved miRNAs in papaya. The data presented here might help to complement the available molecular and genomic tools for the study of papaya. The differential expression of some miRNAs and identifying their target genes will be helpful for understanding the regulation and interaction of PMeV and papaya.

Citation: Abreu PMV, Gaspar CG, Buss DS, Ventura JA, Ferreira PCG, et al. (2014) *Carica papaya* MicroRNAs Are Responsive to *Papaya meleira virus* Infection. PLoS ONE 9(7): e103401. doi:10.1371/journal.pone.0103401

Editor: Rogério Margis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Received: December 18, 2013; **Accepted:** June 30, 2014; **Published:** July 29, 2014

Copyright: © 2014 Abreu et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: patricia.fernandes@ufes.br

Anexo 7. Artigo científico submetido (Viruses).

Viruses **2015**, *7*, 1-xmanuscripts; doi:10.3390/v70x0000x

OPEN ACCESS

viruses

ISSN 1999-4915

www.mdpi.com/journal/viruses

Review

A Current Overview of the *Papaya meleira virus*, an unusual plant virus

Paolla M. V. Abreu^{1†}, Tathiana F. S. Antunes^{1†}, Anuar Magaña-Álvarez^{1,2}, Daisy Pérez-Brito², Raúl Tapia-Tussell², José A. Ventura^{1,3}, Antonio A. R. Fernandes¹, Patricia M. B. Fernandes^{1*}

¹ Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil; E-Mails: paollaabreu1@gmail.com; tathiana_antunes@hotmail.com; aarfernandes@gmail.com

² Laboratorio GeMBio, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., México; E-Mails: ahmed_alvarez@hotmail.com; daisy pb@cicy.mx; rtapia@cicy.mx

³ Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Vitória, Espírito Santo, Brazil; E-Mail: ventura@incaper.es.gov.br

† These authors equally contributed to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: patricia.fernandes@ufes.br; Tel.: +55-27-3335-7348; Fax: +55-27-3335-7275.

Academic Editor:

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: *Papaya meleira virus* (PMeV) is the causal agent of papaya sticky disease, which is characterized by a spontaneous exudation of fluid and aqueous latex from the papaya fruit and leaves. The latex oxidizes after atmospheric exposure, resulting in a sticky feature on the fruit from which the name of the disease originates. PMeV is an isometric virus particle with a double-stranded RNA (dsRNA) genome of approximately 12 Kb. Unusual for a plant virus, PMeV particles are localized on and linked to the polymers present in the latex. The

ability of the PMeV to inhabit such a hostile environment demonstrates an intriguing interaction of the virus with the papaya. A hypersensitivity response is triggered against PMeV infection, and there is a reduction in the proteolytic activity of papaya latex during sticky disease. In papaya leaf tissues, stress responsive proteins, mostly calreticulin and proteasome-related proteins, are up regulated and proteins related to metabolism are down-regulated. Additionally, PMeV modifies the transcription of several miRNAs involved in the modulation of genes related to the ubiquitin-proteasome system. Until now, no PMeV resistant papaya genotype has been identified and roguing is the only viral control strategy available. However, a single inoculation of papaya plants with PMeV dsRNA delayed the progress of viral infection.

Keywords: papaya sticky disease; dsRNA genome virus; phytopathogenic virus; laticifers colonization

Anexo 8. Capítulo de livro publicado (Nova Science Publishers).

In: Tropical Fruits

ISBN: 978-1-63463-547-9

Editors: S. Dimitrov Todorov and I. Vitanova Ivanova © 2015 Nova Science Publishers, Inc.

*Chapter 8***BIOTECHNOLOGICAL STRATEGIES FOR CONTROL
OF PAPAYA VIRUS DISEASES***Paolla M. V. Abreu, Tahiana F. S. Antunes
and Patricia M. B. Fernandes**Núcleo de Biotecnologia,
Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória,
Espírito Santo, Brazil**ABSTRACT**

Papaya (*Carica papaya*) viruses diseases bring serious reductions of crop yield in different regions of the world, reaching to a total destruction of the affected orchards. Virus control is still a challenge, requiring an efficient and at the same time durable strategy.

There is no resistant papaya cultivar to several viruses, therefore the destruction of the infected plants is the main control method. The development of transgenic papayas in Hawaii, expressing the coat protein of *Papaya ringspot virus*, led to virus resistance with excellent fruit quality.

Therefore, it represents a promising strategy for controlling plant viruses. However, the production and consumption of transgenic plants still have many barriers in several countries.

Alternatively, the production of genetically modified plants, especially for the RNA silencing pathway, are becoming increasingly important and represent the best possible control strategy.

This chapter analyzes the main biotechnological strategies currently used in papaya virus diseases control and discuss other strategies for the future.

Keywords: Papaya (*Carica papaya*) viruses, *Papaya ringspot virus*, plant viruses, genetically modified plants, papaya virus diseases control

* Corresponding author: Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil; e-mail: patricia.fernandes@ufes.br.

Anexo 9. Capítulo de livro em publicação (Editora Edgard Blücher).

LIVRO 3:

BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRO&INDÚSTRIA: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES

GENÉTICA PARA MELHORAMENTO DE PLANTAS

CAPÍTULO 20

ENFOQUE BIOTECNOLÓGICO PARA O CONTROLE DE VÍRUS DE PLANTA

Paolla Mendes do Vale de Abreu¹, Aline Vaz², Patricia Machado Bueno Fernandes³

1 Doutoranda em Biotecnologia. 2 Pós-doutoranda em Biotecnologia. 3 Professora Associada. Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

RESUMO

A agricultura moderna está baseada em pesquisas científicas visando o aumento da produção e da qualidade do produto, a redução do uso de defensivos agrícolas, de energia e da área plantada. Dentre as enfermidades que acometem as plantas, o controle das viroses representa um desafio para o manejo de áreas cultivadas. As principais estratégias para controlar a infecção viral em plantas se baseiam na obtenção de cultivares resistentes por genética clássica ou utilizando as modernas ferramentas de engenharia genética. Recentemente, a maior compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência da planta e o crescente conhecimento da genética molecular dos vírus têm facilitado o desenvolvimento de novas estratégias antivirais. Plantas modificadas geneticamente, em particular aquelas apresentando a via de silenciamento do RNA, são alvo de interesse crescente e representam a possibilidade de estratégias futuras mais efetivas. Neste capítulo serão apresentados conceitos básicos para o entendimento das estratégias biotecnológicas utilizadas atualmente no agronegócio.