

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Reação à infecção pelo vírus da tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) expressando seqüências gênicas do CTV

Amancio José de Souza

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Amancio José de Souza
Engenheiro Agrônomo

Reação à infecção pelo vírus da tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) expressando seqüências gênicas do CTV

Orientador:

Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba

2008

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Souza, Amancio José de

Reação à infecção pelo vírus da tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja 'Hamlim' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) expressando seqüências gênicas do CTV / Amancio José de Souza. - - Piracicaba, 2008.

90 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Closterovirus 2. Laranja 3. Plantas transgênicas 4. Tristeza cítrica I. Título

CDD 634.31
S729r

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

DEDICO

À minha esposa e companheira

TAIS NAYANNE

pelo amor e paciência durante esta caminhada

À minha família

ANA, GONÇALO e FERNANDA

pelo amor e apoio incondicional

OFEREÇO

Aos meus avós

JOSÉ e RADCLIFF (*in memorian*)

AMANCIO e MARIA (*in memorian*)

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela oportunidade concedida, confiança, orientação e amizade.

À Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes pela co-orientação e diversas contribuições durante o curso deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Harakava pelas contribuições relativas à biologia molecular.

Ao Dr. Gerd Walter Müller pela ajuda no trabalho com o CTV.

Ao Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende pelas valiosas contribuições na conceituação do presente trabalho.

À Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado e equipe pela ajuda na realização das análises imunológicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia e sua equipe.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP) Sr. José, Davi, Éder e Aparecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento de parte do projeto.

Ao Fundecitrus pelo financiamento de parte do projeto.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira pela parceria e doação de material para o projeto.

Ao Serviço Brasileiro de Apoio à Micro e Pequena Empresa (SEBRAE) por apoiar esta iniciativa de capacitação pessoal e profissional.

À empresa Citrograf pela doação de sementes de laranja azeda.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Eng. Agrônomo Vitor Cicolin pela doação de material para o projeto.

Ao Dr. Sérgio A. de Carvalho do Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo apoio e colaboração na obtenção de material para o projeto.

Ao Dr. Valdir Yuki do IAC pela identificação dos pulgões.

Ao amigo José Raimundo da UNICAMP pela ajuda nas análises de ELISA e *western blot*.

Aos amigos Bruno e Melissa pelo apoio fraterno.

Aos amigos Roberto e Monita pela convivência.

Aos amigos Rosely, Suane, Alex, Edimilson, Jurema, Marcelo, Fabiana, Lili, Dayse, Alexandra, Renata, Jana, Evelini, Livia, Melina, Gustavo, Eduardo, Alessandro, Leandro, Evandro e Junior pelo companheirismo.

E a todas as pessoas e instituições que contribuíram para o trabalho em questão.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Tristeza dos citros.....	19
2.2 Morte súbita dos citros (MSC)	22
2.3 Transformação genética de plantas	23
2.4 Transformação genética de citros.....	24
2.5 Expressão de transgenes	26
2.6 Silenciamento gênico.....	27
2.7 Resistência a vírus em plantas transgênicas	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Material vegetal	35
3.2 Análises moleculares para confirmação da transgenia e caracterização das plantas avaliadas.....	37
3.2.1 Teste histoquímico GUS.....	37
3.2.2 PCR das plantas transgênicas	38
3.2.3 Análise de <i>Southern blot</i>	39
3.2.4 Análise de RT-PCR	39
3.2.5 Análise de <i>northern blot</i>	40
3.3 Delineamento experimental.....	40
3.4 Inoculação de CTV.....	41
3.4.1 Inoculação de CTV por enxertia (experimento 1).....	41
3.4.2 Inoculação de CTV por pulgão preto <i>T. citricida</i> (experimento 2).....	42
3.5 Detecção do vírus em plantas inoculadas.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Caracterização das plantas transgênicas.....	44

4.2 Inoculação de CTV por enxertia e avaliação da resistência à infecção pelo vírus em plantas transgênicas (experimento 1).....	56
4.3 Inoculação de CTV por pulgão preto (<i>T. citricida</i> Kirkaldy) e avaliação da resistência à infecção pelo vírus em plantas transgênicas (experimento 2)	63
5 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO	78

RESUMO

Reação à infecção pelo vírus da tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) expressando seqüências gênicas do CTV

O vírus da tristeza dos citros (CTV) é uma das maiores ameaças à citricultura mundial. No Brasil, mesmo com a pré-imunização e com a substituição de porta-enxertos, estirpes fortes de CTV ainda causam prejuízos consideráveis. Com o aparecimento da Morte Súbita dos Citros em 1999 e a possível relação desta doença com o CTV, este vírus voltou a figurar como patógeno de importância no cenário da citricultura brasileira. Uma das possíveis soluções para o controle de viroses em fruteiras é a obtenção de plantas transgênicas resistentes ou imunes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência ao CTV de plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ contendo três construções gênicas oriundas de seqüências do genoma do CTV. Estas construções gênicas visaram ativar rotas de RNAi (hairpin da capa protéica e seqüência conservada antisenso do CTV) e mecanismos de defesa relacionados à expressão da capa protéica do CTV. As plantas transgênicas foram desafiadas com uma estirpe fraca de CTV (CTV-IAC) por meio de borbulhas e pulgões pretos (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) contendo o vírus. A avaliação da resistência à replicação viral foi feita por análises de ELISA. As plantas transgênicas foram consideradas não resistentes à infecção e translocação viral quando inoculadas com borbulhas. Entretanto algumas plantas mostraram retardamento da infecção. Não foi possível determinar se houve resistência à transmissão de CTV por pulgões já que a técnica utilizada não foi capaz de infectar os controles de maneira uniforme.

Palavras-chave: Silenciamento gênico; Transformação genética; RNAi; CTV; Citros

ABSTRACT

Reaction to *Citrus tristeza virus* (CTV) infection of transgenic ‘Hamlin’ sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) plants transformed with CTV genetic sequences

The *Citrus tristeza virus* (CTV) is one of the greatest threats to the citrus industry worldwide. In Brazil, CTV continues to cause damage through strong strains despite the use of techniques like cross-protection and substitution of intolerant rootstocks. With the appearance and spread of the Citrus Sudden Death disease in 1999 and its possible relation to CTV, this virus was again among important pathogens within the Brazilian citrus industry. One of the possible solutions for controlling virus diseases in fruit crops is the development of immune or resistant transgenic plants. The objective of this work was to evaluate the resistance to CTV of transgenic ‘Hamlin’ sweet orange plants containing three transgenic constructs obtained from CTV genomic sequences. The genetic constructs used aimed to activate RNAi defense routes (coat protein hairpin and a conserved sequence from CTV) and resistance mechanisms related to the coat protein expression. The transgenic plants were challenged with a weak strain of CTV, CTV-IAC, by bud and aphid (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) inoculation. The evaluation of viral replication was done by ELISA analysis. The transgenic plants were considered susceptible to viral replication and translocation when bud inoculated. However, a few plants showed retardation of infection. It was not possible to determine resistance in the aphid transmission assay since the controls were not uniformly inoculated.

Keywords: Gene silencing; Genetic transformation; RNAi; CTV; Citrus

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Construções gênicas utilizadas na transformação genética de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Os sítios de restrição usados na análise de *Southern blot* estão indicados pelo traço perpendicular. CP = gene da capa protéica (p25) do genoma do CTV; SC = seqüência conservada da região 3’ do genoma do CTV e parte do gene p23 do CTV; DS = seqüências senso e antisenso do gene da capa protéica do CTV separadas por um intron; 35S-T = terminador 35S do CaMV; NPT II = gene de resistência à canamicina; 35S-P = promotor 35S do CaMV; GUS = gene da β -Glucuronidase; NOS-T = terminador NOS 36
- Figura 2 – Propagação de plantas transgênicas, inoculação de CTV por enxertia e inoculação de CTV com pulgões pretos. A) Borbulha de matriz transgênica enxertada em limão ‘Cravo’. B) Inoculação por enxertia de borbulhas infectadas (seta vermelha) com o isolado CTV-IAC em limão ‘Cravo’ enxertado com planta transgênica ao final do primeiro fluxo. C) Plantas com as duas borbulhas enxertadas (inóculos) (setas vermelhas). D) Inoculação de CTV com pulgões pretos em lima ácida ‘Galego’ 42
- Figura 3 - Padrões de expressão de GUS em discos foliares de matrizes transgênicas de laranja ‘Hamlin’ e controle. A) Controle negativo, planta de laranja ‘Hamlin’ tipo selvagem. B, C e D) Diferentes padrões de expressão de GUS encontrados nas matrizes transgênicas. Matrizes contendo padrão de expressão tipo B: todas CP, todas DS, SC1, SC2, SC3, SC5, SC6, SC7 e SC8. Matrizes contendo padrão de expressão tipo C e D: SC4, SC9, SC10 45
- Figura 4 - Análises de RT-PCR das matrizes transgênicas para o gene repórter GUS. M = marcador de 100 pb; B = Branco; DNA+ = amostra de DNA positiva para o gene reporter; HAM- = cDNA de planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada; SC1-SC10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisenso do CTV” 45
- Figura 5 - Análises de PCR das matrizes transgênicas. CP1-CP10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP); SC1-SC10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisenso do CTV” (SC); DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = matrizes

transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS); M = marcador de 100 pb; + = bactéria usada na transformação; B = controle negativo do PCR com água; - = planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada 47

Figura 6 - Análises de Southern blot das matrizes transgênicas, todas as reações de restrição do DNA genômico foram feitas com a enzima *Bam*HI. CP2, CP6, CP7 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP); SC1, SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisenso do CTV” (SC); DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS); + = produto de PCR obtido a partir de bactéria usada na transformação; - = planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada48

Figura 7 - Análises de RT-PCR dos genes de interesse das matrizes transgênicas. A e B) RT-PCR para o gene de interesse das construções CP e DS. C) RT-PCR para o gene de interesse da construção SC. CP1-CP7, CP9, CP10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP); SC1-SC10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisenso do CTV” (SC); DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS); M = marcador; DNA+ = amostra de DNA positiva para o gene de interesse; HAM- = cDNA de planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada; RNA trat. = amostra de RNA tratada com DNase; B = Branco; LG+ RNA – cDNA de planta infectada com CTV 50

Figura 8 - Análises de northern blot das matrizes transgênicas para os genes de interesse das construções CP e DS. CP1-CP10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP); DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS); DNA+ = produto de PCR do gene CP; HAM- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada 51

Figura 9 - Análises de northern blot das matrizes transgênicas para o gene de interesse da construção SC. SC1-SC10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisenso do CTV” (SC); DNA+ = produto de PCR do gene

SC; HAM- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada; LG+ = planta de lima ácida ‘Galego’ infectada com CTV 52

Figura 10 - ELISA das matrizes transgênicas das construções CP e DS. CP1-CP10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP); DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS); HAM- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica não inoculada; CB 104+ = proteína recombinante do capsídeo viral do CTV usada como controle positivo 54

Figura 11 - Rotas de defesa ativadas pelos transgenes DS e SC. A) Síntese de mRNA da seqüência conservada antisenso do CTV (SC); formação de dsRNA por hibridização com a partícula viral do CTV; reconhecimento e degradação do dsRNA pela enzima DICER no citoplasma; formação do complexo RISC e degradação de novos RNAs virais. B) Síntese de dsRNA com seqüências da capa protéica do CTV; produção de siRNA pela enzima DICER no núcleo; formação do complexo RISC e degradação de RNA viral. entre o mRNA transgênico e partícula viral; produção de siRNA pela DICER; formação do complexo RISC e degradação de RNA viral 55

Figura 12 - ELISA das plantas controle (experimento 1), após 14 semanas da inoculação com CTV. Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). HAMS- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica, não inoculada; HAMS+ = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica, inoculada com CTV; LGS- = planta de lima ácida ‘Galego’ não inoculada; LGS+ = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV; R1, R2 e R3 = repetições 57

Figura 13 – Sintomas causados pelo CTV em lima ácida ‘Galego’ (experimento 1). A) lima ácida ‘Galego’ controle não transgênico sem inoculação, as setas indicam nervuras normais. B) lima ácida ‘Galego’ controle não transgênico com inoculação, setas indicam *vein clearing*. C) Plantas controle de lima ácida ‘Galego’ durante o segundo fluxo. A planta da direita é CTV positiva 57

Figura 14 - Resultados de ELISA das plantas CP (experimento 1), após 14 semanas da inoculação com CTV. Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). CP1-CP10 = plantas transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP) e inoculadas com CTV; HAMS- = planta

de laranja ‘Hamlin’ não transgênica não inoculada; HAMS+ = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculada com CTV; LGS- = planta de lima ácida ‘Galego’ não inoculada; LGS+ = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV. ; R1, R2 e R3 = repetições 58

Figura 15 - ELISA das plantas SC (experimento 1), após 14 semanas da inoculação com CTV. Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). SC1-SC10 = plantas transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisense do CTV” (SC) e inoculadas com CTV; HAMS- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica não inoculada; HAMS+ = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculada com CTV; LGS- = planta de lima ácida ‘Galego’ não inoculada; LGS+ = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV; R1, R2 e R3 = repetições..... 59

Figura 16 - ELISA das plantas DS (experimento 1), após 14 semanas da inoculação com CTV. Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = plantas transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS) e inoculadas com CTV; HAMS- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica não inoculada; HAMS+ = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculada com CTV; LGS- = planta de lima ácida ‘Galego’ não inoculada; LGS+ = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV; R1, R2 e R3 = repetições..... 60

Figura 17 - ELISA de plantas que apresentaram retardamento da infecção viral após 46 semanas da inoculação com CTV (experimento 1). DS1 R2, DS1 R3 DS4 R1, DS4 R2, DS7 R1, DS7 R3, DS8 R1, DS8 R3, CP5 R3, CP6 R3, CP9 R3, SC1 R3, SC2 R2, SC6 R2, SC8 R3, SC9 R2 = parcelas do experimento 1 compostas por plantas transgênicas transformadas com as respectivas construções gênicas (DS, CP e SC) apresentando retardamento inicial da infecção por CTV; HAM- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica não inoculada; HAM+ = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculada com CTV; LG- = planta de lima ácida ‘Galego’ não inoculada; LG+ = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV 61

Figura 18 - ELISA dos controles positivos do experimento 2 após 18 semanas da inoculação com pulgões. HAMS+(LC) = plantas de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculada com

CTV enxertadas em limão ‘Cravo’; HAMS+(LA) = plantas de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculadas com CTV enxertadas em laranja azeda; LGS+(LC)- = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV enxertada em limão ‘Cravo’; LGS+ (LA) = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV enxertada em laranja azeda; R1, R2 e R3 = repetições 63

LISTA DE ABREVIATURAS

ABECITRUS – Associação Brasileira dos Exportadores de Citros

CaMV – *Cauliflower mosaic virus*

CB 104 – Proteína recombinante da capa protéica do CTV, usada como controle positivo nas análises de ELISA

cDNA – *complementary DNA* ou DNA complementar

CENA – Centro de Energia Nuclear na Agricultura

CP – Gene da capa protéica do CTV

CTAB – *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*

CTV – *Citrus tristeza virus* ou vírus da tristeza dos citros

DICER – enzima DICER

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTPs – desoxirribonucleotídeo trifosfato

DS – *hairpin* de seqüências gênicas da capa protéica do CTV

dsRNA – RNA fita dupla

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESALQ – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

kb - kilobases

nm - nanometro

miRNP -

MSC - Morte súbita dos citros

pb – pares de base

PBS – *phosphate buffer solution*

PBST - *phosphate buffer solution*; TWEEN®

PCR – *Polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase

PPV – *Plum pox virus*

PVX – *Potato virus X*

GUS – gene da β -glucuronidase

ORFs – *Open reading frames*

RDP – Resistência derivada do patógeno

RISC – *RNA-induced silencing complex*

RNA – ácido ribonucléico

RNAi – RNA de interferência

RT-PCR – *Reverse Transcription* – PCR

SSC – Solução de cloreto de sódio e citrato de sódio

SC - seqüência genômica conservada do CTV

T-DNA – *Transfer DNA* ou DNA de transferência

TMV – *Tabacco mosaic virus*

1 INTRODUÇÃO

Dentre as frutas cultivadas no mundo, os citros ocupam lugar de destaque. Estima-se que a área colhida de laranja no mundo em 2006 foi de 3.618.386 ha, com produção de 64.795.383,20 t. No Brasil, neste mesmo ano, a área de cultivo de laranja foi de, aproximadamente, 802.820 ha com produção de 18.059.359 t (FAO, 2008).

A citricultura ocupa o primeiro lugar na fruticultura brasileira. Principalmente no sudeste do país, esta atividade representa uma cadeia produtiva fortemente estabelecida gerando um dos principais produtos da pauta de exportação do agronegócio brasileiro. Segundo dados da ABECITRUS (2008), na safra 2007/2008, o Brasil exportou 877.828 toneladas de suco concentrado de laranja, gerando em torno de um bilhão e trezentos milhões de dólares.

As plantas cítricas são continuamente ameaçadas por várias pragas e doenças que acometem a cultura. Dentre elas, destaca-se a tristeza dos citros que, até meados do século passado, produziu o maior dano econômico até hoje registrado na citricultura mundial. Esta doença, causada por um vírus, foi disseminada entre as regiões produtoras no mundo por material propagativo infectado, sendo destrutiva em determinadas combinações de copa e porta-enxerto. Uma das combinações mais afetadas é a de copa de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) sobre a laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) que, nos anos trinta, predominava nos pomares do mundo. Apenas no Brasil, a tristeza aniquilou mais de nove milhões de plantas naquela época (FUNDECITRUS, 2008).

Após uma série de pesquisas, o problema da tristeza no Brasil foi parcialmente resolvido com duas técnicas: a utilização do limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* (L.) Osb.) como porta-enxerto tolerante e a pré-imunização de copas suscetíveis. Estas duas soluções técnicas permitiram que a citricultura nacional se reerguesse e conquistasse o atual patamar de importância econômica. Entretanto, estirpes extremamente virulentas do vírus no Brasil, como a Capão Bonito, continuaram afetando seriamente os pomares (MÜLLER; COSTA, 1991).

Recentemente, ocorreu o aparecimento de outra importante doença, possivelmente de origem viral chamada Morte Súbita dos Citros (MSC). Ainda não há estudo conclusivo, mas sabe-se que a MSC está ligada a um agente viral (MACHERRONI et al., 2005) e que pode se manifestar a partir de uma interação deste agente com estirpes do vírus da tristeza dos citros (CTV).

Diversas são as dificuldades encontradas no melhoramento tradicional dos citros, podendo-se enumerar: esterilidade do óvulo e do pólen, auto-incompatibilidade, poliembrião nucelar (apomixia), perda de vigor por endogamia, alta heterosigosidade e longo período de juvenilidade (MENDES, et al., 2002). Como alternativa, a biotecnologia tem proporcionado uma opção viável e rápida para a obtenção de variedades resistentes a pragas e doenças. A primeira planta transgênica de citros expressando genes de interesse agrônômico (gene da capa protéica do CTV) foi obtida em meados da década de noventa (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997). Diversos trabalhos foram desenvolvidos desde então tentando obter e explicar a resistência a vírus de plantas transgênicas, expressando seqüências de genomas virais. Em citros, têm-se observado tentativas de obter resistência por meio da expressão do gene da capa protéica do CTV e ativação de defesas mediadas por RNA. O domínio da técnica de obtenção de citros transgênicos resistentes a vírus poderá contribuir significativamente no combate a MSC e extirpes fortes de CTV além de ampliar a utilização de materiais genéticos existentes, atualmente incompatíveis.

Este trabalho avaliou a resistência de plantas transgênicas de citros ao CTV, por meio de provas de inoculação com o vírus. A caracterização das plantas transgênicas foi realizada por análises de GUS, PCR, *Southern blot*, RT-PCR, *northern blot*, e ELISA buscando possíveis explicações para a obtenção ou não da resistência ao vírus.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tristeza dos citros

A tristeza dos citros (CTV) é possivelmente a mais destrutiva doença dos citros, tendo aniquilado milhões de plantas enxertadas em laranja azeda na Argentina, Brasil, Califórnia, Flórida e Espanha (ROISTACHER, 1991). A doença continua a se espalhar em áreas como Israel e Venezuela, destruindo pomares de citros onde a laranja azeda é utilizada como porta-enxerto. O CTV é considerado a maior ameaça à indústria dos citros em nível mundial (BAR-JOSEPH; MARCUS; LEE, 1989). No Brasil, o CTV praticamente dizimou os pomares paulistas na década de 30, quando nove milhões de plantas cítricas sobre laranja azeda foram perdidas. Naquela época, existiam 11 milhões de pés de laranja (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997; FUNDECITRUS, 2008).

O agente etiológico da tristeza dos citros é um vírus, pertencente ao gênero *Closterovirus*, denominado *Citrus tristeza virus* (CTV). O vírus é constituído de partículas flexuosas em forma de bastão medindo aproximadamente 12×2000 nm, possuindo como material genético RNA de fita simples positivo (GARNSEY; LEE, 1989). O genoma do CTV possui 19.296 nucleotídeos e contém 12 *open reading frames* (ORFs), tendo em seu modo de expressão *translational frameshifting* e formação de pelo menos nove RNAs 3' subgenômicos co-terminais variando de 0,9 kb a 8,0 kb. Estima-se que pelo menos 17 proteínas sejam codificadas pelo genoma do CTV (HILF et al., 1995; KARASEV et al., 1995; MÜLLER et al., 2005). O genoma de RNA do CTV é encapsulado por duas proteínas: p25, responsável pela maior parte da partícula viral, e p27, que recobre os 75 a 85 nm finais (FEBRES et al., 1996; ZHOU et al., 2002). O vírus é originário da Ásia, tendo sido disseminado por pulgões e material vegetal propagativo infectado (GARNSEY; LEE, 1989). Danos consideráveis foram e são ainda ocasionados por isolados do vírus que induzem caneluras (*stem pitting*), enfezamento e frutos miúdos em copas intolerantes, mesmo quando essas são propagadas em porta-enxertos tolerantes (MÜLLER; COSTA, 1991).

A tristeza ocorre em três formas principais: o declínio rápido, caneluras ou *stem pitting* e o *seedling yellows* (ROISTACHER, 1991; FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997). A manifestação dos sintomas depende das condições do ambiente e de fatores inerentes à própria planta, como a idade, a capacidade de permitir a multiplicação do vírus e a tolerância dos tecidos,

principalmente do floema (FUNDECITRUS, 2008). O declínio rápido é causado pela interação entre CTV, copas suscetíveis e porta-enxertos intolerantes. Alguns dos sintomas do declínio rápido incluem o colapso acelerado da planta, folhagem verde pálida ou amarelada, desfolhamento, morte de brotos e ramos finos, pequenas folhas cloróticas similares aos sintomas de deficiência de nitrogênio, frutos pequenos e imprestáveis para comercialização, necrose dos tubos crivados e morte de raízes. Os sintomas de *stem pitting* estão associados à morte de regiões do câmbio afetando o crescimento radial. Os sintomas do *seedling yellows* estão possivelmente associados ao colapso geral do floema e da estrutura radicular (MORENO et al., 2008). A citopatologia do CTV em citros apresenta inclusões virais; cloroplastos agregados, inchados, com formato anormal e, às vezes, apresentando corpos eletrodensos; mitocôndrias agregadas e mostrando formação de vesículas principalmente perto de inclusões virais; núcleos condensados apresentando numerosas invaginações; acúmulo de vesículas electron-lúcidas, acúmulo de lipídeos e aumento do número de vesículas autofágicas (ZHOU et al., 2002).

As diferentes variedades de citros podem ser classificadas em relação ao CTV como: suscetíveis, resistentes, tolerantes e intolerantes. As variedades suscetíveis permitem a multiplicação do vírus em altas concentrações, contrariamente às variedades resistentes que não permitem ou permitem muito pouco a multiplicação viral. Na presença do vírus, as plantas cítricas tolerantes não manifestam sintomas, já as plantas intolerantes sim. Em pé franco, os sintomas causados pelo CTV só se manifestam quando este é suscetível e intolerante, como a lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) e alguns pomelos. Em plantas enxertadas, os sintomas são expressos quando o porta-enxerto for intolerante e a copa suscetível, como laranjas doces e tangerinas enxertadas sobre laranja azeda, ou quando a copa for suscetível e intolerante, como a laranja ‘Pêra’ e certos pomelos (FUNDECITRUS, 2008).

Desde o século XIX, a laranja azeda tem sido o porta-enxerto mais utilizado devido à sua excelente performance agrônômica e resistência ao fungo *Phytophthora* sp., causador da gomose ou podridão do pé (POMPEU JUNIOR, 2005). Entretanto, a intolerância ao CTV tem levado à sua substituição por porta-enxertos com características agrônômicas inferiores, porém tolerantes a esta virose (OLIVARES-FUSTER et al., 2003).

O controle do CTV no Brasil se deu pela substituição total dos porta-enxertos intolerantes por tolerantes, além da utilização da pré-imunização como estratégia para diminuir o efeito do vírus em copas de pomelos, limas ácidas e laranjas doces, que mesmo em porta-enxertos

tolerantes apresentavam sintomas (MÜLLER; COSTA, 1991). A substituição da laranja azeda pelo limão ‘Cravo’, está relacionada à tolerância deste cultivar à presença e à multiplicação do vírus em seu tecido floemático. Entretanto, vale ressaltar que a laranja azeda é um porta-enxerto com qualidades agrônomicas superiores no que tange a qualidade dos frutos (POMPEU JUNIOR, 2005).

A pré-imunização consiste em inocular estirpes de vírus fracas, mas de rápida replicação, em copas suscetíveis. Esta técnica protege a planta evitando que estirpes fortes causadoras da doença se estabeleçam (MÜLLER; REZENDE, 2004). As bases moleculares da pré-imunização ainda não foram esclarecidas, embora diversas hipóteses tenham sido levantadas. Até a década de 1970, as idéias mais convincentes envolviam a formação de anticorpos, exaustão de metabólitos, limitação de sítios de replicação viral e adsorção por componentes celulares específicos. Com o advento da biologia molecular, novas propostas de funcionamento da pré-imunização surgiram. Atualmente, as duas hipóteses mais aceitas são o sequestro de moléculas positivas de RNA por moléculas negativas de RNA do vírus mais fraco e interferência da capa protéica viral fraca em excesso no citoplasma (PENNAZIO; ROGGERO; CONTI, 2001).

Acredita-se que o *Toxoptera citricida* Kirkaldy ou pulgão preto, principal e mais eficiente vetor do CTV, foi introduzido acidentalmente no Brasil durante a década de 1920, quando a citricultura passava por um período de expansão importando materiais da Austrália e da África do Sul (ROCHA-PENÑA et al., 1995). A primeira associação entre o CTV e o *T. citricida* foi feita no Brasil, assim como a determinação da forma de transmissão semi-persistente característica deste pulgão (MENEHINI, 1946; MENEHINI, 1948; COSTA; GRANT, 1951). Entende-se por transmissão semi-persistente aquela que requer minutos ou horas para a aquisição do vírus pelo vetor e em que o tempo de retenção no mesmo dura de algumas horas a alguns dias (NG; FALK, 2006). Após a aquisição do CTV, o pulgão preto consegue transmitir o vírus por, pelo menos, 24 horas estando em jejum (COSTA; GRANT, 1951). Tempos de aquisição e inoculação diversos, entre trinta minutos ou apenas alguns segundos, têm sido relatados para o *T. citricida* (HERRON et al., 2006). Outros pulgões comuns aos citros também são transmissores do CTV incluindo *Aphis gossypii* Glover, *A. spiraecola* Patch e o *T. aurantii* Boyer de Fonscolombe. Entretanto, estes são muito menos eficientes na transmissão do vírus quando comparados com o *T. citricida* (MORENO et al., 2008). A transmissão de CTV em citros por meio de um único pulgão é conhecida para o *T. citricida* (BRLANSKY et al., 2003). Historicamente, a ocorrência do pulgão

preto em regiões produtoras tem sido associada à rápida disseminação da tristeza dos citros (MICHAUD, 1998).

2.2 Morte súbita dos citros (MSC)

Em 1999, foi identificada uma nova doença dos citros no Brasil que causava rápido declínio em copas enxertadas em limão ‘Cravo’ ou limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* V. Tem. & Pasq.), tendo progredido rapidamente, atingindo um milhão de plantas até o ano de 2003 (MACCHERONI et al., 2005). No início, a doença avançou rapidamente a partir do foco de origem, no sudoeste de Minas Gerais em direção ao norte do Estado de São Paulo (ROMÁN et al., 2004).

Plantas sintomáticas apresentam coloração verde pálida da copa, diferentes níveis de desfolhamento, ausência de novos brotos e morte do sistema radicular, além de uma marcante mancha amarela em tecidos floemáticos de limão ‘Cravo’ e limão ‘Volkameriano’, especialmente na união da copa com o porta-enxerto. A morte das plantas infectadas acontece de 1 a 12 meses após o aparecimento dos sintomas, dependendo da estação do ano e variedade dos citros. A sintomatologia está estreitamente relacionada à fisiologia da planta, aumentando em condições de estresse hídrico (MACCHERONI et al., 2005).

O padrão espacial e temporal de disseminação da MSC é semelhante ao do CTV (BASSANEZI et al., 2003). Este fato tem levado os pesquisadores a especular sobre uma possível relação entre a MSC e o CTV. Entretanto ainda não existem trabalhos conclusivos.

Maccheroni et al. (2005) sugerem que a MSC pode estar associada à presença do *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV), excluindo a possibilidade da MSC ser causada por uma variante do CTV. Entretanto alguns pesquisadores acreditam que a interação entre múltiplos vírus pode ser uma explicação plausível para o aparecimento da doença.

2.3 Transformação genética de plantas

O melhoramento clássico de plantas enfrenta uma série de problemas como a redução do *pool* gênico, a ligação gênica e a incompatibilidade sexual, além do tempo necessário para se transferirem caracteres desejáveis para cultivares de interesse que podem durar décadas em espécies bienais e em perenes ou em espécies altamente heterozigotas (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998). A transformação genética de plantas perenes tropicais é uma alternativa viável para acelerar programas de melhoramento, já que esta técnica consegue modificar características hortícolas específicas sem alterar o fenótipo original (GOMEZ-LIM; LITZ, 2004). A obtenção de plantas transgênicas requer técnicas para a integração estável de seqüências de DNA recombinante funcional no genoma hospedeiro. Além da capacidade de integrar DNA exógeno, a regeneração de células transgênicas em plantas maduras é um dos grandes desafios da biotecnologia.

As técnicas de transformação genética em plantas podem ser separadas em direta e indireta (SHARMA; BHATNAGAR-MATHUR; THORPE, 2005). Na transformação direta, utiliza-se algum fator externo, físico ou químico, para a transferência do DNA de interesse para as células alvo (KOHLI et al., 2003). Algumas das modalidades de transformação direta são: microinjeção (CROSSWAY et al., 1986), transformação de protoplastos (JONGSMAN et al., 1987), biobalística (SANFORD et al., 1987), eletroporação (FROMM; TAYLOR; WALBOT, 1985) e transformação física utilizando filamentos de carboneto de silício (KAEPLER et al., 1992).

A transformação indireta implica no uso de *Agrobacterium* como vetor do DNA exógeno a ser inserido na planta alvo (POTRYKUS, 1991; NEWELL, 2000). Esta característica tem sido explorada para a inserção de genes de interesse em plantas cultivadas e na pesquisa básica da biologia de plantas (GELVIN, 2003).

As agrobactérias são microorganismos tipicamente de solo, baciliformes, gram negativas, usualmente aeróbicas e possuem de um a seis flagelos. Estas bactérias são causadoras da doença galha da coroa que acomete diversas espécies vegetais gerando tumores ou galhas na junção entre o caule e as raízes (BRASILEIRO, 1998; ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003). Esta bactéria fitopatogênica possui a capacidade de transferir fragmentos de DNA, ou T-DNA, para o genoma de determinadas plantas alvo (GELVIN, 2000). O T-DNA é flanqueado por

seqüências repetidas de 25 pares de bases altamente homólogas (YADAV et al., 1982), denominadas de borda esquerda e borda direita, e que demarcam o DNA a ser transferido servindo de sítios de ligação para proteínas envolvidas no processo (GELVIN, 2003). Estes fragmentos de DNA podem ser transferidos graças à presença de um plasmídeo indutor de tumor (Ti) que contém os genes *vir* co-responsáveis pelo processo de transferência do T-DNA (GELVIN, 2003; SHARMA; BHATNAGAR-MATHUR; THORPE, 2005). Os genes *vir* são ativados por compostos fenólicos liberados pela planta após ferimentos (BOLTON; NESTER; GORDON, 1986). Estes compostos fenólicos também são fundamentais para o processo de localização (quimiotactismo) e adesão da *Agrobacterium* às células vegetais. A expressão dos genes *vir* gera uma série de proteínas que formam um complexo núcleo protéico de transporte com uma fita simples de DNA oriunda de seqüências presentes no plasmídeo Ti ou em um plasmídeo binário (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003; TZFIRA; CITOVSKY, 2006). Este complexo termina por transportar e inserir o DNA bacteriano no genoma vegetal. O T-DNA tipo selvagem possui oncogenes e genes da síntese de opinas que, quando transferidos, deflagram o crescimento do tecido transformado e a produção de opinas, que por sua vez, servem quase que exclusivamente de fonte de nitrogênio para a *Agrobacterium* (TZFIRA; CITOVSKY, 2006). Os tumores da doença galha da coroa são fruto do desbalanço hormonal entre auxinas e citocininas no tecido vegetal transformado que, por sua vez, leva ao crescimento celular desordenado.

Para a transformação genética indireta, utiliza-se estirpes de *Agrobacterium* desarmadas, ou seja, bactérias que tiveram seus oncogenes e genes da síntese de opinas retirados. Desta forma, é possível transferir seqüências de interesse presentes em outro plasmídeo (binário) menor desde que esta seja flanqueada pelas bordas esquerda e direita reconhecidas por proteínas *vir* como o trecho a ser transferido (KLEE; HORSCH; ROGERS, 1987).

2.4 Transformação genética de citros

O melhoramento convencional de laranja doce tem sido dificultado pela poliembrião nucelar, altos níveis de heterozigose e longa juvenildade (GROSSER; GMITTER, 1990). A transformação genética pode representar uma ferramenta adicional ao melhoramento de

cultivares de citros permitindo a introdução de características específicas, mantendo as qualidades agronômicas já existentes (YANG et al., 2000).

O primeiro relato sobre a transformação genética de citros trata da transformação de protoplastos por meio de polietileno glicol para a inserção direta de DNA (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989). A técnica de transformação de protoplastos por eletroporação também foi utilizada nos primeiros experimentos de transformação genética em citros (HIDAKA; OMURA, 1993; KOBAYASHI et al., 1994). Entretanto, a partir de 1990, o uso de *Agrobacterium tumefaciens* passa a ser mais comum (HIDAKA et al., 1990; MOORE et al., 1992). Relatos de transformação genética em citros têm se baseado em metodologias mediadas pela infecção de *Agrobacterium* em segmentos caulinares, utilização do GUS como gene repórter e seleção de tecido transgênico pela resistência a antibióticos (FLEMING et al., 2000). Em sua maioria, as técnicas recentes de transformação de citros envolvem a utilização de epicótilos cultivados *in vitro* ou segmentos internodais de plantas jovens como explantes (PEÑA et al., 1995; MENDES et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003). Após organogênese e formação dos brotos, estes são microenxertados em plantulas *in vitro* para regeneração de plantas e aclimatização em casa de vegetação (PEÑA et al., 1995; AZEVEDO et al., 2006).

Diversos fatores podem afetar a eficiência de transformação de citros, tais como a estirpe de *Agrobacterium* utilizada (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997), o tipo de explante (MOORE et al., 1992; MENDES et al., 2002), o genótipo utilizado e as condições de incubação no co-cultivo (PEÑA et al., 1997; MENDES et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003).

Plantas cítricas transgênicas já foram obtidas para várias características agronômicas de interesse como tolerância a salinidade (CERVERA et al., 2000), resistência a afídeos (YANG et al., 2000), tentativa de melhoria da qualidade dos frutos visando a indústria (GUO et al., 2005), diminuição do período de juvenilidade (PEÑA et al., 2001), além de diversas tentativas de obtenção de resistência a doenças fúngicas, bacterianas e virais (AZEVEDO et al., 2006; BOSCARIOL et al., 2006; MITANI et al., 2006; FEBRES; LEE; MOORE, 2008).

Na transformação genética por *Agrobacterium*, a utilização de genes de resistência a antibióticos para a seleção de crescimento bacteriano e tecidos transformados, pode afetar o grau de aceitação de variedades transgênicas em testes de campo e no mercado, além do grau de sensibilidade à infecção via *Agrobacterium* ser variável em variedades economicamente importantes de citros. Devido a estas limitações, inerentes à transformação por *Agrobacterium*,

atualmente, a transformação genética de protoplastos em citros tem ressurgido como uma alternativa, já que esta técnica pode superar alguns destes problemas (FLEMING et al., 2003; OLIVARES-FUSTER et al., 2003).

2.5 Expressão de transgenes

O controle da expressão de transgenes tem sido um grande desafio nos programas de melhoramento que utilizam ferramentas biotecnológicas recentemente desenvolvidas. A obtenção de plantas contendo transgenes de expressão estável tem sido um processo variável e ao acaso. Alguns fatores podem ser identificados como causa desta variabilidade, como o número de inserções de transgenes, silenciamento mediado por RNA, variação somaclonal, posição relativa da inserção e as diferentes seqüências regulatórias utilizadas nas construções (BUTAYE et al., 2005).

Durante o processo de inserção do T-DNA, eventos variados de interferência podem ocorrer ocasionando inversões, duplicações, truncamentos e múltiplas cópias invertidas do transgene, afetando diretamente o perfil de expressão do mesmo (KOHLLI et al., 2003). Inicialmente, pode-se considerar que, quanto maior for o número de inserções de um transgene, maior será o potencial de expressão do mesmo (BUTAYE et al., 2005). Entretanto, tem-se observado que um número elevado de cópias de um transgene pode resultar em formas de silenciamento ou não expressão deste transgene (JORGENSEN et al., 1996; WANG; WATERHOUSE, 2000).

A obtenção de linhagens transgênicas contendo um número reduzido de inserções (<10) é mais comum na transformação via *Agrobacterium* do que na transformação direta (CHENG et al., 1997; GELVIN, 2003). Na transformação indireta via *Agrobacterium*, a presença de uma menor quantidade de DNA envolvido no processo e a proteção do T-DNA por proteínas *vir*, são possíveis causas de uma maior estabilidade e redução do número de inserções de DNA exógeno (KOHLLI et al., 2003).

A posição relativa da inserção de transgenes é considerada um fator de variabilidade na expressão (MATZKE; MATZKE, 1998; KUMAR; FLADUNG, 2001), apesar de alguns trabalhos demonstrarem que este fator talvez não seja tão significativo como pensado

inicialmente. Nagaya et al. (2005) mostraram que o efeito relativo da posição de inserção na expressão de transgenes não foi significativo em *Arabidopsis thaliana*.

2.6 Silenciamento gênico

O silenciamento gênico é definido como um processo molecular envolvido na supressão da expressão de genes específicos. Possivelmente, evoluiu como uma defesa genética contra vírus e ácidos nucléicos invasores (BRIGNETI et al., 1998; VOINNET; LEDERER; BAULCOMBE, 2000; WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001; WASSENEGGER, 2002). As descobertas sobre silenciamento gênico em plantas começaram quando uma equipe de pesquisadores tentava produzir petúnias transgênicas com coloração mais intensa que o normal, inserindo um gene que, em tese, aumentaria a produção de antocianinas (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). Ao invés de obter o resultado esperado, uma coloração mais intensa das flores, a equipe conseguiu plantas de coloração variegada e descoloridas. Aparentemente, o transgene não se expressava e acabou por também “silenciar” um gene endógeno com homologia ao transgene. O fenômeno foi nomeado de “co-supressão” e, ao verificar instabilidade na transmissão das características obtidas, foi lançada a hipótese do fato estar relacionado à regulação por RNA (GURA, 2000).

Outros trabalhos mostraram resultados parecidos com os da “co-supressão”. O fenômeno foi nomeado de *quelling* em fungos (COGONI; MACINO, 1997; ROMANO; MACINO, 1992) e “interferência por RNA” em vermes e insetos (FIRE et al., 1998). As pesquisas indicaram que a formação de RNA fita dupla (dsRNA), uma forma de RNA que não ocorre naturalmente em células, estava relacionada com o silenciamento de genes homólogos ao dsRNA (FIRE et al., 1998). Isto também sugeria que, possivelmente, tratava-se de um mecanismo de defesa contra ácidos nucléicos invasores como vírus e transposons (WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001). Trabalhos com plantas transgênicas possuindo seqüências de proteínas virais demonstraram que aquelas que continham os transgenes “silenciados” eram as que expressavam maior resistência à infecção por vírus (ANGELL; BAULCOMBE, 1997). Outros trabalhos demonstraram que vários vírus de plantas possuem proteínas que interferem no silenciamento gênico relacionando o fenômeno como um processo co-evolutivo de ataque e defesa entre vírus e plantas (LU et al., 2004). Também foi descoberto que plantas, fungos e vermes possuem genes endógenos que atuam diretamente nas rotas de silenciamento gênico, sendo que mutantes para

estes genes são incapazes de deflagrar os mecanismos de silenciamento (WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001).

As principais rotas de silenciamento gênico identificadas em plantas são: silenciamento gênico pós-transcricional ou RNA de interferência (RNAi) (VAUCHERET; BÉCLIN; FAGARD, 2001), silenciamento gênico transcricional (VAUCHERET; FAGARD, 2001) e silenciamento por microRNA (BARTEL, 2004). Todas estas rotas têm um importante papel em nível celular, afetando a diferenciação, expressão gênica (BARTEL, 2004), e proteção contra vírus e transposons (WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001). As rotas biológicas envolvidas no silenciamento gênico estão presentes na maioria dos organismos eucarióticos (HANNON, 2002). Como todas as rotas de silenciamento conhecidas envolvem a atividade regulatória de RNA no controle da expressão gênica, o termo silenciamento por RNA é equivalente ao termo silenciamento gênico (GALUN, 2005). Estudos genéticos e bioquímicos têm confirmado que os mecanismos de RNAi, co-supressão e microRNA são similares. O estudo de fenômenos similares em diferentes organismos (*Caenorhabditis elegans*, *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster*, *A. thaliana* e *Petunia x hybrida*) permitiu a criação de modelos para formas de silenciamento gênico diferentes, mas que possuem algum ponto de interação (SOUZA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2007).

Existem diversas aplicações potenciais do silenciamento gênico em plantas. Inicialmente, o foco principal da pesquisa foi a obtenção de plantas resistentes a vírus por meio de transformação genética com seqüências homólogas aos vírus (LINDBO; DOUGHERTY, 1992; ANGELL; BAULCOMBE, 1997; GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997; RAVELONANDRO et al., 2000; SCORZA et al., 2001). O silenciamento gênico também já foi utilizado para a modificação de características nutricionais em plantas, como a redução dos níveis de cafeína em café (OGITA et al., 2003) e o aumento no valor alimentar de proteínas de milho e tomate (SEGAL; SONG; MESSING, 2003; DAVULURI et al., 2005). Pesquisas sobre a produção e qualidade de florestas plantadas têm incluído o silenciamento de genes da síntese de lignina. Por outro lado, em fruteiras, tem-se buscado via silenciamento gênico, obter plantas resistentes a doenças bacterianas e virais, assim como a superação da auto-incompatibilidade (BROOHAERTS; KEULEMANS; VAN NERUM, 2004; SOUZA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2007). O estudo da função de genes também tem utilizado das técnicas de silenciamento gênico (ROBERTSON, 2004).

De acordo com o modelo atual, a rota bioquímica do silenciamento por RNAi tem início com a presença de RNA de fita dupla no citoplasma (WATERHOUSE, GRAHAM; WANG, 1998; MEISTER; TUSCHL, 2004; LODISH et al., 2005). Esta molécula é reconhecida pela enzima DICER, membro da família das RNAases III que cliva especificamente RNAs de fita dupla e possui seqüência conservada em vermes, plantas, fungos e mamíferos (BERNSTEIN et al., 2001). Após o reconhecimento pela DICER, a fita dupla de RNA é clivada em pequenos fragmentos de 21 a 28 nucleotídeos, conhecidos como pequenos RNAs de interferência (siRNA) (HAMILTON; BAULCOMBE, 1999; BERNSTEIN et al., 2001; ELBASHIR; LENDECKEL; TUSCHL, 2001; MEISTER; TUSCHL, 2004; BAULCOMBE, 2004).

Após o processamento da molécula de RNA fita dupla pela DICER, os siRNA são arranjados nos complexos de silenciamento induzidos por RNA (RISC) (HAMMOND et al., 2000; NYKÄNEN; HALEY; ZAMORE, 2001). O complexo RISC é responsável pela identificação e degradação dos mRNAs alvo no ambiente celular (MARTINEZ; TUSCHL, 2004). Os siRNA complexados são utilizados como identificadores das moléculas de mRNA corretas a serem clivadas, conferindo a característica de especificidade do processo. A clivagem dos mRNA acontece no meio da região complementar dos siRNA (ELBASHIR; LENDECKEL; TUSCHL, 2001). Este processo de clivagem dos mRNA alvo impede a transmissão da mensagem completa para o aparato de tradução da célula, desta forma gerando o silenciamento do gene pela degradação dos mRNAs (TOLIA; JOSHUA-TOR, 2006).

O silenciamento por RNAi em plantas possui a capacidade de se distribuir de forma sistêmica nos tecidos vegetais (VOINNET et al., 1998). A natureza deste sinal sistêmico não está completamente clara. No entanto, pode-se concluir que deve haver um mecanismo de transmissão intercelular do sinal e uma forma de amplificação do mesmo (HANNON, 2002).

Outra forma de silenciamento gênico em plantas é realizada pelos microRNAs. Os microRNAs e os siRNAs possuem uma biogênese muito parecida e podem executar funções bioquímicas comuns. Portanto, estas duas classes de RNAs não podem ser diferenciadas quimicamente ou pelo seu mecanismo de ação (BARTEL, 2004). Entretanto, existem diferenças quanto à origem, conservação durante a evolução, e tipos de genes silenciados. Normalmente, os microRNAs estão envolvidos em processos endógenos de regulação da expressão gênica. Segundo Bartel e Bartel (2003): (1) microRNAs originam de loci genômicos distintos enquanto siRNA podem originar de mRNAs, transposons, vírus ou de DNA heterocromático; (2)

microRNAs são processados a partir de transcritos que formam estruturas de grampo, já os siRNAs são processados a partir de longos RNAs dupla fita ou “grampos” estendidos de RNA; (3) um único microRNA maduro é gerado de cada molécula grampo percussora enquanto uma grande quantidade de siRNAs diferentes é gerada de uma molécula percussora; (4) microRNAs possuem seqüências conservadas entre organismos relacionados, diferente dos siRNAs.

Após sua síntese, microRNAs maduros podem ser complexados ao RISC ou a complexos efetores de microRNAs (miRNP), o primeiro catalisa a clivagem do mRNA alvo e o segundo é responsável pela repressão traducional sem degradação (MARTINEZ; TUSCHL, 2004). Em plantas, os microRNA também realizam clivagem do mRNA ao invés de apenas repressão traducional sem degradação (RHOADES et al., 2002). Recentemente, foi desenvolvido um microRNA artificial contendo seqüências modificadas capaz de utilizar das rotas endógenas de regulação para interferir com RNA viral e conferir resistência a vírus em *A. thaliana* (NIU et al., 2006).

O silenciamento transcricional (TGS) também está associado às rotas de silenciamento gênico em plantas, e consiste em alterações químicas (metilação) e físicas (estrutura da cromatina) da estrutura do DNA genômico e alterações químicas das histonas presentes nos nucleossomos. Estas modificações podem alterar a capacidade de proteínas envolvidas no processo de transcrição se ligarem ao DNA genômico, afetando os níveis de transcrição de um determinado gene (YE; SIGNER; RIGS, 1996; WASSENEGGER; PÉLISSIER, 1998; KOOTER; MATZKE; MEYER, 1999; WASSENEGGER et al., 2000; WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001; ALBERTS et al., 2002; SOUZA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2007). Inicialmente, sugeriu-se que TGS e RNAi fossem fenômenos independentes. Entretanto, foi constatado que vírus e transgenes produtores de RNA dupla fita induziam tanto TGS quanto RNAi, relacionando estas duas rotas de silenciamento (VAUCHERET; FAGARD, 2001). O silenciamento gênico por RNA também já foi associado à metilação *de novo* em plantas (CHAN et al., 2004). Especula-se que o silenciamento transcricional guiado por siRNAs pode agir como uma defesa genômica suprimindo a ação de elementos genéticos móveis ou DNAs invasores (DAWE, 2003; SCHRAMKE; ALLSHIRE, 2003). Existe a possibilidade de um efeito combinado destas formas de silenciamento ocorrerem em plantas transgênicas.

2.7 Resistência a vírus em plantas transgênicas

Em 1985, Sanford e Johnston propuseram o conceito teórico da resistência derivada do patógeno (RDP), postulando que a resistência a certo patógeno pode ser obtida de seu próprio material genético. A transformação genética de plantas com diferentes partes de um genoma viral pode conferir resistência ao vírus da qual a seqüência foi derivada ou a vírus relacionados (SANFORD; JOHNSTON, 1985). Algumas abordagens para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus são a expressão de proteínas virais como a capa protéica (POWELL-ABEL et al., 1986; FITCH et al., 1992) e o silenciamento gênico pós-transcricional ou RNA de interferência (LINDBO; DOUGHERTY, 1992; SOUZA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2007).

A expressão do gene da capa protéica viral foi uma das primeiras abordagens utilizadas para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus (POWELL-ABEL et al., 1986). Diversas espécies vegetais já foram transformadas com sucesso para a obtenção de resistência a vírus. Entretanto, ainda não está claro o mecanismo responsável por esta resistência (PRINS et al., 2008). Algumas hipóteses relacionam a capacidade de ligação da capa protéica ao RNA viral durante fases iniciais da infecção como uma das prováveis explicações para a resistência. Outra característica notada nestes modelos é a redução do movimento sistêmico da infecção viral em plantas transgênicas expressando a capa protéica. Estas constatações mostram uma ligação entre a capa protéica e os mecanismos de replicação e translocação dos vírus (BEACHY; LOESCH-FRIES; TUMER, 1990). Outras constatações relacionam as interações moleculares entre subunidades da capa protéica como fonte da resistência, já que isto poderia implicar em uma desestabilização da partícula viral (BENDAHMANE et al., 1997).

Um dos casos mais bem documentados referente a este assunto é a resistência ao *Papaya ringspot virus* em mamoeiro transgênico (FITCH et al., 1992) que permitiu o restabelecimento da cultura no Havaí. A maioria dos casos de resistência pela expressão da capa protéica podem estar relacionados a alguma forma de silenciamento por RNAi (PRINS et al., 2008).

Ao tentar expressar o gene da capa protéica do *Plum pox virus* (PPV) em ameixeiras, Scorza et al. (2001) obtiveram linhagens transgênicas silenciadas e resistentes ao vírus. As plantas resistentes apresentaram sinais de silenciamento pós-transcricional como altos níveis de expressão do transgene no núcleo da célula, baixos níveis de mRNA transgênico no citoplasma, uma complexa inserção de transgenes com cópias aberrantes e metilação do transgene.

Posteriormente, também foi obtida resistência ao PPV via expressão de transgenes produtores de RNA fita dupla (*hairpin*) em ameixeiras (DI NICOLA-NEGRI et al., 2005; ZHANG et al., 2006).

Segundo Febres et al. (2003) uma possível solução de longo prazo para o problema da tristeza dos citros, seria a produção de variedades de citros resistentes ou imunes ao CTV. Em citros, o primeiro relato de plantas transformadas visando a resistência a vírus é de Gutiérrez-E; Luth e Moore (1997), em que os autores obtiveram plantas transformadas com o gene da capa protéica do CTV. Desde então, vários trabalhos vêm sendo realizados para a obtenção de plantas cítricas resistentes ao CTV pela expressão de seqüências do genoma viral (YANG et al., 2000; DOMÍNGUEZ et al., 2000; FEBRES et al., 2002; DOMÍNGUEZ et al., 2002b; OLIVARES-FUSTER et al., 2003; FAGOAGA et al., 2006; FEBRES; LEE; MOORE, 2008).

A avaliação de resistência ao CTV em plantas transgênicas expressando seqüências do genoma deste vírus tem apresentado resultados inconsistentes. Tentando obter RDP contra o CTV, Domínguez et al. (2002b) obtiveram variação de 10 a 30 % no número de plantas resistentes em clones de cada linhagem transgênica. Esta variação da resistência entre clones transgênicos tem se mostrado recorrente em citros. Fagoaga et al. (2006) investigando resistência ao CTV em plantas expressando o gene p23 do CTV, constataram que clones de uma mesma linhagem transgênica apresentaram diferentes respostas à inoculação com o vírus, sendo que alguns indicaram susceptibilidade e outros, imunidade.

Com relação aos mecanismos utilizados na tentativa de conferir resistência ao CTV em citros, diferentes abordagens têm sido utilizadas. Domínguez et al. (2002b) relatam que plantas transformadas com o gene da capa protéica (CP) do CTV apresentando resistência ao vírus acumularam níveis da proteína do capsídio viral, exceto por uma das variedades resistentes que não acumulou a proteína da CP, provavelmente expressando a resistência por meio de outro mecanismo, como resistência mediada por RNA.

Diferentemente, Fagoaga et al. (2006) descreveram resistência ao CTV por silenciamento gênico pós-transcricional em plantas transgênicas silenciadas para o gene da proteína p23 do CTV. Recentemente, foi relatada resistência ao CTV em plantas de pomelo (FEBRES; LEE; MOORE, 2008). De forma não prevista, a planta mais resistente apresentou silenciamento transcricional do transgene. O relato da ausência de siRNAs homólogos ao transgene está de acordo com a concomitante ausência do mRNA transgênico verificada. Além disso, esta planta não apresentou RNA viral, o que sugere que o inóculo inicial de CTV foi completamente

destruído, talvez por efeito do transgene. Estes dados são inesperados e talvez signifiquem susceptibilidade a uma nova infecção, já que não existem mais siRNAs no citoplasma, o transgenes esta metilado e, conseqüentemente, as células já não possuem complexos RISC homólogos ao CTV.

Em outro trabalho, plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana* transformadas com seqüências do CTV apresentaram resistência ao *Grapevine virus A* recombinante contendo seqüências do CTV. Este resultado mostrou que as rotas de RNAi funcionaram em tabaco transgênico com seqüências do CTV. Entretanto, ao avaliar plantas transgênicas de citros (*C. macrophylla*) contendo os mesmos transgenes, estas não demonstraram resistência quando desafiadas com CTV (tipo selvagem). Este experimento demonstra que seqüências do CTV são suscetíveis ao silenciamento por RNAi e que a partícula viral completa é fundamental na superação das defesas da planta (BATUMAN; MAWASSI; BAR-JOSEPH, 2006).

Outro relato de resistência por RNAi a seqüências do CTV em tabaco mostra que determinadas seqüências do vírus produzem resistência e outras não. Plantas transgênicas contendo *hairpins* heterólogos de seqüências do CTV apresentaram resistência aos *Potato virus X* (PVX) recombinantes com seqüências do CTV quando estes vetores virais continham as seguintes seqüências: proteína p20, região 3' não traduzida, proteína p23 e seqüências heterólogas destas. Construções do PVX contendo seqüências da CP do CTV tiveram sucesso na infecção de plantas de tabaco. De forma inesperada as seqüências da CP não funcionaram para a obtenção da resistência (ROY et al., 2006).

Plantas de tabaco transformadas com cDNA genômico de uma uma estirpe fraca de *Tabacco mosaic virus* resistiram a infecção por estirpes fortes do mesmo vírus. Os autores deste trabalho tentaram simular os efeitos da pré-imunização, mostrando que, possivelmente, os mecanismos moleculares da pré-imunização são parecidos com os dos silenciamento gênico por RNAi (YAMAYA et al., 1988).

Apesar das possibilidades do uso do silenciamento gênico para proteção contra vírus, existem limitações da técnica. Durante a co-evolução com as plantas, os vírus desenvolveram medidas para neutralizar este mecanismo de defesa vegetal. Para tal, tantos os vírus de RNA quanto os de DNA, possuem proteínas específicas para interferir nas rotas moleculares do silenciamento gênico (MOISSIARD; VOINNET, 2004). Sugere-se que um dos mecanismos preferenciais de ação destas proteínas é a capacidade de se ligar e sequestrar os siRNA e/ou

RNAs dupla fita, desta forma interferindo nas rotas de silenciamento (ROTH; PRUSS; VANCE, 2004; MERAI et al., 2006). No caso do CTV, pelo menos três proteínas com efeito anti-RNAi são conhecidas. Recentemente, as proteínas p20, p23 e a capa protéica (p25) foram implicadas na interferência do silenciamento gênico. Aparentemente, as proteínas p20 e p23 possuem ação intracelular e as proteínas p20 e p25 teriam ação intercelular nas rotas de RNAi (LU et al., 2004). Proteínas supressoras da interferência por RNA podem afetar padrões de expressão gênica nas plantas hospedeiras, levando a anormalidades no desenvolvimento e possivelmente a sintomas virais (VOINNET, 2005). Em citros, isso foi demonstrado pela expressão da proteína p23 em lima ácida ‘Galego’, gerando sintomas similares à infecção por CTV (FAGOAGA et al., 2005).

Na avaliação de plantas transgênicas de citros, duas formas de inoculação tem sido utilizadas nos experimentos de desafio com CTV: enxertia de tecido infectado e inoculação por pulgões. Segundo Roistacher (1991), um bom material de inoculação deve conter floema e estar em contato adequado com a planta receptora já que o CTV é limitado a este tecido. Este mesmo autor considera pedaços de casca, ou borbulhas cegas, como um bom material de inoculação. A utilização de pedaços de casca enxertados no porta-enxerto suscetível ou nas copas transgênicas tem sido o método de inoculação mais utilizado (DOMÍNGUEZ et al., 2002b; BATUMAN; MAWASSI; BAR-JOSEPH, 2006; FAGOAGA et al., 2006).

Na transmissão de CTV por pulgões tenta-se simular condições mais próximas do que ocorre naturalmente nos cultivos comerciais. Nestes trabalhos, normalmente o vetor utilizado tem sido o *A. gossypii* Glover. Devido a uma menor eficiência de transmissão deste pulgão, grandes quantidades de indivíduos (400 afídeos por planta) têm sido utilizadas. O tempo de permanência dos pulgões nas plantas tem sido ao redor de quatro dias (DOMÍNGUEZ et al., 2002b; FAGOAGA et al., 2006).

Aragão e Ribeiro (1998) relatam que, utilizando a técnica ELISA, é possível a detecção rápida de várias proteínas, permitindo inclusive a detecção de uma proteína codificada por um gene exógeno em uma planta transgênica. Roistacher (1991) afirma que a utilização de técnicas ELISA para a detecção do CTV são métodos testados e estabelecidos com eficiência e sucesso.

Compreender totalmente os mecanismos envolvidos na obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus é um grande desafio a ser vencido para obtenção de variedades de citros resistentes à tristeza e outras moléstias virais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Os experimentos foram conduzidos em casas de vegetação do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, São Paulo.

O material vegetal utilizado no trabalho foi constituído de 30 linhagens transgênicas de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (10 de cada construção gênica) mais os controles de laranja ‘Hamlin’ (*C. sinensis* (L.) Osb.) e lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) tipo selvagem. O material transgênico utilizado foi obtido pelos grupos de pesquisa em biotecnologia da ESALQ e do CENA, utilizando construções cedidas pelo Dr. Ricardo Harakava, do Instituto Biológico de São Paulo (Figura 1). As plantas transgênicas foram obtidas por transformação via *Agrobacterium* de epicótilos de laranja ‘Hamlin’, inoculados por 20 minutos, co-cultivados por três dias e selecionados em meio de cultura contendo canamicina (SCHINOR, 2006).

Os controles, positivos e negativos, para inoculação de CTV foram laranja ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’ não transgênicos, livres de CTV, doados pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira. Os controles positivos foram submetidos às mesmas técnicas de inoculação de CTV que os tratamentos transgênicos, e os controles negativos não sofreram inoculação.

A construção gênica intitulada “região conservada antisenso do CTV” (SC) possui uma seqüência conservada da região 3’ e parte do gene p23 do genoma do CTV, dirigido pelo promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e o terminador NOS. A construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP) contém o gene da capa protéica (p25) do genoma do CTV, dirigido pelo promotor 35S do CaMV e o terminador NOS. A construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS) possui as seqüências senso e antisenso do gene da capa protéica do CTV separadas por um intron, dirigidas pelo promotor 35S do CaMV e o terminador NOS. As seqüências de nucleotídeos utilizadas nos genes de interesse foram obtidas a partir de RNA viral isolado de plantas doentes, no Estado de São Paulo, com sintomas de Morte Súbita dos Citros. Além dos genes de interesse descritos acima, as construções gênicas contêm um gene de seleção e um gene repórter. O gene de seleção utilizado foi o *nptII*, que confere resistência ao antibiótico

canamicina, dirigido pelo promotor 35S do CaMV e terminador 35S-T. O gene GUS foi utilizado como gene repórter, dirigido pelo promotor 35S do CaMV e terminador NOS.

As matrizes, ou linhagens transgênicas, foram denominadas CP (1 a 10), SC (1 a 10) e DS (1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 e 12). Estas plantas originaram de material juvenil livre de CTV. As matrizes foram conduzidas em estufa separada e livre de pulgões.

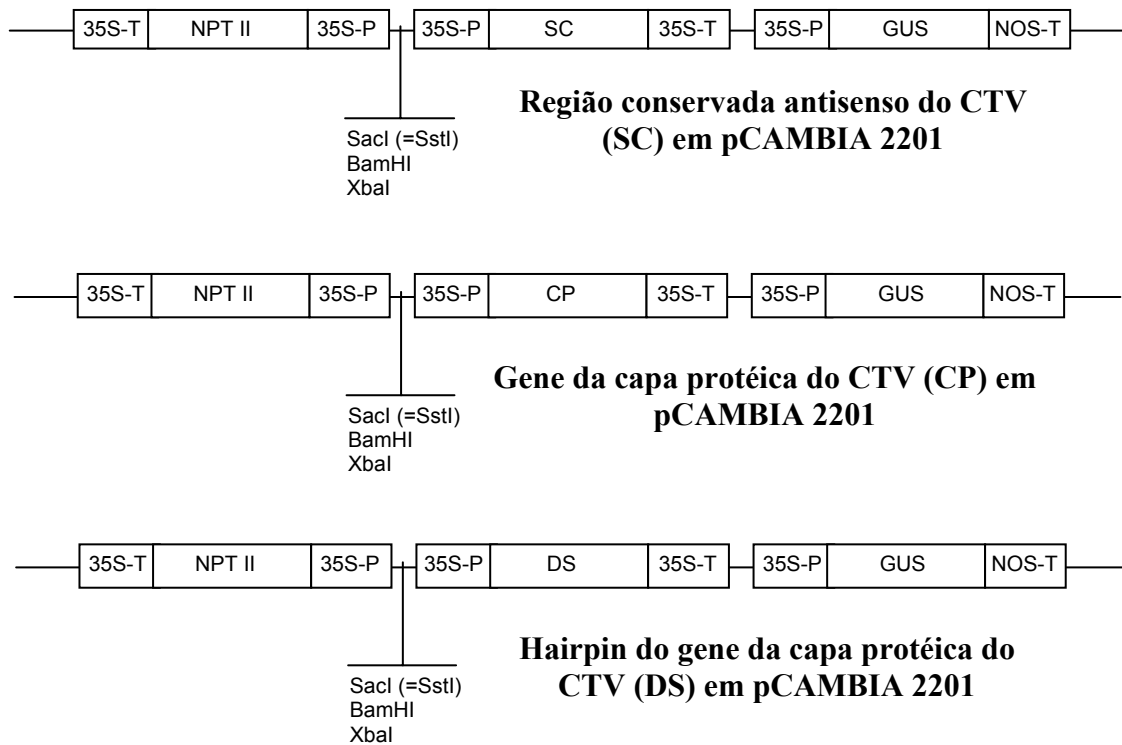


Figura 1 - Construções gênicas utilizadas na transformação genética de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Os sítios de restrição usados na análise de *Southern blot* estão indicados pelo traço perpendicular. CP = gene da capa protéica (p25) do genoma do CTV; SC = seqüência conservada da região 3’ do genoma do CTV e parte do gene p23 do CTV; DS = seqüências senso e antisense do gene da capa protéica do CTV separadas por um intron; 35S-T = terminador 35S do CaMV; NPT II = gene de resistência à canamicina; 35S-P = promotor 35S do CaMV; GUS = gene da β -Glucuronidase; NOS-T = terminador NOS

Dois cultivares porta-enxertos foram utilizados nos experimentos: limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* (L.) Osb.) e laranja azeda (*Citrus aurantium* L.). As plantas de limão ‘Cravo’ em ponto de enxertia (0,5 a 1,0 cm de diâmetro) foram obtidas por doações ou compras em viveiros comerciais certificados de mudas cítricas, e foram conduzidos em sacos plásticos de 4,0 litros

contendo fibra de coco. As adubações sólidas utilizaram Osmocote 22-04-08 (2,5 kg/m³/6 meses). As adubações líquidas foram feitas com Nitrato de Cálcio (1 g.L⁻¹) + Tenso Iron Hydro (0,05 g.L⁻¹), PETERS (1 g.L⁻¹) e Kristalon HydroTM (0,84 g.L⁻¹) utilizando 250 mL de solução por saco a cada dez dias aproximadamente.

As plantas de laranja azeda foram produzidas a partir de sementes da variedade ‘São Paulo’, obtidas da Empresa Citrograf. O plantio foi realizado usando três sementes descascadas em tubetes de 250 cm³ preenchidos com substrato Plantmax CitrusTM e adubados com Osmocote 22-04-08 (2,5 kg/m³ de substrato). Após a brotação, foi realizado desbaste selecionando-se apenas uma planta por tubete. As mudas receberam regas diárias e adubação líquida semanal. Após nove meses do plantio, os porta-enxertos de azeda foram transplantados para sacos de três litros contendo substrato RendmaxTM. As adubações foram feitas conforme descrito para limão ‘Cravo’. Ambos porta-enxertos foram conduzidos em casas de vegetação protegidas por tela antiafídica.

Para propagar o material vegetal transgênico (matrizes) e controles, utilizou-se enxertia de borbulhas em T invertido. Aproximadamente um mês após a enxertia, depois de constatado o “pegamento” das borbulhas, foi retirado o fitilho protetor e realizada a poda da parte aérea do porta-enxerto estimulando o desenvolvimento da borbulha transgênica ou controle.

3.2 Análises moleculares para confirmação da transgenia e caracterização das plantas avaliadas

Estes experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Biotecnologia de Plantas Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pertencentes à Universidade de São Paulo, em Piracicaba, São Paulo.

3.2.1 Teste histoquímico GUS

Testes histoquímicos de GUS foram realizados para indicação inicial da transgenia das plantas escolhidas para o trabalho. Foram coletadas amostras idênticas de tecido foliar maduro utilizando um perfurador. Os discos foliares foram incubados em 30 µL de solução X-GLUC (5-

bromo-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo) a 45 °C, na ausência de luz por 24 horas. Após o período de incubação, o material foi lavado com etanol (70%) para retirada da clorofila e melhor visualização do resultado. Plantas que apresentaram coloração azul foram consideradas GUS positivas.

3.2.2 PCR das plantas transgênicas

Com o objetivo de detectar o transgene no DNA genômico das plantas analisadas foi utilizado o PCR (reação em cadeia da polimerase). Amostras de tecido foliar foram maceradas em nitrogênio líquido e DNA genômico extraído pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Em seguida, o DNA extraído foi quantificado em gel, diluído e submetido a análises de PCR utilizando-se *primers* específicos para cada gene de interesse. O PCR foi realizado utilizando os seguintes parâmetros por reação: 4 μ L de DNA (20 ng), 0,2 μ L de dNTPs (10 mM), 0,8 μ L de MgCl₂ (25 mM), 2,0 μ L de tampão de reação (10X), 0,3 μ L de Taq polimerase (5 U. μ L⁻¹) e 0,3 μ L dos *primers* (10 μ M).

Para as construções gênicas CP e DS, foram utilizados os *primers*: 5'-GGG CCC ATG GAC GAC GAR ACA AAG-3' e 5'-CTC GAG TCA ACG TGT GTT RAA TTT CC-3'. O programa utilizado no termociclador para amplificar o fragmento de 684 pb foi: 94 °C / 3 min, 39 ciclos de (94 °C / 15 s, 56 °C / 30 s, 72 °C / 40 s) e 72 °C / 5 min. Para a construção SC, foram utilizados os *primers*: 5'-AGA ACG AGG TGG CGC ATA-3' e 5'-CTT TGG TTC ACG CAT ACG TT-3'. O programa utilizado no termociclador para amplificar o fragmento de 559 pb foi: 94 °C / 2min, 39 ciclos de (94 °C / 30s, 60 °C / 30 s, 72 °C / 30 s) e 72 °C / 5 min. . A amplificação do gene GUS foi obtida utilizando-se os *primers*: 5'-CAA CGA ACT GAA CTG GCA G-3' e 5'-CAT CAC CAC GCT TGG GTG-3'. O programa utilizado no termociclador para amplificar o fragmento de 820 pb foi: 94 °C / 2 min, 40 ciclos de (94 °C / 15 s, 60 °C / 30 s, 72 °C / 40 s) e 72 °C / 4 min. Os produtos das reações de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, e visualizados e fotografados em transluminares UV.

3.2.3 Análise de *Southern blot*

Para confirmação da integração do transgene, DNA total de folhas jovens, de todas as matrizes transgênicas, foi extraído para a análise de *Southern blot*, pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) acrescentando-se uma lavagem com fenol, uma lavagem com clorofórmio álcool isoamílico e precipitação com acetato de amônio. Um total de 60 µg de DNA foi submetido à digestão com a enzimas *Bam*HI e os fragmentos gerados separados em gel de agarose (0,8%) por eletroforese, transferidos para membranas de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences) em solução 20X SSC e fixados a 80 °C, por 2 h.

As sondas para os diferentes genes de interesse foram preparadas por PCR de colônias bacterianas conforme descrito no item anterior. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1% e purificados com o kit “QIAEX® II Gel Extraction” (Qiagen, Hilden, Germany). Estes fragmentos foram posteriormente marcados com o auxílio dos kits “Gene Images™ Random Primer Labelling Module” e “AlkPhos Direct Labelling Reagents” (Amersham Biosciences), seguindo orientações do fabricante. Após a sua marcação, as sondas foram hibridizadas a 60 °C contra o DNA impregnado na membrana de nylon. Após lavagens de estringência a 60 °C, com soluções recomendadas pelo kit de marcação, a detecção das sondas hibridizadas na membrana foi realizada com auxílio do kit “CDP-Star™ Detection Reagent” (Amersham Biosciences).

3.2.4 Análise de RT-PCR

Visando avaliar a expressão gênica dos transgenes integrados ao genoma das plantas, lançou-se mão da transcrição reversa (RT) de RNA total com *primers* específicos para os genes testados e subsequente amplificação por PCR. A enzima transcriptase reversa, “SuperScript™ II Reverse Transcriptase” (Invitrogen), foi utilizada na reação de transcrição reversa seguindo orientações do fabricante. O RNA total foi extraído de folhas das matrizes transgênicas utilizando-se o produto comercial TRIZOL (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Para acessar a qualidade do RNA extraído, este foi separado em gel de agarose desnaturante (1,5%), corado com brometo de etídeo e fotografado com o auxílio de transluminadores UV.

Constatada a integridade e qualidade do RNA extraído, este foi quantificado por fluorometria (“Qubit™ Fluorometer”; kit “Quant-iT™ RNA assay kit”, Invitrogen). Após quantificação, 5 µg do mesmo foi tratado com DNase para evitar contaminação de DNA na subsequente amplificação por PCR. O tratamento foi realizado com o produto “RQI RNase-free DNase” (Promega) seguindo orientações do fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 1 µg de RNA total tratado com DNase e *primers* específicos para os transgenes a serem investigados (CP, DS, SC, e GUS). O cDNA gerado a partir destas reações (0,5 µL da reação de transcrição reversa ou 0,02 µg de RNA total) foi então submetido a reações de PCR com *primers* específicos e seus produtos separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, e visualizados e fotografados em transluminares UV.

3.2.5 Análise de *northern blot*

O RNA total foi extraído de folhas das linhagens transgênicas utilizando o produto comercial TRIzol (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Um total de 40 µg de RNA total foi separado por eletroforese em gel desnaturante de agarose (1,0% - 1,5% contendo formaldeído), sendo posteriormente transferido por capilaridade em solução SSC 10X para uma membrana de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences). O RNA foi fixado à membrana por exposição à radiação UV utilizando o aparelho “UVC 500 UV Crosslinker” (Hoefer).

As sondas utilizadas foram produzidas, purificadas e marcadas conforme indicado para a técnica de *Southern blot*. As etapas de hibridização e detecção também foram realizadas conforme estabelecido para o *Southern blot*.

3.3 Delineamento experimental

Foram instalados dois experimentos com delineamento inteiramente ao acaso. O primeiro experimento, de maio de 2006 a dezembro de 2007, visou avaliar resistência à infecção e translocação do CTV usando inoculação por enxertia (experimento 1). O segundo experimento foi realizado entre junho de 2007 e abril de 2008 e buscou avaliar resistência à transmissão e infecção de CTV por pulgão preto (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) (experimento 2).

O experimento 1 foi constituído de 34 tratamentos com três repetições cada, totalizando 102 plantas ou parcelas. O experimento 2 foi constituído por dois subexperimentos, A e B, cada um com um tipo de porta-enxerto diferente, limão ‘Cravo’ e laranja azeda respectivamente. Cada subexperimento do experimento 2 foi constituído de 34 tratamentos com três repetições cada. Nos experimentos 1 e 2, cada tratamento consistiu de uma das 30 linhagens transgênicas disponíveis (CP 1 a 10; SC 1 a 10; e DS 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) ou controles de laranja ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’ (laranja ‘Hamlin’ não transformada, inoculada com CTV; laranja ‘Hamlin’ não transformada, não inoculada com CTV; lima ácida ‘Galego’ não transformada, inoculada com CTV; lima ácida ‘Galego’ não transformada, não inoculada com CTV).

3.4 Inoculação de CTV

3.4.1 Inoculação de CTV por enxertia (experimento 1)

Após cinco meses da propagação por enxertia do material transgênico, aproximadamente ao final do primeiro fluxo vegetativo, foi realizada a inoculação do experimento 1. Borbulhas de laranja ‘Pêra’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) infectadas com o isolado CTV-IAC foram cedidas pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira e enxertadas nas plantas de cada tratamento (Figura 2). Duas borbulhas infectadas foram enxertadas em T invertido, no porta-enxerto de limão ‘Cravo’, embaixo do ponto de enxertia do enxerto transgênico ou controle. Trinta dias após a enxertia das borbulhas infectadas, os fitilhos foram retirados.

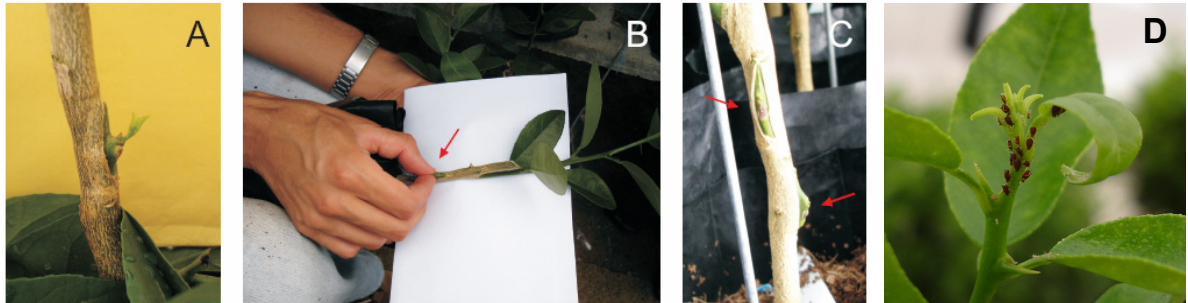


Figura 2 – Propagação de plantas transgênicas, inoculação de CTV por enxertia e inoculação de CTV com pulgões pretos. A) Borbulha de matriz transgênica enxertada em limão ‘Cravo’. B) Inoculação por enxertia de borbulhas infectadas (seta vermelha) com o isolado CTV-IAC em limão ‘Cravo’ enxertado com planta transgênica ao final do primeiro fluxo. C) Plantas com as duas borbulhas enxertadas (inóculos) (setas vermelhas). D) Inoculação de CTV com pulgões pretos em lima ácida ‘Galego’.

3.4.2 Inoculação de CTV por pulgão preto *T. citricida* (experimento 2)

Cinco meses após a propagação do material transgênico e controles, as plantas foram infectadas utilizando pulgões. Para tal, uma colônia de pulgões foi estabelecida em plantas CTV positivo, desta forma garantindo que os pulgões estariam adquirindo CTV. Os pulgões utilizados foram identificados como *Toxoptera citricida* Kirkaldy pelo pesquisador do IAC Dr. Valdir Yuki. O isolado de CTV utilizado foi o CTV-IAC, comumente usado na pré-imunização de citros em São Paulo, e considerado um isolado fraco, cujos sintomas não levam ao colapso rápido da planta. Aproximadamente 15 pulgões foram transferidos das plantas CTV positivo para cada uma das plantas do experimento 2 (A e B). Os pulgões foram mantidos nas plantas por um período de 24 horas. Após este período, estes foram retirados por meio de um forte jato de água.

3.5 Detecção do vírus em plantas inoculadas

As análises foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Microbiologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Embora as copas de laranja doce transgênicas utilizadas neste experimento permitam a multiplicação do vírus em seus tecidos, não eram esperados sintomas aparentes de tristeza, sendo

necessário um método de detecção alternativo à avaliação visual. A técnica utilizada para detecção da replicação do CTV em plantas transgênicas e controles foi o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) sanduíche indireto. No experimento 1, as análises de ELISA tiveram início após 14 semanas da inoculação por enxertia. No experimento 2, as análises de ELISA tiveram início após 18 semanas da inoculação por pulgões.

Utilizou-se antissoro policlonal contra CTV (purificado a partir de citros) e anticorpo monoclonal contra epitopo da proteína da capa protéica do isolado CTV-IAC. Para detecção do vírus, nervuras de folhas foram maceradas em tampão PBST contendo 2% de polivinilpirolidona (200mg de tecido vegetal mL⁻¹ de tampão). Todo procedimento de extração de proteínas foi realizado em condições refrigeradas. Após a extração, o macerado foi submetido à centrifugação a 4800 g, por 20 min, e posteriormente realizada a coleta do sobrenadante. As placas de ELISA foram sensibilizadas por 12 horas, a 4 °C, com 100 µL poço⁻¹ de antissoro policlonal (diluição de 1:1000 em tampão carbonato pH 9,6). Três lavagens com 300 µL poço⁻¹ de PBST foram realizadas em máquina automática de lavagem de placas. Após as lavagens, foi realizado bloqueio da placa por 1 hora a 37 °C com 200µL poço⁻¹ de leite desnatado, em tampão PBS. Nova seqüência de três lavagens com PBST (300µL poço⁻¹) foi realizada em máquina automática de lavagem de placas. O sobrenadante coletado na extração de proteínas foi aplicado nas placas (100µL poço⁻¹) em triplicatas e incubado por 12 horas a 4 °C. Nova seqüência de três lavagens com PBST foi realizada. O anticorpo monoclonal foi então aplicado (100 µL poço⁻¹, diluição de 1:1000 em tampão PBS) e incubado a 37 °C por 2 horas. Nova seqüência de três lavagens com PBST foi realizada. A aplicação de 100 µL poço⁻¹ de anti-IgG de camundongo (anticorpo secundário) na diluição de 1:15000 em PBS foi realizada e incubada por 1 hora a 37 °C. Nova seqüência de três lavagens com PBST foi realizada. Para revelação foi utilizado solução de paranitro fenil fosfato na concentração de 1 mg.mL⁻¹ em tampão substrato pH 9,82 e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram então lidas em leitor de ELISA no comprimento de onda de 405 nm. Em toda placa de ELISA, controles negativos (tampão PBS) e controles positivos (proteínas recombinantes da capa protéica do CTV: CB 104 e CB 22) foram utilizados. Os dados de ELISA obtidos para o experimento 1 foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan (P<0,05).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das plantas transgênicas

As análises de GUS indicaram o caráter transgênico de todas as plantas do experimento (matrizes). Padrões de expressão de GUS distintos puderam ser observados indicando uma possível variação na expressão espacial dos transgenes entre os diferentes eventos de transformação. O padrão de expressão mais comum foi caracterizado por uma coloração azul uniforme ao redor do disco foliar (Figura 3 B). Este padrão de expressão provavelmente está relacionado à expressão constitutiva do gene GUS. Inicialmente, a ausência de coloração no centro do disco foliar (Figura 3 B) foi relacionada à proteção conferida pela epiderme e cutícula contra o contato com a solução X-GLUC. No entanto, padrões de expressão diversos exibem manchas azuis justamente no centro do disco foliar, contradizendo esta possível explicação (Figura 3 C e D). Nas três linhagens transgênicas (SC4, SC9, SC10) que apresentaram fenótipo de GUS pontilhado (Figura 3 C) não foi detectado transcrito de GUS em análises de RT-PCR (Figura 4). As plantas SC4 e SC10 também foram RT-PCR e *northern blot* negativas para o transgene da SC. Já a planta SC9 foi *northern blot* e RT-PCR positiva para o transgene de interesse. Para as plantas SC9 e SC10 não foi possível a obtenção de *Southern blots* positivos para o gene de interesse apesar de ambas serem PCR positivo. Estes dados sugerem que o fenótipo de GUS pontilhado pode estar relacionado a alguma forma de silenciamento.

Outra possibilidade que explicaria estes diferentes padrões de expressão é que algumas plantas possivelmente seriam quimeras. Existem relatos que a exposição prolongada a canamicina pode aumentar a frequência de regeneração de plantas quiméricas (PEÑA et al., 1995). A ocorrência de plantas quiméricas foi de aproximadamente 37% em um experimento de transformação com citrange carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) e seleção por canamicina (DOMÍNGUEZ et al., 2004). As plantas utilizadas neste trabalho foram selecionadas em meio contendo canamicina como agente de seleção. Fica claro que a ocorrência de plantas quiméricas em citros transgênicos é comum. Este fenômeno é atribuído, principalmente, à proteção de células não transformadas por células transgênicas, levando à formação de uma gema constituída de células transgênicas e não transgênicas. Além do relato de

formação de quimeras entre células transgênicas e não transgênicas, existem relatos de plantas quiméricas constituídas de eventos de transformação diferentes (DOMÍNGUEZ et al., 2004).

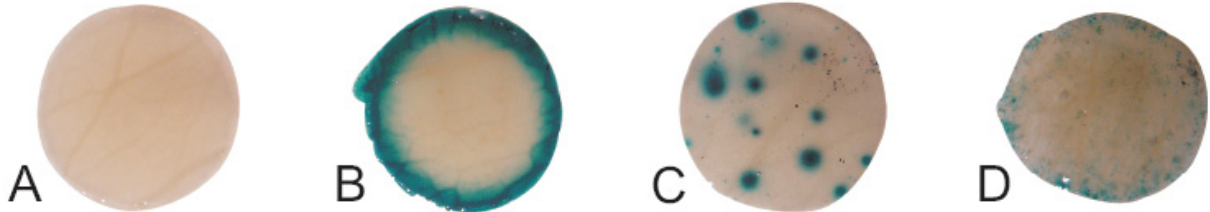


Figura 3 - Padrões de expressão de GUS em discos foliares de matrizes transgênicas de laranja ‘Hamlin’ e controle.

A) Controle negativo, planta de laranja ‘Hamlin’ tipo selvagem. B, C e D) Diferentes padrões de expressão de GUS encontrados nas matrizes transgênicas. Matrizes contendo padrão de expressão tipo B: todas CP, todas DS, SC1, SC2, SC3, SC5, SC6, SC7 e SC8. Matrizes contendo padrão de expressão tipo C e D: SC4, SC9, SC10

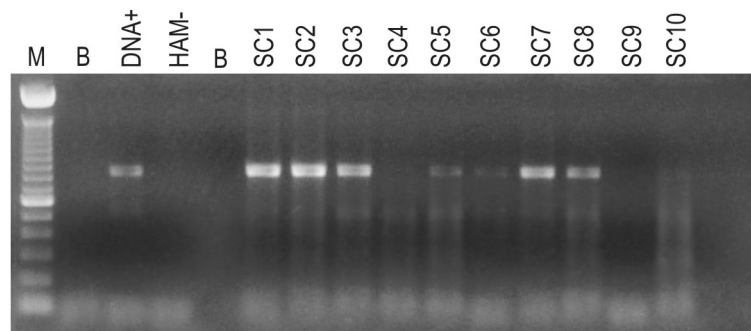


Figura 4 - Análises de RT-PCR das matrizes transgênicas para o gene repórter GUS. M = marcador de 100 pb; B = Branco; DNA+ = amostra de DNA positiva para o gene reporter; HAM- = cDNA de planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada; SC1-SC10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisense do CTV”

Para averiguar a integração do transgene de interesse no genoma das plantas, recorreu-se a dois tipos de análises: PCR e *Southern blot*. Foram realizados PCR, com *primers* específicos para os transgenes das construções gênicas envolvidas no experimento. Os resultados de PCR indicaram a inserção do transgene no DNA genômico de todas as plantas, exceto da planta CP4 (Figura 5). A planta CP4, portanto serviu como um controle negativo que foi submetido às condições de transformação e regeneração das outras linhas transgênicas. É interessante notar que apesar de ser PCR e *Southern blot* negativa a planta CP4 apresenta expressão de GUS.

Nas análises de *Southern blot*, obteve-se a confirmação da integração dos transgenes. O número estimado de inserções no genoma variou entre um e dois (Figura 6). Este número de inserções observadas coincide com o resultado de outros trabalhos de transformação de citros utilizando *Agrobacterium* (DOMÍNGUEZ et al., 2000; FEBRES et al., 2003; DOMÍNGUEZ et al., 2004; ZANEK et al., 2007). A única planta com dois eventos de inserção distintos foi a DS7. Devido às evidentes variações nos sítios de inserção dos T-DNAs nos diferentes eventos de transformação ou linhas transgênicas, pode haver diferenças na expressão dos transgenes (Figura 6).

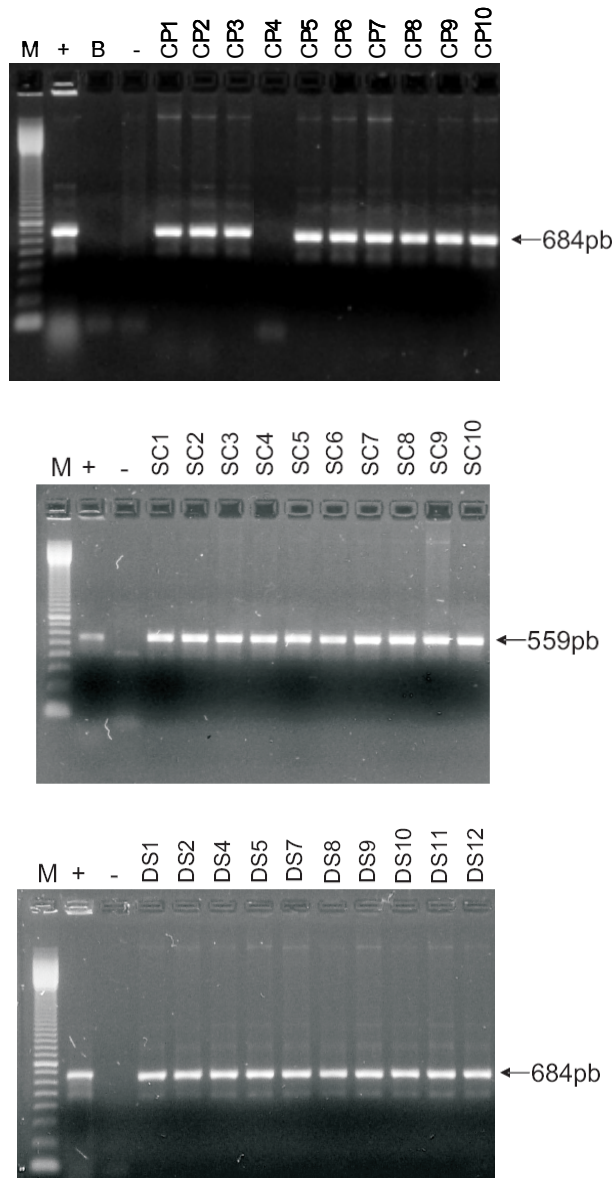


Figura 5 - Análises de PCR das matrizes transgênicas. CP1-CP10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP); SC1-SC10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisenso do CTV” (SC); DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS); M = marcador de 100 pb; + = bactéria usada na transformação; B = controle negativo do PCR com água; - = planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada

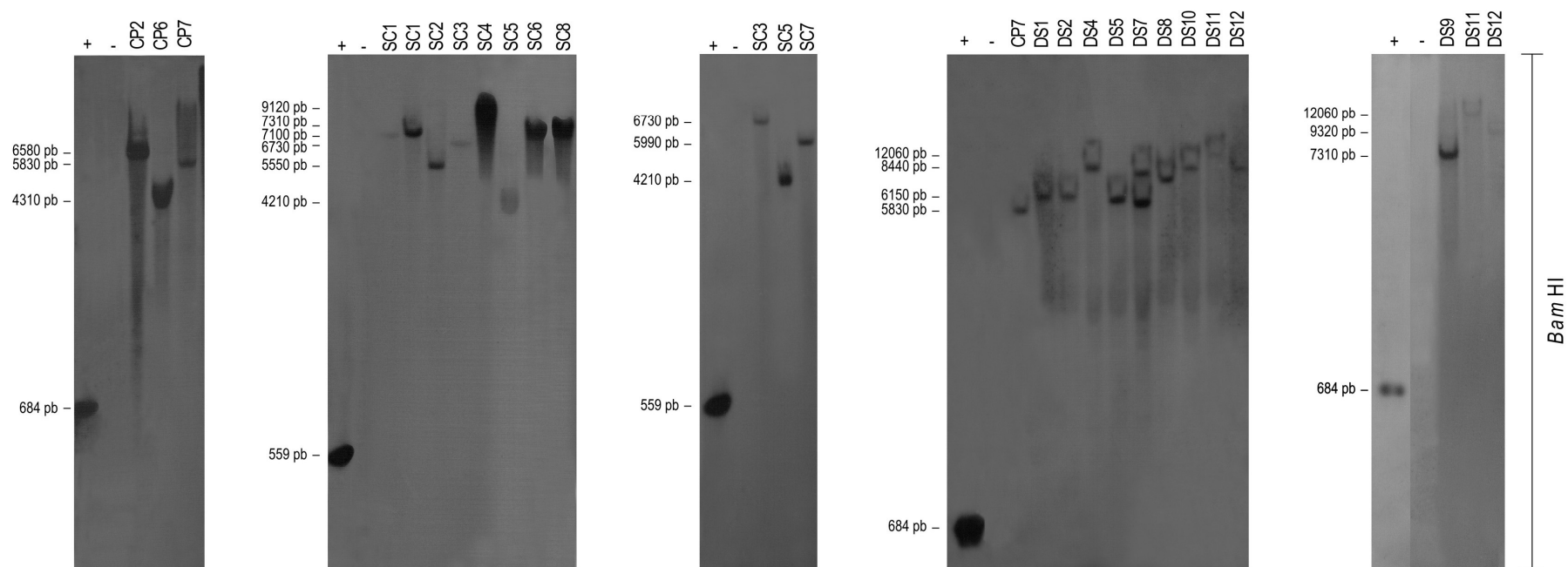


Figura 6 - Análises de Southern blot das matrizes transgênicas, todas as reações de restrição do DNA genômico foram feitas com a enzima *Bam*HI. CP2, CP6, CP7 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP); SC1, SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisenso do CTV” (SC); DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS); += produto de PCR obtido a partir de bactéria usada na transformação; - = planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada

Depois de confirmada a integração dos transgenes, avaliou-se a expressão dos mesmos. A expressão de parte dos transgenes (gene GUS) já havia sido demonstrada qualitativamente nas análises de GUS. Utilizou-se análises de RT-PCR, visando a detecção de RNA mensageiro (mRNA) transgênico para o gene de interesse em RNA total extraído de folhas. Como os transgenes integrados eram dirigidos pelo promotor 35S, um promotor forte e constitutivo, esperava-se encontrar mRNAs transgênicos em qualquer tecido vegetal.

A expressão dos transgenes de interesse são compatíveis nas análises de RT-PCR e *northern blot* (Figuras 7, 8 e 9). Nas matrizes CP, foi possível detectar mRNA transgênico de interesse em todas as plantas, exceto na planta CP4, como era esperado. Os *northern blots* destas plantas mostram claramente uma intensidade de expressão maior nas plantas CP3, CP5, CP6, CP7 e CP10 (Figura 8). As plantas DS apresentam presença baixíssima do mRNA transgênico de interesse (Figuras 7 e 8). Este fato sugere que a construção DS estaria funcionando como pretendido, ou seja, estaria formando RNAs fita dupla que, conseqüentemente, estariam sendo degradados pela enzima DICER. Isto explicaria os baixos níveis de detecção encontrados, tornando as plantas DS candidatas à resistência, já que as rotas de RNAi, em tese, estariam ativadas. As plantas SC por sua vez também apresentaram plantas com forte e baixa expressão do transgene de interesse (Figuras 7 e 9). Todas as plantas SC apresentaram expressão do transgene de interesse exceto as plantas SC4 e SC10 (Figura 7). Na Figura 9, coluna LG+, nota-se uma forte hibridização de fragmentos virais do CTV com a sonda utilizada, sugerindo que existem fragmentos virais de vários tamanhos, ou seja, vírus em vários estágios de replicação. As plantas SC com expressão mais forte foram SC1, SC2, SC3, SC7 e SC9 (Figura 9). Devido a uma maior sensibilidade do RT-PCR, em alguns casos, foi possível detectar mRNAs que não foram possíveis de serem identificados nas análises de *northern blot*. Os dados de expressão obtidos são robustos já que existe uma relação positiva entre os resultados do RT-PCR e o *northern blot*. De forma geral, os dados confirmam a funcionalidade dos transgenes utilizados.

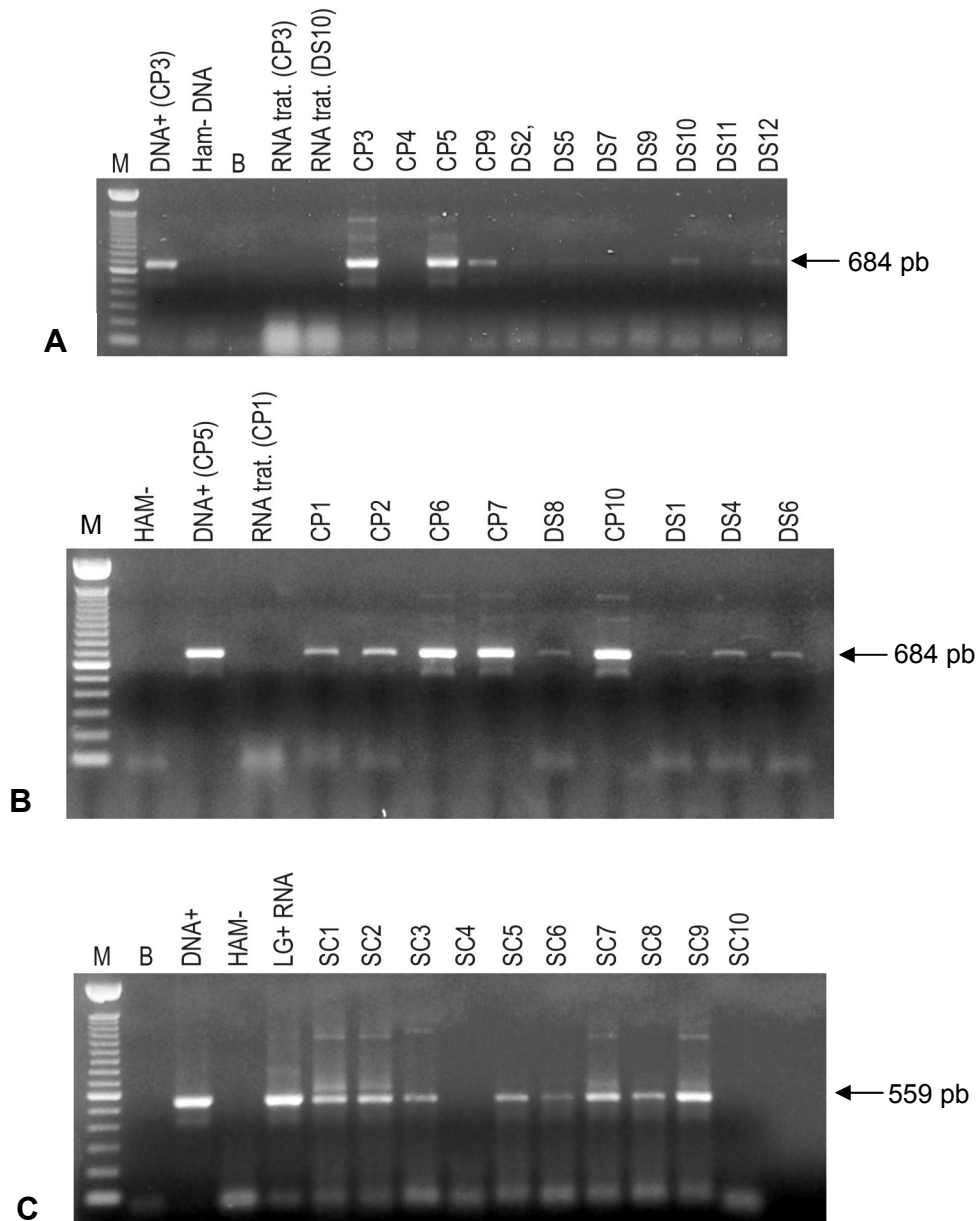


Figura 7 - Análises de RT-PCR dos genes de interesse das matrizes transgênicas. A e B) RT-PCR para o gene de interesse das construções CP e DS. C) RT-PCR para o gene de interesse da construção SC. CP1-CP7, CP9, CP10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP); SC1-SC10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisense do CTV” (SC); DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS); M = marcador; DNA+ = amostra de DNA positiva para o gene de interesse; HAM- = cDNA de planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada; RNA trat. = amostra de RNA tratada com DNase; B = Branco; LG+ RNA – cDNA de planta infectada com CTV

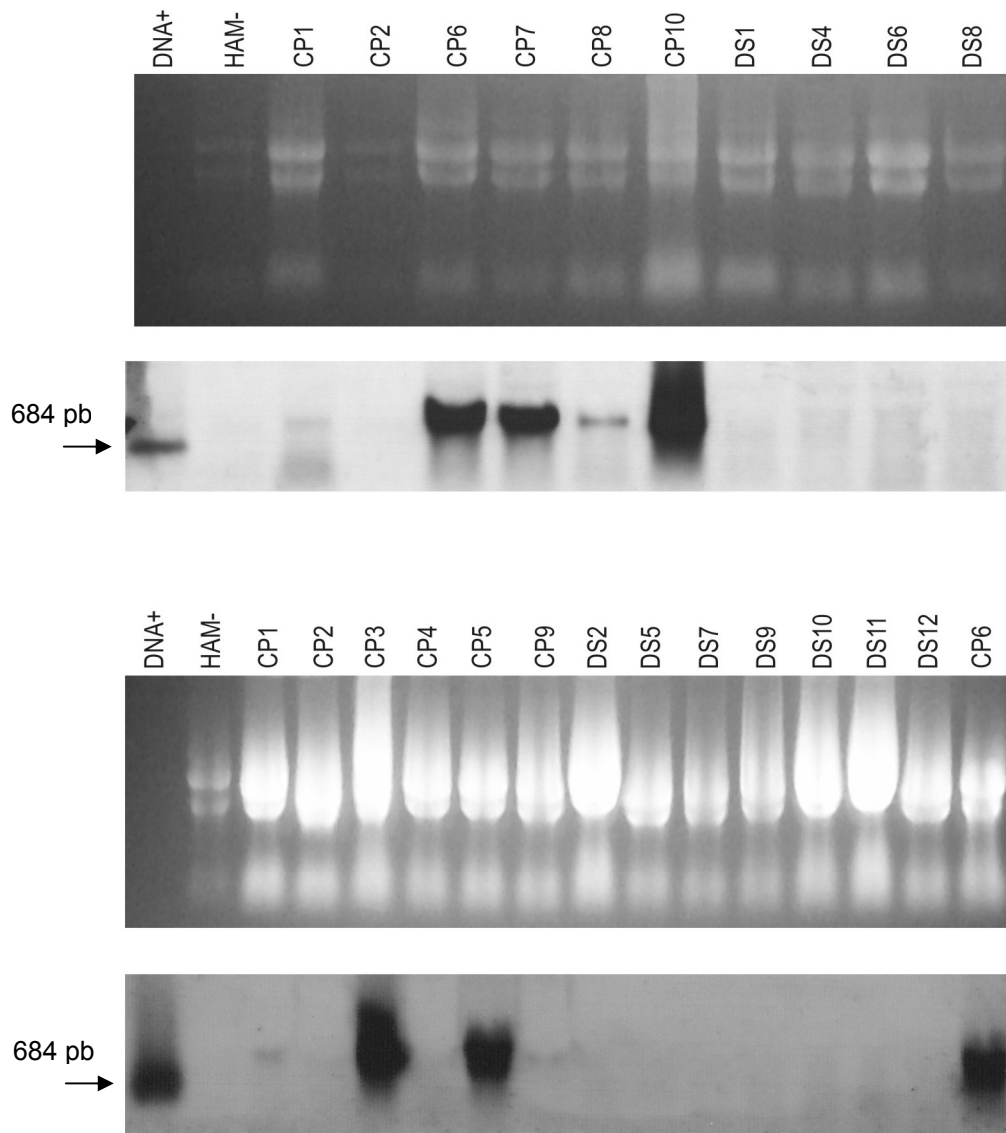


Figura 8 - Análises de northern blot das matrizes transgênicas para os genes de interesse das construções CP e DS. CP1-CP10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP); DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS); DNA+ = produto de PCR do gene CP; HAM- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada

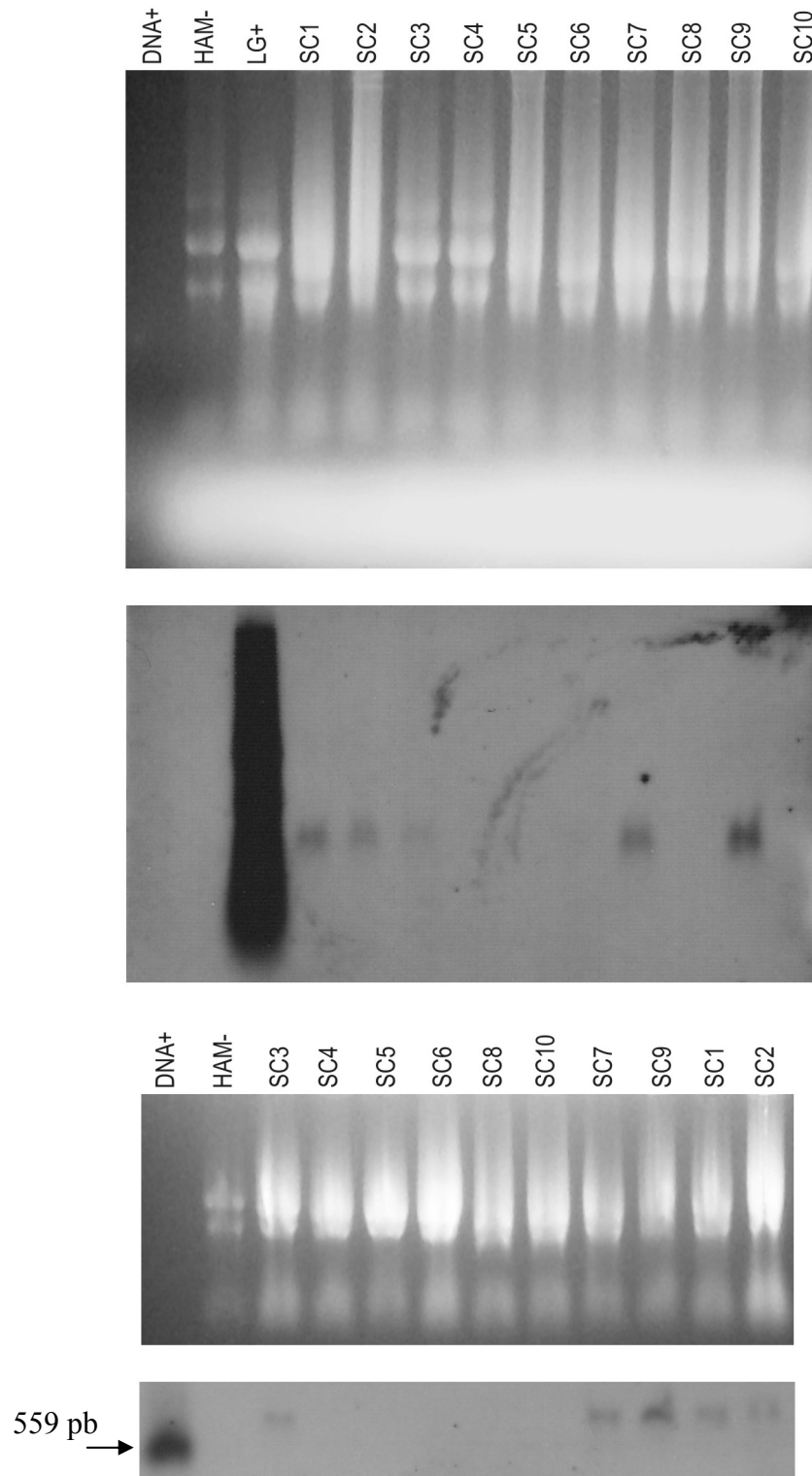


Figura 9 - Análises de northern blot das matrizes transgênicas para o gene de interesse da construção SC. SC1-SC10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisense do CTV” (SC); DNA+ = produto de PCR do gene SC; HAM- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transformada; LG+ = planta de lima ácida ‘Galego’ infectada com CTV

Na tentativa de detectar proteínas transgênicas possivelmente existentes nas construções CP e DS, foi realizada análise de ELISA das matrizes. Os resultados mostram ausência de qualquer acúmulo significativo de proteína transgênica (Figura 10). Estes dados asseguraram que a posterior detecção de CTV por ELISA não sofreu interferência pela eventual presença de proteínas transgênicas. Este fato inicialmente sugeriu que algumas plantas CP poderiam estar sendo silenciadas e, portanto, não foi possível a detecção da proteína transgênica. No entanto, as análises de RT-PCR mostraram a presença de mRNA transgênico para todas as plantas CP (Figuras 7). Portanto, os dados coletados indicam a incapacidade do antissoro e anticorpo monoclonal utilizados nas análises de ELISA, detectar a proteína transgênica. Análises posteriores deverão ser conduzidas buscando-se esclarecer porque não foi possível detectar proteínas transgênicas pelo antissoro e anticorpo monoclonal. As construções transgênicas foram produzidas a partir de RNA total isolado de plantas com morte súbita no Estado de São Paulo. Como o CTV ocorre em misturas de isolados (SATYANARAYANA et al., 2001) pelo menos o antissoro policlonal deveria ter mostrado melhores resultados na detecção da CP transgênica. Entretanto, apesar da aparente forte expressão gênica da CP transgênica em algumas plantas (CP3, CP5, CP6, CP7 e CP10) é possível que não houvesse proteína nos tecidos ou as concentrações fossem extremamente baixas. Portanto, não está claro se não houve acúmulo de proteína transgênica suficiente nos tecidos vegetais ou se o problema da detecção está relacionado à especificidade dos anticorpos usados.

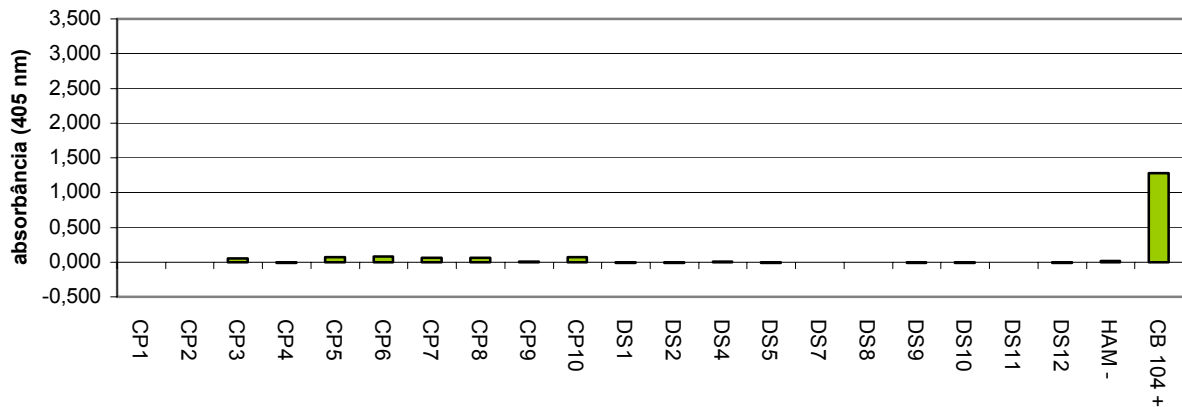


Figura 10 - ELISA das matrizes transgênicas das construções CP e DS. CP1-CP10 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP); DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = matrizes transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS); HAM- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica não inoculada; CB 104+ = proteína recombinante do capsídeo viral do CTV usada como controle positivo

A hipótese central deste trabalho previa que as construções utilizadas fossem deflagrar alguma das formas de resistência a vírus como RNAi e expressão da capa protéica. Na construção SC, esperava-se que o mRNA transgênico (antisense a regiões conservadas do CTV) pudesse hibridizar com partículas de RNA viral gerando uma estrutura de dupla fita e deflagrando o silenciamento por RNAi (Figura 11 A). Da mesma forma, as longas moléculas de RNA fita dupla geradas pelo transgene DS seriam reconhecidas e degradadas pela enzima DICER produzindo siRNA e complexos RISC (Figura 11 B). O mecanismo hipotetizado para a construção DS prepararia as plantas antes de uma infecção viral. Portanto qualquer partícula viral de CTV que tentasse desencapsular no ambiente celular seria clivada na região de homologia com os complexos RISC, evitando a replicação e acúmulo de partículas de CTV nos tecidos. A Figura 11 mostra as rotas do RNAi possivelmente acionadas pelas construções usadas neste trabalho.

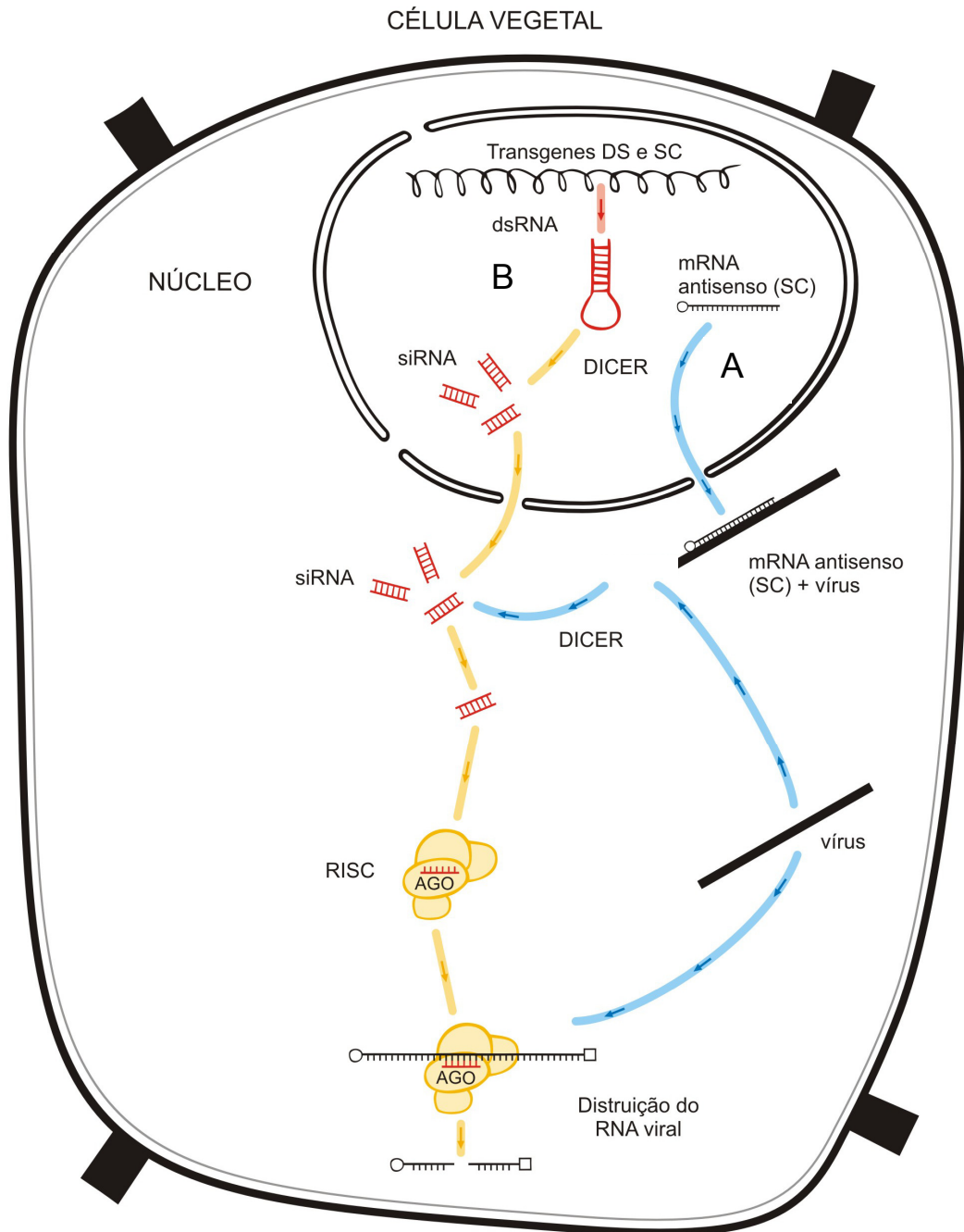


Figura 11 - Rotas de defesa ativadas pelos transgenes DS e SC. A) Síntese de mRNA da seqüência conservada antisense do CTV (SC); formação de dsRNA por hibridização com a partícula viral do CTV; reconhecimento e degradação do dsRNA pela enzima DICER no citoplasma; formação do complexo RISC e degradação de novos RNAs virais. B) Síntese de dsRNA com seqüências da capa protéica do CTV; produção de siRNA pela enzima DICER no núcleo; formação do complexo RISC e degradação de RNA viral. entre o mRNA transgênico e partícula viral; produção de siRNA pela DICER; formação do complexo RISC e degradação de RNA viral

A construção gênica CP visa expressar a proteína da capa protéica do CTV. A idéia é que a presença de proteínas transgênicas da capa protéica poderia interferir na estabilidade de novas partículas virais ou impedir o desencapsulamento do vírus. Não se sabe ao certo o mecanismo de proteção acionado nas plantas transgênicas resistentes que expressam a CP de vírus invasores. Como a seqüência da CP utilizada nas construções transgênicas provavelmente possui alto grau de homologia com a CP do isolado CTV-IAC, possivelmente o provável mecanismo de proteção estaria relacionado com o mecanismo da pré-imunização.

4.2 Inoculação de CTV por enxertia e avaliação da resistência à infecção pelo vírus em plantas transgênicas (experimento 1)

O experimento 1 visou avaliar a resistência à infecção por CTV em tecidos vegetais transgênicos. Após 14 semanas da inoculação com borbulhas infectadas, as plantas foram analisadas por ELISA sanduíche indireto usando antissoro policlonal e anticorpo monoclonal, ambos contra a proteína da capa protéica do CTV, isolado CTV-IAC. Nesta técnica de ELISA, a sensibilização da placa com antissoro policlonal permite uma concentração relativa da proteína a ser detectada pelo anticorpo monoclonal, já que o antígeno se liga a todos os sítios disponíveis dos anticorpos presos a placa, conferindo alta sensibilidade. Os controles evidenciaram a eficiência do processo de inoculação utilizado assim como a ausência de qualquer interferência experimental (Figuras 12 e 13). Todas as linhagens transgênicas (tratamentos) inoculadas indicaram a presença do vírus em pelo menos uma repetição. Algumas repetições acusaram títulos muito baixos de vírus, nas primeiras análises de ELISA (Figuras 14, 15 e 16). No entanto, em ELISAs posteriores (Figura 17), estas mesmas plantas acusaram níveis altos de replicação viral, indicando retardamento do processo de infecção em alguns indivíduos. Esta variação em propagações clonais tem sido recorrente em experimentos de resistência a tristeza em citros transgênicos (DOMÍNGUEZ et al., 2002b; FAGOAGA et al., 2006).

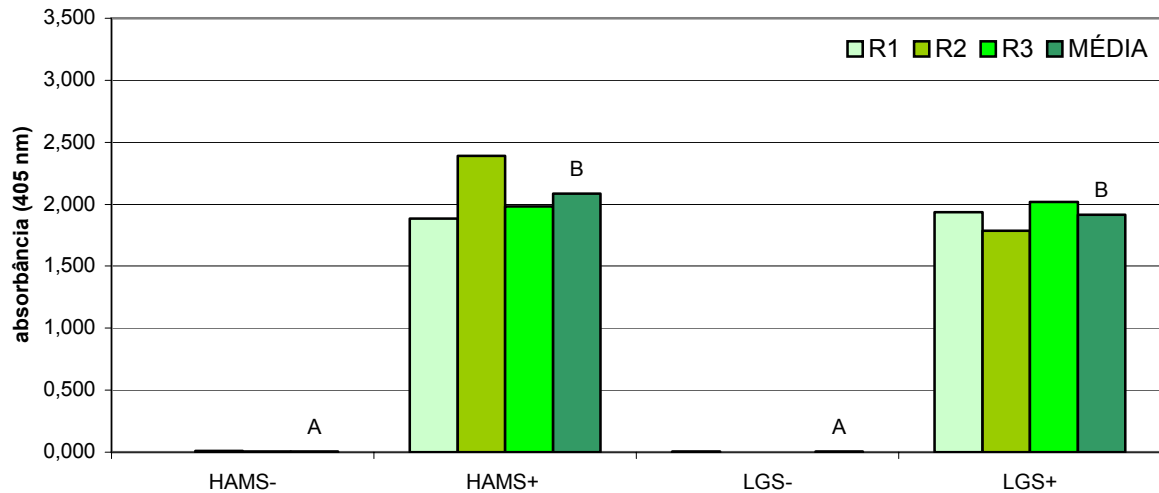


Figura 12 - ELISA das plantas controle (experimento 1), após 14 semanas da inoculação com CTV. Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). HAMS- = planta de laranja 'Hamlin' não transgênica, não inoculada; HAMS+ = planta de laranja 'Hamlin' não transgênica, inoculada com CTV; LGS- = planta de lima ácida 'Galego' não inoculada; LGS+ = planta de lima ácida 'Galego' inoculada com CTV; R1, R2 e R3 = repetições

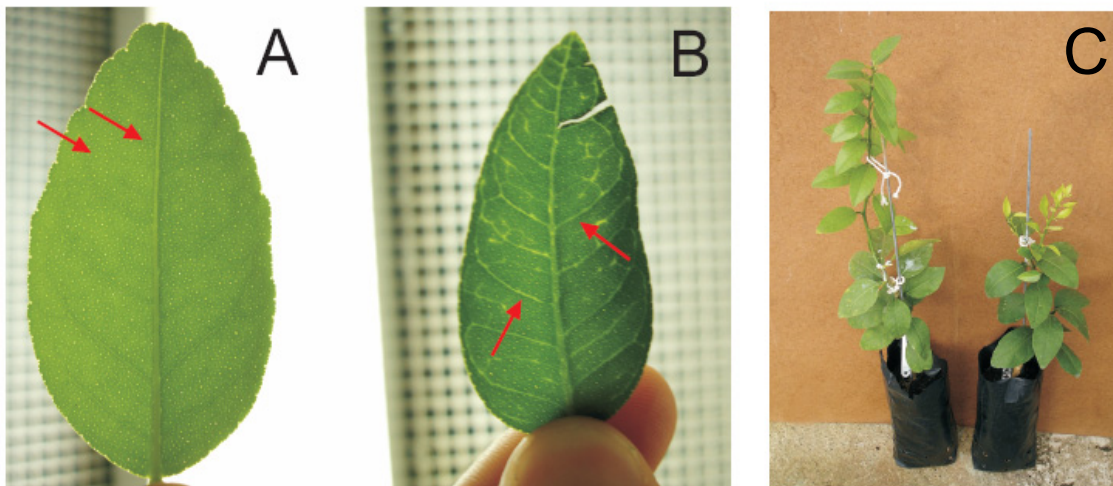


Figura 13 – Sintomas causados pelo CTV em lima ácida 'Galego' (experimento 1). A) lima ácida 'Galego' controle não transgênico sem inoculação, as setas indicam nervuras normais. B) lima ácida 'Galego' controle não transgênico com inoculação, setas indicam *vein clearing*. C) Plantas controle de lima ácida 'Galego' durante o segundo fluxo. A planta da direita é CTV positiva

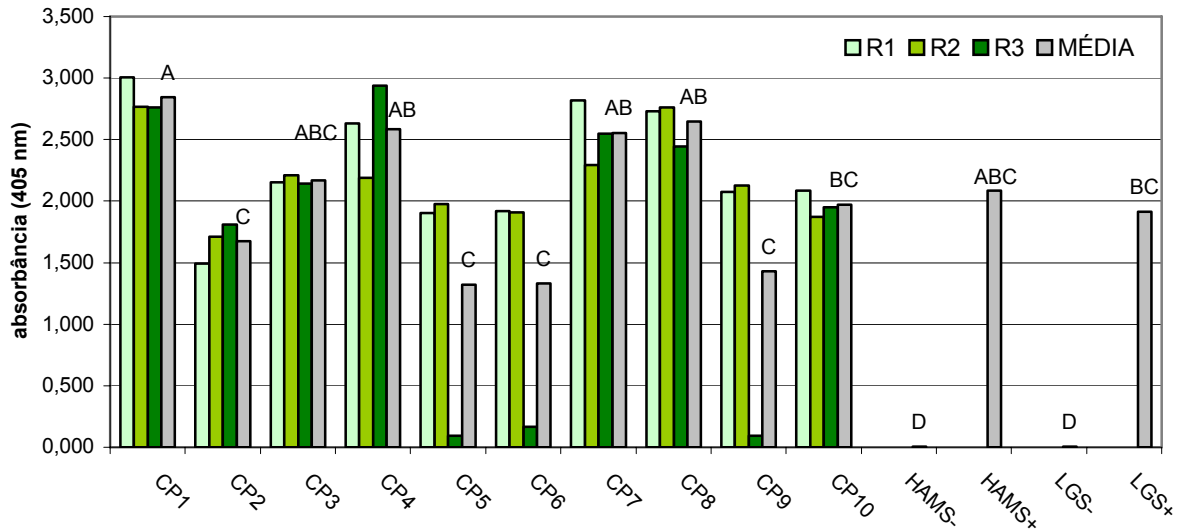


Figura 14 - Resultados de ELISA das plantas CP (experimento 1), após 14 semanas da inoculação com CTV. Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). CP1-CP10 = plantas transgênicas transformadas com a construção gênica “gene da capa protéica do CTV” (CP) e inoculadas com CTV; HAMS- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica não inoculada; HAMS+ = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculada com CTV; LGS- = planta de lima ácida ‘Galego’ não inoculada; LGS+ = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV. ; R1, R2 e R3 = repetições

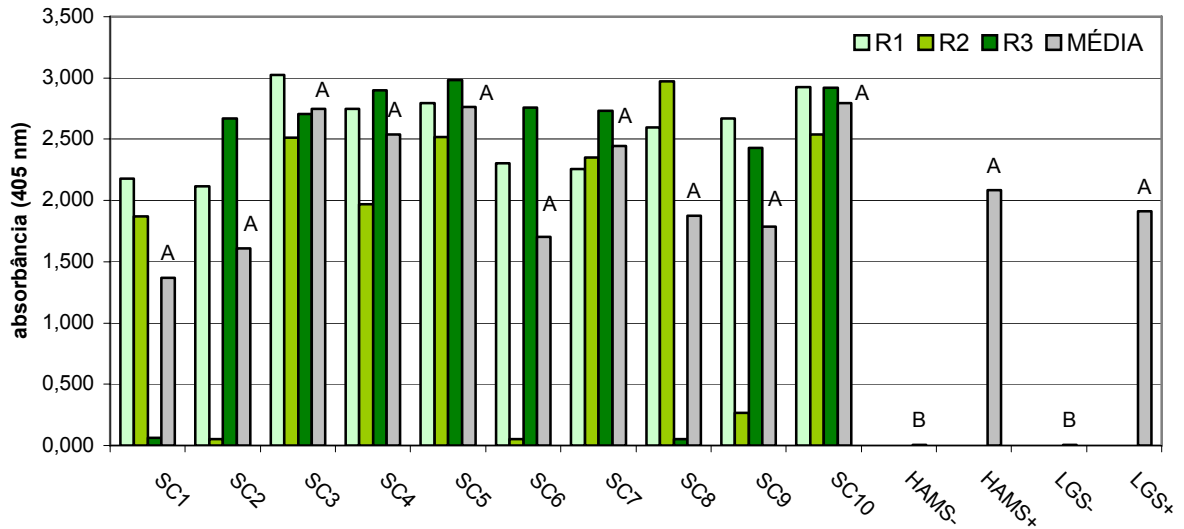


Figura 15 - ELISA das plantas SC (experimento 1), após 14 semanas da inoculação com CTV. Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). SC1-SC10 = plantas transgênicas transformadas com a construção gênica “região conservada antisense do CTV” (SC) e inoculadas com CTV; HAMS- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica não inoculada; HAMS+ = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculada com CTV; LGS- = planta de lima ácida ‘Galego’ não inoculada; LGS+ = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV; R1, R2 e R3 = repetições

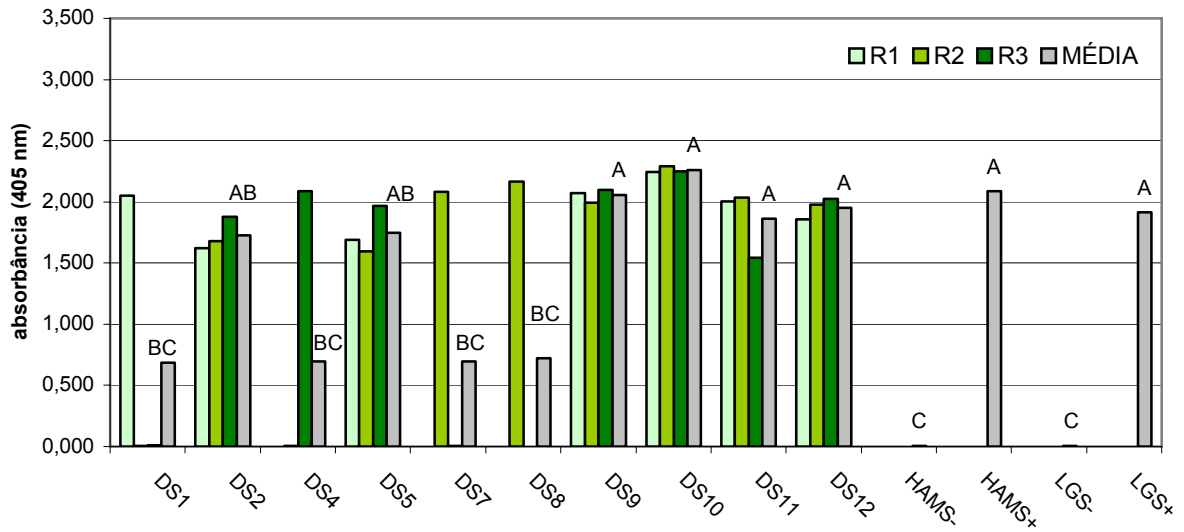


Figura 16 - ELISA das plantas DS (experimento 1), após 14 semanas da inoculação com CTV. Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). DS1, DS2, DS4, DS5, DS7-DS12 = plantas transgênicas transformadas com a construção gênica “hairpin do gene da capa protéica do CTV” (DS) e inoculadas com CTV; HAMS- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica não inoculada; HAMS+ = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculada com CTV; LGS- = planta de lima ácida ‘Galego’ não inoculada; LGS+ = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV; R1, R2 e R3 = repetições

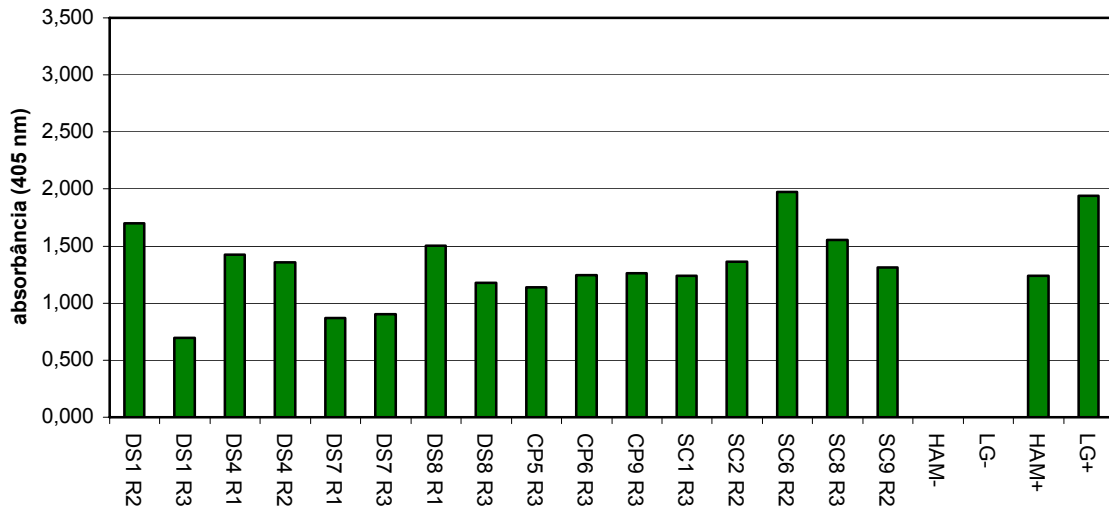


Figura 17 - ELISA de plantas que apresentaram retardamento da infecção viral após 46 semanas da inoculação com CTV (experimento 1). DS1 R2, DS1 R3 DS4 R1, DS4 R2, DS7 R1, DS7 R3, DS8 R1, DS8 R3, CP5 R3, CP6 R3, CP9 R3, SC1 R3, SC2 R2, SC6 R2, SC8 R3, SC9 R2 = parcelas do experimento 1 compostas por plantas transgênicas transformadas com as respectivas construções gênicas (DS, CP e SC) apresentando retardamento inicial da infecção por CTV; HAM- = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica não inoculada; HAM+ = planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculada com CTV; LG- = planta de lima ácida ‘Galego’ não inoculada; LG+ = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV

Nenhuma das linhagens transgênicas analisadas apresentou resistência à translocação do CTV. O vírus demonstrou ser capaz de ascender em tecidos vegetais por mais de 60 cm em quatro meses. Tratando-se de um vírus tipicamente de floema, em que fluxo de seiva é descendente, a ascensão de partículas de CTV sugere um eficiente mecanismo de movimentação nos tecidos vegetais. Em estudos de citopatologia do CTV, nenhuma partícula viral inteira foi detectada em plasmodesmas e apenas ocasionalmente foram encontrados virions em elementos de vaso (ZHOU et al., 2002). É possível que a movimentação do CTV se dê via partícula viral inteira e/ou de RNA viral auxiliado por proteínas de movimento. Em ambos os casos, em cada nova célula ocupada, o RNA viral precisaria ser liberado para poder sintetizar novas partículas virais e proteínas. Assumindo este cenário possível, esperava-se que os transgenes utilizados

tivessem algum efeito negativo na expansão da infecção celular pelo CTV. No entanto, isto não foi constatado.

Como o inóculo (borbulhas contaminadas) permaneceu vivo durante todo o período de avaliação das plantas e o porta-enxerto de limão ‘Cravo’ permite a replicação viral, alguns trabalhos já sugeriram que a detecção do CTV na copa poderia ser simplesmente fruto do transporte de partículas virais oriundas do porta-enxerto (FEBRES et al., 2003). Como a análise de ELISA detecta a proteína viral e partículas inteiras de vírus são raramente detectadas nos vasos ou plasmodesmas (ZHOU et al., 2002), parece provável que o vírus esteja realmente replicando nos tecidos da copa.

A pressão de inóculo é um tema recorrente nos trabalhos de avaliação de resistência ao CTV e sugere que um inóculo muito forte seria suficiente para sobrepor a resistência das plantas transgênicas (DOMÍNGUEZ et al., 2002a; FEBRES et al., 2003). Esta idéia provavelmente está relacionada à noção que plantas protegidas por estirpes mais fracas podem ser desafiadas por estirpes fortes e a proteção perdida (ROISTACHER; DODDS; BASH, 1987; YOKOMI et al., 1987; MORENO et al., 2008). É possível que o inóculo do experimento 1 (duas borbulhas infectadas) tenha sido forte demais, resultando em uma superação da resistência.

4.3 Inoculação de CTV por pulgão preto (*T. citricida* Kirkaldy) e avaliação da resistência à infecção pelo vírus em plantas transgênicas (experimento 2)

Os primeiros testes ELISA do experimento 2 apresentaram algumas falhas de inoculação, indicando que as inoculações realizadas com pulgões pretos não foram completamente eficientes (Figura 18). Desta forma, serão necessárias novas inoculações com pulgões para padronização da infecção nas planta controle.

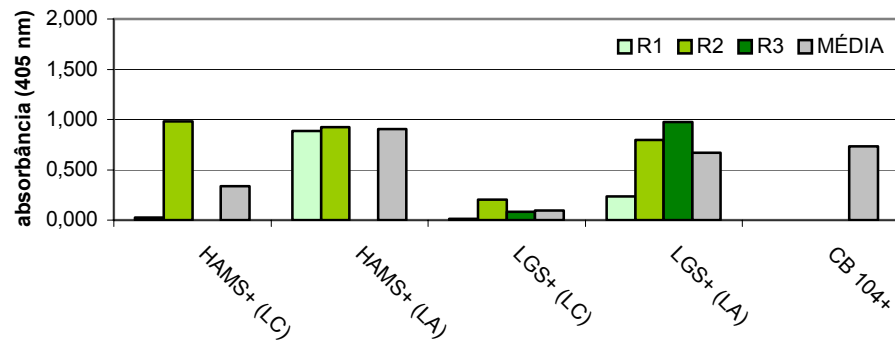


Figura 18 - ELISA dos controles positivos do experimento 2 após 18 semanas da inoculação com pulgões. HAMS+(LC) = plantas de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculada com CTV enxertadas em limão ‘Cravo’; HAMS+(LA) = plantas de laranja ‘Hamlin’ não transgênica inoculadas com CTV enxertadas em laranja azeda; LGS+(LC)- = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV enxertada em limão ‘Cravo’; LGS+ (LA) = planta de lima ácida ‘Galego’ inoculada com CTV enxertada em laranja azeda; R1, R2 e R3 = repetições

5 CONCLUSÕES

As plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' avaliadas não apresentaram resistência à replicação e translocação viral quando inoculadas com borbulhas infectadas com o isolado fraco CTV-IAC.

Algumas plantas transgênicas apresentaram retardamento inicial da infecção viral.

REFERÊNCIAS

- ABECITRUS. Disponível em: <[http:// http://www.abecitrus.com.br](http://www.abecitrus.com.br)>. Acesso em: 11 mar. 2008.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. 1463 p.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A.; RODRIGUEZ, A.P.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 1, p. 23-29, 2003.
- ANDRADE, G.M. de; SARTORETTO, L.M.; BRASILEIRO, A.C.M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 465-476, 2003.
- ANGELL, S.M.; BAULCOMBE, D.C. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 16, p. 3675–3684, 1997.
- ARAGÃO, F.J.L.; RIBEIRO, S.G. Detecção de proteínas pela técnica ELISA. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, Cenargen, 1998. cap. 16, p. 239-250.
- AZEVEDO, F.A.; MOURAO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; ALMEIDA, W.A.B.; SCHINOR, E.H.; PIO, R.; BARBOSA, J.M.; GUIDETTI-GONZALEZ, J.; CARRER, H.; LAM, H. Genetic transformation of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) with the bO (Bacterio-opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 24, p. 185-196, 2006.
- BAR-JOSEPH, M.; MARCUS, R.; LEE, R.F. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 291-316, Sept. 1989.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. **Cell**, Cambridge, v. 116, p. 281-297, 2004.
- BARTEL, B.; BARTEL, D.P. MicroRNAs: At the root of plant development? **Plant Physiology**, Washington, v. 132, p. 709–717, 2003.
- BASSANEZI, R.B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T.R.; BOVÉ, J.M. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, p. 502-512, 2003.
- BATUMAN, O.; MAWASSI, M.; BAR-JOSEPH, M. Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to Citrus tristeza virus sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus. **Virus Genes**, New York, v. 33, p. 319-327, 2006.

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

BEACHY, R.N.; LOESCH-FRIES, S.; TUMER, N.E. Coat protein mediated resistance against virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 451-474, 1990.

BENDAHMANE, M.; FITCHEN, J.H.; ZHANG, G.; BEACHY, R.N. Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, p. 7942–7950, 1997.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A.A.; HAMMOND, S.M.; HANNON, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, London, v. 409, p. 363-366, 2001.

BOLTON, G.W.; NESTER, E.W.; GORDON, M.P. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. **Science**, Washington, v. 232, p. 983-985, 1986.

BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, E.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin A* gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* ‘Hamlin’. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 530-536, 2006.

BRASILEIRO, A.C.M. Cultivo e conservação de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, Cenargen, 1998. cap. 4, p. 65-74.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. Introdução à transformação genética de plantas. In: _____. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, Cenargen, 1998. p. 13-16.

BRIGNETI, G.; VOINNET, O.; LI, W.; JI, L.; DING, S.; BAULCOMBE, D.C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 17, p. 6739–6746, 1998.

BRLANSKY, R.H.; DAMSTEEGT, V.D.; HOWD, D.S.; ROY, A. Molecular analyses of citrus tristeza virus subisolates separated by aphid transmission. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 397–401, 2003.

BROOThAERTS, W.; KEULEMANS, J.; VAN NERUM, I. Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, p. 497-501, 2004.

BUTAYE, K.M.J.; CAMMUE, B.P.A.; DELAURE, S.L.; DE BOLLE, M.F.C. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 16, p. 79-91, 2005.

CERVERA, M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene *HAL2* from yeast. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, p. 26-30, 2000.

CHAN, S.W.L.; ZILBERMAN, D.; XIE, Z.; JOHANSEN, L.K.; CARRINGTON, J.C.; JACOBSEN, S.E. RNA silencing genes control de novo DNA methylation. **Science**, Washington, v. 303, p. 1336, 2004.

CHENG, M.; FRY, J.E.; PANG, S.Z.; ZHOU, H.P.; HIRONAKA, C.M.; DUNCAN, D.R.; CONNER, T.W.; WAN, Y.C. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, Washington, v. 115, p. 971–980, 1997.

COGONI, C.; MACINO, G. Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 10233–10238, 1997.

COSTA, A.S.; GRANT, T.J. Studies on transmission of the tristeza virus by the vector *Aphis citricidus*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 41, p. 105-113, 1951.

CROSSWAY, A.; OAKES, J.V.; IRVINE, J.M.; WARD, B.; KNAUF, V.C.; SHEWMAKER, C.K. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 202, p. 179–185, 1986.

DAVULURI, G.R.; VAN TUINEN, A.; FRASER, P.D.; MANFREDONIA, A.; NEWMAN, R.; BURGESS, D.; BRUMMELL, D.A.; KING, S.R.; PALYS, J.; UHLIG, J.; BRAMLEY, P.M.; PENNING, H.M.J.; BOWLER, C. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. **Nature Biotechnology**, London, v. 23, p. 890-895, 2005.

DAWE, R.K. RNA interference, transposons, and the centromere. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 297–301, 2003.

DI NICOLA-NEGRI, E.; BRUNETTI, A.; TAVAZZA, M.; ILARDI, V. Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 14, p. 989-994, 2005.

DOMÍNGUEZ, A.; FAGOAGA, C.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. **Molecular Genetics Genomics**, Heidelberg, v. 267, p. 544-556, 2002a.

DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 19, n. 4, p. 427-433, Mar. 2000.

DOMÍNGUEZ, A.; MENDOZA, A.H. de; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 10, p. 1-10, 2002b.

DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZA, R.M.; ROMERO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterization of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 171-183, Sept. 2004.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

ELBASHIR, S.M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21 and 22 nt RNAs. **Genes & Development**, Woodbury, v. 15, p. 188–200, 2001.

FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of *Citrus tristeza virus* are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, p. 435-445, 2005.

FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; MENDOZA, A.H. de; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 60, p. 153-165, 2006.

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 11 mar. 2008.

FEBRES, V.J.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Transgenic resistance to *Citrus tristeza virus* in grapefruit. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, p. 93-104, 2008.

FEBRES, V.J.; NIBLETT, C.L.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 21, n. 5, p. 421-428, Jan. 2003.

FEBRES, V.J.; ASHOULIN, L.; MAWASSI, M.; FRANK, A.; BAR-JOSEPH, M.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. 1331–1335, 1996.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2: Doenças das plantas cultivadas, cap. 25, p. 261-296.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, p. 806-811, 1998

FITCH, M.M.M.; MANSHARDT, R.M.; GONSALVES, D.; SLIGHTOM, J.L.; SANFORD J.C. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. **Nature Biotechnology**, London, v. 10, p. 1466-1472, 1992.

FLEMING, G.H.; OLIVARES-FUSTER, O.; DEL-BOSCO, S.F.; GROSSER, J.W. An alternative method for the genetic transformation of sweet orange. **In Vitro Cell & Developmental Biology –Plant**, Heidelberg, v. 36, p. 450-455, Nov./Dec. 2000.

FROMM, M.; TAYLOR, L.P.; WALBOT, V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant-cells by electroporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, p. 5824-5828, 1985

FUNDECITRUS. Disponível em: <www.fundecitrus.com.br>. Acesso em: 11 mar. 2008.

GALUN, E. RNA silencing in plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology —Plant**, Heidelberg, v. 41, p. 113–123, 2005.

GARNSEY, S.M.; LEE, R.F. Tristeza. In. WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press, 1989. p. 48-50.

GELVIN, S.B. Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 51, p. 223-256, 2000.

_____. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, p. 16–37, 2003

GOMEZ-LIM, M.A.; LITZ, R.E. Genetic transformation of perennial tropical fruits. **In Vitro Cell & Developmental Biology — Plant**, Heidelberg, v. 40, p. 442–449, 2004.

GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. Jr. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, Berlin, v. 8, p. 339-374, 1990.

GUO, W.; DUAN, Y.; OLIVARES-FUSTER, O.; WU, Z.; ARIAS, C.R.; BURNS, J.K.; GROSSER, J.W. Protoplast transformation and regeneration of transgenic Valencia sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methylesterase. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 24, p. 482-486, 2005.

GURA, T. A silence that speaks volumes. **Nature**, London, v. 404, p. 804-808, 2000.

GUTIÉRREZ-E, M.A.; LUTH, D.; MOORE, G.A. Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium L.*) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 16, p. 745-753, 1997.

HAMILTON, A.J.; BAULCOMBE, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, Washington, v. 286, p. 950-952 1999.

HAMMOND, S.M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; HANNON, G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, London, v. 404, p. 293-296, 2000.

HANNON, G.J. RNA interference. **Nature**, London, v. 418, p. 244–251, 2002.

HERRON, C.M.; MIRKOV, T.E.; DA GRACA, J.V.; LEE, R.F. *Citrus tristeza virus* transmission by the *Toxoptera citricida* vector: In vitro acquisition and transmission and infectivity immunoneutralization experiments. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 134, p. 205–211, 2006.

HIDAKA, T.; OMURA, M. Transformation of citrus protoplasts by electroporation. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Nagoya, v. 62, p. 371-376, 1993.

HIDAKA, T.; OMURA, M.; UGAKI, M.; TOMIYAMA, M.; KATO, A.; OHSHIMA, M.; MOTOYOSHI, F. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of Citrus spp. from suspension cells. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, v. 40, p. 199-207, 1990.

HILF, M.E.; KARASEV, A.V.; PAPPU, D.J.; GUMPF, H.R.; NIBLETT, C.L.; GARNSEY, S.M. Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. **Virology**, Amsterdam, v. 208, p. 576–582, 1995.

JONGSMAN, M.; KOORNNEEF, M.; ZABEL, P.; HILLE, J. Tomato protoplast DNA transformation – physical linkage and recombination of exogenous DNA-sequences. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 8, p. 383–394, 1987.

JORGENSEN, R.A.; CLUSTER, P.D.; ENGLISH, J.; QUE, Q.; NAPOLI, C.A. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 31, p. 957-973, 1996.

KAEPLER, H.F.; SOMERS, D.A.; RINES, H.W.; COCKBURN, A.F. Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 84, p. 560-566, 1992.

KARASEV, A.V.; BOYKO, V.P.; GOWDA, S.; NIKOLAEVA, O.V.; HILF, M.E.; KOONIN, E.V.; NIBLETT, C.L.; CLINE, K.; GUMPF, D.J.; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M.; LEWANDOWSKI, D.J.; DAWSON W. O. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. **Virology**, Amsterdam, v. 208, p. 511–520, 1995.

KLEE, H.; HORSCH, R.; ROGERS, S. Agrobacterium-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 38, p. 467-486, 1987.

KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus-Sinensis* Osb.) protoplast by direct DNA transfer. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v. 64, p. 91-97, 1989.

KOBAYASHI, S.; SAKAI, A.; OHGAWARA, T.; NAKAMURA, Y. Stable maintenance of an integrated gene in nucellar cells of navel orange (*Citrus-sinensis* Osb.) under storage in LN(2). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Nagoya, v. 63, p. 553-558, 1994.

KOHLI, A.; TWYMAN, R.M.; ABRANCHES, R.; WEGEL, E.; STOGER, E.; CHRISTOU, P. Transgene integration, organization and interaction in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, p. 247-258, 2003.

KOOTER, J.M.; MATZKE, M.A.; MEYER, P. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. **Trends in Plant Science**, London, v. 4, p. 340-347, 1999.

KUMAR, S.; FLADUNG, M. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. **Planta**, Berlin, v. 213, p. 731-740, 2001.

LINDBO, J.A.; DOUGHERTY, W.G. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. **Virology**, Amsterdam, v. 189, p. 725-733, 1992.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KREIGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSKY, S.L.; DARNELL, J. **Biologia celular e molecular**. 5. ed. Porto Alegre : Artmed, 2005. 1054 p.

LU, R.; FOLIMONOV, A.; SHINTAKU, M.; LI, W.; FALK, B.W.; DAWSON, W.O.; DING, S. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 15742-15747, 2004.

MATZKE, A.J.; MATZKE, M.A. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 1, p. 142-148, 1998.

MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M.C.; GREGGIO, C.C.; PIAZZA, J.P.; KAMLA, R.F.; ZACHARIAS, P.R.A.; BAR-JOSEPH, M.; KITAJIMA, E.W.; ASSUMPÇÃO, L.C.; CAMAROTTE, G.; CARDOZO, J.; CASAGRANDE, E.C.; FERRARI, F.; FRANCO, S.F.; GIACHETTO, P.F.; GIRASOL, A.; JORDÃO JR., H.; SILVA, V.H.A.; SOUZA, L.C.A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ZANCA, A. S.; ARRUDA, P.; KITAJIMA, J. P.; REINACH, F.C.; FERRO, J.A.; SILVA, A.C.R. da. Identification and genomic characterization of a new virus (*Tymoviridae* Family) associated with Citrus Sudden Death Disease. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 5, p. 3028-3037, Mar. 2005.

MARTINEZ, J.; TUSCHL, T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. **Genes & Development**, Woodbury, v. 18, p. 975-980, 2004.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, London, v. 431, p. 343-349, 2004.

MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALMEIDA, W.A.B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Hamlin sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 955-961, 2002.

MENEGHINI, M. Sobre a natureza e transmissibilidade de docena “Tristeza” dos citrus. **O Biológico**, São Paulo, v. 12, p. 285-287, 1946.

_____. Experiências de transmissão da doença “tristeza” dos citrus pelo pulgão preto da laranja. **O Biológico**, São Paulo, v. 14, p. 115-118, 1948.

MERAI, Z.; KERENYI, Z.; KERTESZ, S.; MAGNA, M.; LAKATOS, L.; SILHAVY, D. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, p. 5747-5756, 2006.

MICHAUD, J.P. A review of the literature on *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 81, p. 38-61, 1998.

MITANI, N.; KOBAYASHI, S.; NISHIZAWA, Y.; KUNIGA T.; MATSUMOTO, R. Transformation of trifoliolate orange with rice chitinase gene and the use of the transformed plant as a rootstock. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 439-441, 2006.

MOISSIARD, G.; VOINNET, O. Viral suppression of RNA silencing in plants. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 5, p. 71-82, 2004.

MOORE, G.A.; JACONO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE, S.D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 11, p. 238-242, 1992.

MORENO, P.; AMBRÓS, S.; ALBIACH-MARTÍ, M.R.; GUERRI, J.; PEÑA, L. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 9, p. 251-268, 2008.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.S. **Citricultura brasileira**. São Paulo: Fundação Cargill, 1991. p. 735-762.

MÜLLER, G.W.; REZENDE, J.A.M. Preimmunization: applications and perspectives in virus disease control. In: NAQVI, S.A.M.H. **Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. v. 1, p. 361-395.

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A. de; RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: MATTOS JUNIOR, D. de; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo; Fundag, 2005. cap. 19, p. 567-604.

NAGAYA, S.; KATO, K.; NINOMIYA, Y.; HORIE, R.; SEKINE, M.; YOSHIDA, K.; SHINMYO, A. Expression of Randomly Integrated Single Complete Copy Transgenes Does not Vary in *Arabidopsis thaliana*. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 46, p. 438–444, 2005.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, Bethesda, v. 2, p. 279-289, 1990.

NEWELL, C.A. Plant transformation technology developments and applications. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 16, p. 53-65, 2000.

NG, J.C.K.; FALK, B.W. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 183-212, 2006.

NIU, Q.W.; LIN, S.S.; REYES, J.L.; CHEN, K.C.; WU, H.W.; YEH, S.D.; CHUA, N.H. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. **Nature Biotechnology**, London, v. 24, p. 1420-1428, 2006.

NYKÄNEN, A.; HALEY, B.; ZAMORE, P.D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. **Cell**, Cambridge, v. 107, p. 309-321, 2001.

OGITA, S.; UEFUJI, H.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. RNA interference: Producing decaffeinated coffee plants. **Nature**, London, v. 423, p. 823, 2003.

OLIVARES-FUSTER, O.; FLEMING, G.H.; ALBIACH-MARTI, M.R.; GOWDA, S.; DAWSON, W.O.; GROSSER, J.W. Citrus tristeza virus (CTV) resistance in transgenic citrus based on virus challenge of protoplasts. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 39, n. 6, p. 567-572, Nov. 2003.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports, Heidelberg**, Berlin, v. 16, p. 731-737, 1997.

PEÑA, L.; MARTÍN-TILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, M. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* OR *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. **Nature**, London, v. 19, p. 263-267, 2001.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, Limerick, v. 104, p. 183-191, 1995.

PENNAZIO, S.; ROGGERO, P.; CONTI, M. A history of plant virology. Cross protection. **The New Microbiologica**, Pavia, v. 25, p. 99-114, 2001.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIIOR, D. de; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 4, p. 63-104.

POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. **Annual Review in Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p. 205-225, 1991.

POWELL-ABEL, P.; NELSON, R.S.; DE, B.; HOFFMANN, N.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; BEACHY, R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, Washington, v. 232, p. 738–743, 1986.

PRINS, M.; LAIMER, M.; NORIS, E.; SCHUBERT, J.; WASSENEGGER, M.; TEPFER, M. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 9, p. 73–83, 2008.

RAVELONANDRO, M.; SCORZA, R.; CALLAHAN, A.; LEVY, L.; JACQUET, C.; MONSION, M.; DAMSTEEGT, V. The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model. **Virus Research**, Amsterdam, v. 71, p. 63-69, 2000.

RHOADES, M.W.; REINHART, B.J.; LIM, L.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, B.; BARTEL, D.P. Prediction of plant microRNA targets. **Cell**, Cambridge, v. 110, p. 513-20, 2002.

ROBERTSON, D. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 495–519, 2004.

ROCHA-PEÑA, M.A.; NIBLETT, C.L.; LEE, R.F.; OCHOA-CORONA, F.M.; LASTRA, R.; GARNSEY, S.M.; YOKOMI, R.K. CTV and its aphid vector *Toxoptera citricida*: threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, p. 437–444, 1995.

ROISTACHER, C.N.; DODDS, J.A.; BASH, J.A. Means of obtaining and testing protective strains of seedling yellows and stem pitting tristeza virus a preliminary report. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 19, p. 199-204, 1987.

ROISTACHER, C.N. **Graft-transmissible diseases of citrus**: handbook for detection and diagnosis. Rome: FAO, 1991. 286 p.

ROMÁN, M.P.; CAMBRA, M.; JUÁREZ, J.; MORENO, P.; DURAN-VILA, N.; TANAKA, F.A.O.; ALVES, E.; KITAJIMA, E.W.; YAMAMOTO, P.T.; BASSANEZI, R.B.; TEIXEIRA, D.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; AYRES, A.J.; GIMENES-FERNANDES, N.; RABENSTEIN, F.; GIROTTO, L.F.; BOVÉ, J.M. Sudden Death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 5, p. 453-367, May 2004.

ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular microbiology**, Malden, v. 6, p. 3343-3353, 1992.

ROTH, B.M.; PRUSS, G.J.; VANCE, V.B. Plant viral suppressors of RNA silencing. **Virus Research**, Amsterdam, v. 102, p. 97–108, 2004.

ROY, G.; SUDARSHANA, M.R.; ULLMAN, D.E.; DING, S.; DANDEKAR, A.; FALK, B.W. Chimeric cDNA Sequences from *Citrus tristeza virus* confer RNA silencing- mediated resistance in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants. **Virology**, Amsterdam, v. 96, p. 819-827, 2006.

SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. The concept of parasite-derived resistance- deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, v. 113, p. 395-405, 1985.

SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; ALLEN, N. Delivery of substance into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, London, v. 5, p. 27–37, 1987.

SATYANARAYANA, T.; BAR-JOSEPH, M.; MAWASSI, M.; ALBIACH-MARTI, M.R.; AYLLO, M.A.; GOWDA, S.; HILF, M.E.; MORENO, P.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O. Amplification of *Citrus Tristeza Virus* from a cDNA clone and infection of *citrus* trees. **Virology**, Amsterdam, v. 280, p. 87-96, 2001.

SCHINOR, E.H. **Organogênese in vitro e transformação genética em *Citrus* sp. com o gene da capa protéica e uma seqüência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros.** 2006. 88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SCHRAMKE, V.; ALLSHIRE, R. Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. **Science**, Washington, v. 301, p. 1069–1074, 2003.

SCORZA, R.; CALLAHN, A.; LEVY, L.; DAMSTEEGT, V.; WEBB, K.; RAVELONANDRO, M. Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 10, p. 201-209, 2001.

SEGAL, G.; SONG, R.T.; MESSING, J. A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. **Genetics**, Bethesda, v. 165, p. 387–397, 2003.

SHARMA, K.K.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; THORPE, T.A. Genetic transformation technology: status and problems. **In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant**, Heidelberg, v. 41, p. 102–112, 2005.

SOUZA, A.J. de; MENDES, B.M.J.; MOURAO FILHO, F.A.A. Gene silencing: concepts applications and perspectives in woody plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 645-656, 2007.

TOLIA, N.H.; JOSHUA-TOR L. Slicer and the argonauts. **Nature Chemical Biology**, London, v. 3, p. 36-43, 2006.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, p. 147-154, 2006.

VAUCHERET, H.; FAGARD, M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. **Trends in Genetics**, London, v. 17, p. 29-35, 2001.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 114, p. 3083-3091, 2001.

VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, p. 206-220, 2005.

VOINNET, O.; LEDERER, C.; BAULCOMBE, D.C. Viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. **Cell**, Cambridge, v. 103, p. 157-167, 2000.

VOINNET, O.; VAIN, P.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D.C. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. **Cell**, Cambridge, v. 95, p. 177-187, 1998.

WANG, M.B.; WATERHOUSE, P.M. High efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 67-82, 2000.

WASSENEGGER, M. RNA-directed DNA methylation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 203-220, 2000.

_____. Gene silencing. **International Review of Cytology**, Amsterdam, v. 219, p. 61-113, 2002.

WASSENEGGER, M.; PELISSIER, T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 37, p. 349-362, 1998.

WATERHOUSE, P.M.; GRAHAM, M.W.; WANG, M-B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 13959-13964, 1998.

WATERHOUSE, P.M.; WANG, M.B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, London, v. 411, p. 834-842, 2001.

YADAV, N.S.; VANDERLEYDEN, J.; BENNET, D.R.; BARNES, W.M.; CHILTON, M. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 79, p. 6322-6326, 1982.

YAMAYA, J.; YOSHIOKA, M.; MESHI, T.; OKADA, Y.; OHNO, T. Cross protection in transgenic tobacco plants expressing a mild strain of tobacco mosaic virus. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 215, p. 173-175, 1988.

- YANG, Z.N.; INGELBRECHT, I.L.; LOUZADA, E.; SKARIA, M.; MIRKOV, T.E. Agrobacterium-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 19, p. 1203-1211, 2000.
- YE, F.; SIGNER, E.R. RIGS (repeat-induced gene silencing) in Arabidopsis is transcriptional and alters chromatin configuration. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Wahsington, v. 93, p. 10881-10886, 1996.
- YOKOMI, R.K.; GARNSEY, S.M.; LEE, R.F.; COHEN, M. Use of insect vectors to screen for protecting effects of mild citrus tristeza virus isolated in Florida USA. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 19, p. 183-186, 1987.
- ZANEK, M.C.; REYES, C.A.; CERVERA, M.; PEÑA, E.J.; VELÁZQUEZ, K.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; GRAU, O.; PEÑA, L.; GARCÍA, M.L. Genetic transformation of sweet orange with coat protein gene of *Citrus psorosis virus* and evaluation of resistance against the virus. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, p. 57-66, 2007.
- ZHANG, S.C.; TIAN, L.M.; SVIRCEV, A.; BROWN, D.C.W.; SIBBALD, S.; SCHNEIDER, K.E.; BARSZCZ, E.S.; MALUTAN, T.; WEN, R.; SANFACON, H. Engineering resistance to Plum pox virus (PPV) through the expression of PPV-specific hairpin RNAs in transgenic plants. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 28, p. 263-270, 2006.
- ZHOU, C.L.E.; AMMAR, E.; SHETA, H.; KELLEY, S.; POLEK, M.; ULLMAN, D.E. Citrus tristeza virus ultrastructure and associated cytopathology in *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia*. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 80, p. 512-525, 2002.

ANEXO

Review**GENE SILENCING: CONCEPTS, APPLICATIONS, AND PERSPECTIVES IN WOODY PLANTS**

Amancio José de Souza¹; Beatriz Madalena Januzzi Mendes²; Francisco de Assis Alves Mourão Filho^{3*}

¹USP/ESALQ - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.

²USP/CENA - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, C.P. 96 - 13400-970 - Piracicaba, SP - Brasil.

³USP/ESALQ - Depto. de Produção Vegetal, C.P. 09 - 13418-900 - Piracicaba, SP - Brasil.

*Corresponding author <famourao@esalq.usp.br>

ABSTRACT: RNA interference, transcriptional gene silencing, virus induced gene silencing, and micro RNAs comprise a series of mechanisms capable of suppressing gene expression in plants. These mechanisms reveal similar biochemical pathways and appear to be related in several levels. The ability to manipulate gene silencing has produced transgenic plants able to switch off endogenous genes and invading nucleic acids. This powerful biotechnological tool has provided plant breeders and researchers with great opportunity to accelerate breeding programs and developmental studies in woody plants. This research work reports on gene silencing in woody plants, and discuss applications and future perspectives.

Key words: RNAi, miRNA, siRNA, genetic transformation, virus resistance

SILENCIAMENTO GÊNICO: CONCEITOS, APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS EM PLANTAS LENHOSAS

RESUMO: RNA de interferência, silenciamento gênico transcricional, silenciamento gênico induzido por vírus e micro RNAs compõem uma série de mecanismos capazes de suprimir a expressão gênica em plantas. Estes mecanismos revelaram rotas metabólicas parecidas e interagem em vários níveis. A capacidade de manipular técnicas de silenciamento gênico tem produzido plantas transgênicas capazes de suprimir a expressão de genes endógenos e ácidos nucleicos invasores. Esta poderosa ferramenta biotecnológica tem ofertado a possibilidade de acelerar programas de melhoramento e pesquisas em desenvolvimento de plantas lenhosas. Este trabalho visa revisar pesquisas de silenciamento gênico em plantas lenhosas e discutir aplicações e rumos futuros.

Palavras-chave: RNAi, miRNA, siRNA, resistência a vírus, transformação genética

INTRODUCTION

The discovery of mechanisms that suppress gene activity in plants has extended the horizon for research on control of gene expression (Mansoor et al., 2006). Gene silencing (GS) is defined as a molecular process involved in the down regulation of specific genes, and probably evolved as a genetic defense system against viruses and invading nucleic acids (Brigneti et al., 1998; Voinnet et al., 2000; Waterhouse et al., 2001; Wassenegger, 2002). Currently, there are several routes of GS identified in plants, such as: post-transcriptional gene silencing or RNA interference (PTGS or RNAi) (Vaucheret et al., 2001), transcriptional gene silencing (Vaucheret & Fagard, 2001), microRNA silencing (Bartel, 2004), and virus induced gene silencing (Burch-Smith et al., 2004). All these

pathways play an important role at the cellular level, affecting differentiation, gene regulation (Bartel, 2004), and protection against viruses and transposons (Waterhouse et al., 2001).

There are numerous possible applications for GS in plants. Initially, the main research focus was the production of virus resistant plants through genetic transformation (Lindbo & Dougherty, 1992; Angell & Baulcombe, 1997; Gutiérrez-E et al., 1997; Ravelonandro et al., 2000; Scorza et al., 2001). GS has also been used in food quality modification such as the reduction of caffeine levels in coffee beans (Ogita et al., 2003), and to increase the nutritional value of corn protein and tomatoes (Segal et al., 2003; Davuluri et al., 2005). Research on forest tree yield and quality has included the study of GS related to lignin synthesis. On the other hand, research on fruit

crops has targeted applications of GS on viral and bacterial resistance, and physiological aspects such as self-fertility. The study of plant gene function by affecting gene expression through silencing techniques (PTGS / RNAi and VIGS) has also been present in recent lines of investigation (Robertson, 2004).

This review reports and discusses the main molecular mechanisms involved in plant GS as well as the research focused on woody plants. Perspectives of the application of this technology in woody plant improvement are also considered.

MECHANISMS OF GENE SILENCING

Some early findings regarding GS occurred when a team of researchers tried to obtain transgenic petunias with greater amounts of anthocyanin pigments, by amplifying the gene activity of chalcone synthase (Napoli et al., 1990). Instead of obtaining deeper purples in the petals, white or chimeric flowers were produced. Apparently, the transgene was not expressed, and ended up silencing a homologue endogenous gene. The phenomenon, named "co-suppression", was unstably transmitted within generations leading to the hypothesis that it was mediated by a nucleic acid, presumably RNA (Gura, 2000).

Similar phenomena were named "quelling" in fungi (Romano & Macino, 1992; Cogoni & Macino, 1997) and "RNA interference" (RNAi) in *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). The research indicated that the presence of double stranded RNA (dsRNA), a non-occurring form in normal cells, was related to the silencing of sequence homologue genes. The fact that the phenomenon seemed to be triggered by the presence of double stranded RNA (dsRNA) suggested that this could be originally a defense mechanism against viruses and transposable elements, since these originate dsRNA (Waterhouse et al., 2001).

Most of the GS phenomena are related to RNA activity within the cell. Therefore, the term RNA silencing is often used to describe GS and comprise all mechanisms by which RNA sequences regulate gene expression, except those sequences characterized as mRNAs, tRNAs, or ribosomal RNAs (Galun, 2005). Genetic and biochemical studies have confirmed that the mechanisms of RNAi, co-suppression, and virus-induced gene silencing are similar. Moreover, the biological pathways underlying dsRNA-induced GS exist in many, if not most, eukaryotic organisms (Hannon, 2002). The study of similar phenomena in different organisms (*Caenorhabditis elegans*, *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* and *Petunia x hybrida*) allowed the proposal of models for different but interacting forms of silencing.

RNA interference

According to the present model, the RNA interference pathway starts with the presence of dsRNA in the cytoplasm that vary in length and origin (Waterhouse et al., 1998; Meister & Tuschl, 2004; Lodish et al., 2005). The basic pathway for RNAi is shown in yellow in Figure 1 (A, B, C). This particular molecule is recognized by the Dicer enzyme, a member of the RNase III family of nucleases that specifically cleave double-stranded RNAs, and is evolutionarily conserved in worms, flies, plants, fungi, and mammals (Bernstein et al., 2001). This enzyme cleaves the dsRNA into shorter RNA duplexes of 21 to 28 nucleotides, which have 5' phosphate and 2-nucleotide 3' overhangs (Hamilton & Baulcombe, 1999; Bernstein et al., 2001; Elbashir et al., 2001; Meister & Tuschl, 2004). These short RNA duplexes are known as short interfering RNA (siRNA) (Baulcombe, 2004).

Several organisms contain more than one Dicer gene, with each Dicer preferentially processing dsRNAs that come from specific source (Meister & Tuschl, 2004; Margis et al., 2006). In *Arabidopsis*, for instance, DCL2 and DCL3 Dicer-like proteins seem to process long dsRNA such as transcripts containing inverted repeats (Figure 1A) or intermediates formed during RNA virus replication (Figure 1B) (Hannon, 2002). DCL2, DCL3, and DCL4 have similar functions in *Arabidopsis*, acting in siRNA processing and establishing and maintaining DNA methylation (Henderson et al., 2006). On the other hand, DCL1 processes miRNAs precursors exported from the nucleus (Figure 1D) (Xie et al., 2004).

After Dicer processes the dsRNA, the siRNAs are subsequently rearranged into the RNA-induced silencing complex (RISC) (Figure 1E) (Hammond et al., 2000; Nykänen et al., 2001). The RISC complex was originally identified through fractionation of sequence specific nuclease activity from *D. melanogaster* extracts (Hammond et al., 2001; Tolia & Joshua-Tor, 2006). The characterization of RISC includes the presence of an Argonaute protein family member and a guide strand (antisense to the target RNA) of a small RNA (Tolia & Joshua-Tor, 2006). The RISC complex is responsible for the targeting and cleavage of sequence specific mRNA within the cell (Figure 1F) (Martinez & Tuschl, 2004). RISC acts by cleaving the target mRNA in the middle of the complementary region, ten nucleotides upstream of the nucleotide paired with the 5' end of the guide siRNA (Elbashir et al., 2001). At least one protein from the Argonaute family, present in the RISC complex, probably acts as endonuclease, cleaving the target mRNAs (often referred to as the Slicer function) (Ronemus et al., 2006; Daneholt, 2007). This cleavage leads to silencing of

the target mRNA by preventing read-through of the message by the translational machinery, resulting in mRNA destruction (Figure 1G) (Tolia & Joshua-Tor, 2006). Normally there is a bias towards the loading of the antisense strand of the RNA short duplex produced by Dicer into the RISC complex. The antisense 5' end is less stable than the sense end of the duplex, favoring the antisense loading into the RISC complex after helicase processing (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003; Bartel, 2004; Meister & Tuschl, 2004). However, loading may occur by both ends into the RISC complex.

GS has an additional characteristic in plants: The silencing signal has the ability to spread systemically (Voinnet et al., 1998). The nature of the systemic signal in plants was not yet determined. However, it may be concluded that these phenomena requires firstly a system to pass a signal from cell to cell, and secondly a strategy to amplify the signal (Hannon, 2002). Apparently, it seems that the short dsRNA formed by DICER might be the answer (Figure 1H). Some evidence suggests other hypotheses. For instance, the initial long dsRNA strands could be amplified and transported with the help of movement proteins (Figure 1I) (Waterhouse et al., 2001). It has been demonstrated that plants have RNA dependent RNA polymerases (RdRP) – like enzymes that probably work amplifying the initial dsRNA thus transmitting the silencing signal (Figure 1J) (Matzke et al., 2001; Cerutti, 2003). RdRP proteins could possibly mediate primer-dependent (using siRNA) and primer-independent (aberrant RNA features) mechanisms of RNA silencing (Figure 1J and 1K) (Baulcombe, 2007). The production of dsRNA from single stranded template (ssRNA) is probably linked to the primer-independent process, so that silencing can be initiated in virus-infected plants or with transgenic RNAs. The differentiation mechanism between the viral and the transgenic RNAs targeted for silencing from the non-silenced endogenous RNAs is not clear, perhaps the ssRNA targeted for silencing presents aberrant features, which the enzyme is able to recognize (Baulcombe, 2007).

Recent models classify different siRNA in primary and secondary types (Figure 1L and 1M). Primary siRNA are generated from the activity of the Dicer enzyme, while secondary siRNA would be generated from a different pathway having the mandatory involvement of a RNA-dependent RNA Polymerase (Pak & Fire, 2007). Secondary siRNA is likely to regulate gene expression in cases where amplification of the silencing signal is important, they would also be important in cases where the original trigger for RNAi is absent (Baulcombe, 2007). The common reports of GS resulting from plant transformation were proposed

to be caused by the integration of multiple transgenes as inverted repeats leading to the formation of dsRNA (Waterhouse et al., 1998). This would initiate the RNAi pathway as previously discussed.

Transcriptional gene silencing

DNA methylation and chromatin remodeling play a major role in transcriptional gene silencing (TGS), blocking gene expression (Waterhouse et al., 2001). In TGS, silenced transgenes coding regions and promoters are densely methylated (Kooter et al., 1999). It is also proposed that the increase in DNA methylation possibly induces formation of heterochromatin, which is associated to TGS (Ye et al., 1996; Wassenecker & Pélissier, 1998; Wassenecker, 2000). DNA methylation promotes protein binding that recognizes methylated cytosine, leading to chromatin remodeling (Alberts et al., 2002), thus avoiding the binding of transcription factors (Kooter et al., 1999). In *Pinus radiata*, the extent of DNA methylation increases in mature meristematic regions when compared to juvenile regions, suggesting that methylation is involved in developmental control and aging processes (Fraga et al., 2002).

Heterochromatin can be defined as condensate chromosomal regions, which are densely stained and known for genetic inactivity (Griffiths et al., 1998). Methylation, acetylation, phosphorylation and ubiquitination of core histones H2A, H2B, H3 and H4 are implicated in gene regulation (Lippman & Martienssen, 2004). These chemical modifications within histones alter the packing state of DNA between euchromatin (active DNA) and heterochromatin (inactive DNA). Histone acetylation is one factor that can destabilize chromatin structure by altering the charge composition within chromatin (Alberts et al., 2002). Chemical alterations within histone tails may function as signals for chromatin remodeling complexes, which are responsible for regulating the accessibility of the cells transcriptional machinery to the DNA (Alberts et al., 2002). At least in plants there is a direct link between DNA methylation and histone methylation suggesting that they play a common role in transcriptional gene silencing (Lippman & Martienssen, 2004).

Early research suggested that TGS and PTGS (RNAi) were independent phenomena. However, it was later discovered that viruses and transgenes originating dsRNA induced both TGS and PTGS (RNAi), suggesting that these could be alternative, but not exclusive routes of regulation (Vaucheret & Fagard, 2001). RNA silencing has also been associated to *de novo* DNA methylation in plants (Chan et al., 2004). The fact that almost all DNA and histone methylation events are confined to transposons and repeats suggests a role

for RNAi as a targeting mechanism for specific sequence chromatin remodeling or TGS (Lippman & Martienssen, 2004). Research carried out on *Schizosaccharomyces pombe* and *Arabidopsis* indicates that the RNA-directed DNA methylation (RdDM) signal transmitted from the cytoplasm to the nucleus is most likely siRNA (Figure 1N) (Xie et al., 2004). Additionally, chromatin-based silencing guided by siRNAs may act as a genomic defense system to suppress mobile genetic elements or invasive DNA (Dawe, 2003; Schramke & Allshire, 2003).

On the other hand, RNAi effector complex termed RITS (Figure 1O) (RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing) has been described, and it seems to be required for heterochromatin assembly in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) (Verdel et al., 2004). This same work suggests a mechanism for the role of the RNAi machinery and small RNAs in targeting of heterochromatin complexes and epigenetic gene silencing at specific chromosomal loci. The present model suggests similarities between the RISC and the RITS complex. The RITS complex would target DNA sequences and/or nascent RNA transcripts initiating heterochromatin formation and consequently TGS. It is possible that similar phenomenon occurs in plants since at least ten members of the Argonaute protein family that occur in *Arabidopsis thaliana* resemble proteins present in RITS (Baulcombe, 2004; Verdel et al., 2004).

Micro RNA

MicroRNAs (miRNAs) are ~22 nt endogenous RNAs that can play important regulatory roles in animals and plants by cleavage or translational repression of mRNA (Figure 1P and 1F) (Bartel, 2004; Duan et al., 2006). These molecules comprise one of the more abundant classes of gene regulatory molecules in multicellular organisms. MicroRNAs were firstly reported in *Caenorhabditis elegans* by the discovery that the *lin-4* gene coded a pair of small RNAs instead of a protein (Lee et al., 1993). Further evidence showed that these small RNA products had antisense complementarity and were responsible for the translational regulation of another gene, the *lin-14* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). *Lin-14* mRNAs levels were not altered but the protein output of the gene was reduced.

In plants, miRNAs are involved in the control of leaf and flower development (Aukerman & Sakai, 2003; Emery et al., 2003; Palatnik et al., 2003; Chen, 2004). It appears that a substantial fraction of the gene regulatory molecules in plants could be RNA rather than protein transcription factors (Bartel, 2004). Plant ~22 nt long miRNAs are endogenously expressed and po-

tentially processed from one arm foldback precursors. These molecules are also generally conserved in evolution and come from regions of the genome distinct from previously annotated genes (Reinhart et al., 2002). Recent data demonstrates that miRNAs are also involved in other mechanisms such as stress and environmental change response (Bonnet et al., 2006).

MicroRNAs and siRNAs have a shared central biogenesis and can perform interchangeable biochemical functions. Therefore, these two classes of silencing RNAs cannot be distinguished by either their chemical composition or mechanism of action (Bartel, 2004). However, some distinction can be made regarding origin, evolutionary conservation and types of genes they silence: (i) miRNAs derive from genomic loci distinct from other recognized genes, whereas siRNA often derive from mRNAs, transposons, viruses, or heterochromatic DNA; (ii) miRNAs are processed from transcripts that can form local RNA hairpin structures (Figure 1D), whereas siRNAs are processed from long bimolecular RNA duplexes or extended hairpins; (iii) a single stranded mature miRNA is generated from each miRNA hairpin precursor molecule, whereas a multitude of siRNA duplexes are generated from each siRNA precursor molecule, leading to many different siRNA accumulating from both strands of this extended dsRNA; (iv) miRNA sequences are nearly always conserved in related organisms, whereas endogenous siRNA sequences are rarely conserved (Bartel & Bartel, 2003).

MicroRNAs in plants are probably processed by DCL1 (Dicer) in the nucleus (Papp et al., 2003), and its molecular pathway is exclusively linked to a dsRNA binding protein (HYL1) (Vazquez et al., 2004). Mature miRNA can be loaded into RISC or microRNA effector complex (miRNP), the first directs mRNA cleavage and the second is responsible for translational repression (Meister & Tuschl, 2004). Preferentially plant miRNA use RNA target cleavage instead of translational suppression and are nearly perfectly paired to their targets (Rhoades et al., 2002).

Recently, it has been demonstrated that the modification of plant endogenous miRNA precursors to interfere with viral mRNA sequences can confer virus resistance in *Arabidopsis thaliana* (Niu et al., 2006). These modified miRNA are termed artificial miRNA and this technique will open new perspectives for engineering viral resistant plants.

Virus induced gene silencing (VIGS)

Virus induced gene silencing is a technique designed to suppress gene expression and study gene function in plants (Robertson, 2004). VIGS can be defined as the silencing of endogenous plant genes initi-

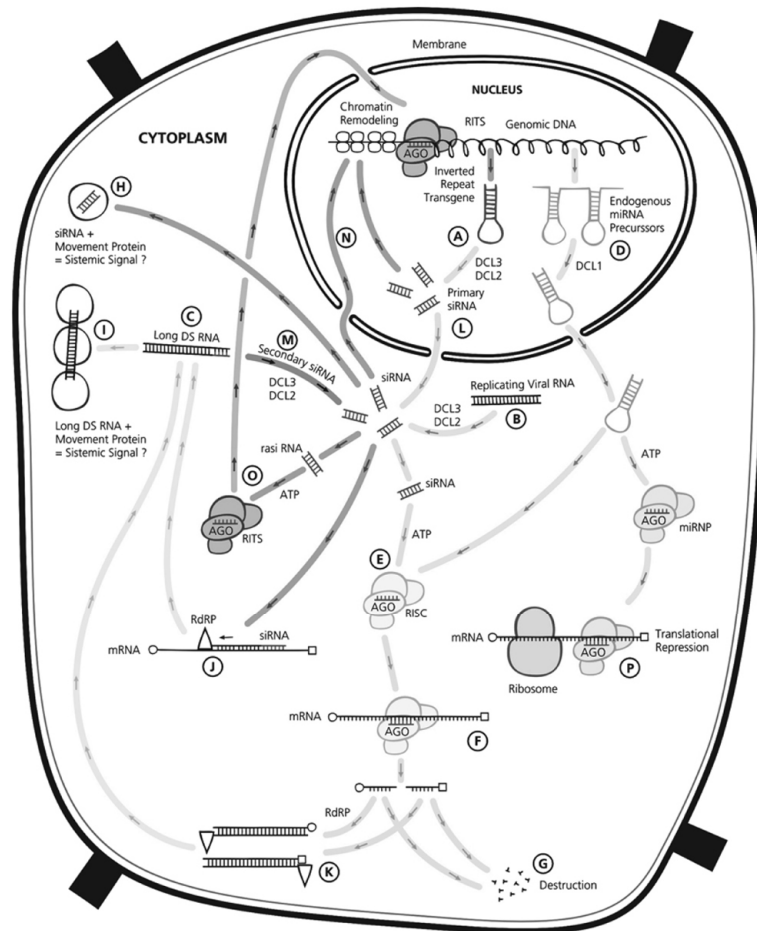


Figure 1 - Gene Silencing pathways in plant cells. (A) Dicer-like protein (DCL2, DCL3) processing of transcripts containing inverted repeats (Meister & Tuschl, 2004); (B) Dicer-like protein (DCL2, DCL3) processing of intermediates formed during RNA virus replication (Hannon, 2002); (C) Long dsRNA; (D) Dicer-like protein (DCL1) processing of miRNAs precursors (Xie et al., 2004); (E) RNA-induced silencing complex (RISC) (Hammond et al., 2000; Nykänen et al., 2001); (F) Targeting and cleavage of sequence specific mRNA by RISC (Martinez & Tuschl, 2004); (G) mRNA destruction after RISC processing (Tolia & Joshua-Tor, 2006); (H) Possible systemic signal composed by siRNA + movement proteins; (I) Possible systemic signal composed by long dsRNA + movement proteins (Waterhouse et al., 2001); (J) Primer dependent RdRP amplification (Matzke et al., 2001; Ceruti, 2003; Baulcombe, 2004); (K) Primer-independent (aberrant RNA features) RdRP amplification (Baulcombe, 2004); (L) Primary siRNA (Pak & Fire, 2007); (M) Secondary siRNA processing by Dicer-like enzymes (Pak & Fire, 2007); (N) RNA-directed DNA methylation (RdDM) signal transmitted from the cytoplasm to the nucleus is most likely siRNA (Xie et al., 2004); (O) RNAi effector complex termed RITS (RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing) required for heterochromatin assembly in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) (Verdel et al., 2004). RITS is composed by repeat-associated short interfering RNA (rasiRNA) (Meister & Tuschl, 2004); (P) Translational repression of mRNA by miRNP (Meister & Tuschl, 2004).

ated by recombinant viral vectors (Ruiz et al., 1998). The model includes viral dependent initiation and viral independent maintenance of VIGS. The approach consists of cloning and inserting plant endogenous gene sequences in recombinant viral vectors, which are then inoculated in plants, triggering PTGS / RNAi. This ends up silencing plant genes with homologous sequences to those contained in the viral vectors (Burch-Smith et al., 2004).

In early approaches on VIGS studies, gene sequences were individually subcloned into viral genomes, and plants were physically inoculated using viral RNA produced by in-vitro transcriptional reactions (Kumagai et al., 1995). The previously described technique is time consuming and produces variable results, only being used when dealing with limited number of genes (Burch-Smith et al., 2004). An easier method for plant infection would be the use of agroinfiltration of viral cloned vectors (Robertson, 2004). VIGS protocols can be optimized by the insertion of viral RNA genomes in binary vectors for agroinfiltration (Ratcliff et al., 2001). This technique uses *Agrobacterium* tissue infiltration for T-DNA transfer of encoded genes that will be transferred into the cells of the infiltrated region, and transcribed into the viral cDNAs, these transcripts would then serve as inocula to initiate systemic infection of the plant (Ratcliff et al., 2001). The use of this form of viral inoculation has the advantage of not having to produce in-vitro viral transcripts.

VIGS is a powerful tool due to its fast initiation of silencing in intact wild-type or transgenic plants (Robertson, 2004). VIGS has been utilized to investigate individual gene and gene family functions (Burch-Smith et al., 2004). Phenotypic variations attributed to gene suppression by VIGS can be obtained in a relatively short period of time. It is possible to silence genes in mature plants using this technique. Therefore, no plant transformation is necessary since the silencing is induced by the viral infection. The limitation of this approach resides in the viral host range, pattern of viral spreading, and symptoms caused by the infection.

APPLICATIONS OF GENE SILENCING IN WOODY PLANTS

Yield of woody plants is a result of growth that depends on several aspects of the physiological machinery (Kozłowski et al., 1991). GS is a powerful tool in an attempt to better understand the organization of this machinery, specially regarding biochemical pathways and gene function. Woody plants have great economic importance in agriculture and economy of several countries in the world. Wood, cellulose, fruit, resins, rubber, oils and nuts are some of the products de-

rived from woody plants. In order to guarantee the sustainability of woody crops, it is necessary to keep the high quality and yield levels. For these purposes, conventional breeding programs have been extensively conducted. However, these programs have not been enough to supply short-termed solutions for these crops. Woody plants normally have slower growth rates than herbaceous plants as well as longer juvenile periods. These characteristics speeds down breeding projects in this area. Similar problems occur in woody fruit crop breeding as well as others such as highly heterozygous material, polyploidy, nucellar polyembryony, pollen and ovule sterility, and sexual incompatibility, which have limited progress towards the production of new cultivars through conventional breeding programs (Janick & Moore, 1975; Costa et al., 2003).

The introduction of biotechniques in breeding programs for woody plants was motivated by the search for pest and disease resistance and to fulfill the demands of the consumer market. Transgenesis is an important alternative for engineering traits into forest trees and developing basic research in gene function (Kumar & Fladung, 2003). In this scenario, genetic transformation came into context and, consequently, the application of GS technology.

After the genetic transformation of the first model plant (tobacco) (Herrera-Estrella et al., 1983) as well as other rapid growing species, the next step was to obtain transgenic woody plants. This has proven to be a tough challenge since woody plants are harder to transform and require a long evaluation process. More than 16 species of woody plants were transformed between 1988 and 2000 (Rautner, 2001). These transformations were focused on several traits such as herbicide resistance, insect resistance, virus resistance, lignin biosynthesis, marker genes, and self-sterility suppression. Some of these traits are obtained by specific transgene expression into proteins. However, others are achieved by silencing of transgenes or endogenous genes.

Some of the woody plant species that have been used in GS research includes *Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing. (Dominguez et al., 2002b; Fagoaga et al., 2006), *Prunus* sp. (Ravelonandro et al., 2000; Scorza et al., 2001; Hily et al., 2004; 2005; Di Nicola-Negri et al., 2005; Zhang et al., 2006), *Populus* sp. (Jouanin et al., 2000; Kumar & Fladung, 2001; Hawkins et al., 2003), *Solanum dulcamara* L. (Curtis et al., 2000), *Malus domestica* Borkh. (Ko et al., 1998; Dandekar et al., 2004; Viss et al., 2003; Broothaerts et al., 2004; Gilissen et al., 2005; Teo et al., 2006), *Pinus radiata* D. Don. (Moller et al., 2005; Tang et al., 2005a; 2005b; Wagner et al., 2005; Tang et al., 2006), *Juglans regia*

L. (Escobar et al., 2002), *Coffea canephora* (Ogita et al., 2003), *Eucalyptus* sp. (Valério et al., 2003; Sasaki et al., 2005), *Caryca papaya* (Tennant et al., 2001), and *Actinidia deliciosa* (A.Chev.) C.F. Liang et A.R. Ferguson (Fung et al., 1998).

GENE SILENCING AND PLANT DISEASE RESISTANCE

Woody crops are particularly susceptible to systemic virus diseases because of their long-term life span. Once infected by viruses, these plants must be rouged. Virus disease resistance in plants may be achieved by several approaches, including coat protein mediated protection (Fitch et al., 1992), antisense RNA, replicase mediated protection (Romano & Monte, 1999), PTGS (Lindbo & Dougherty, 1992), RNAi, and pathogen derived resistance (PDR) (Sanford & Johnston, 1985). The concept of PDR suggests that the resistance to a determined pathogen could be obtained from its own genetic material. The quest for virus resistant plants led researchers to accidentally discover the PTGS phenomenon (Angell & Baulcombe, 1997) and aid the establishment of RNAi models. Currently, RNAi is the major strategy in plant transformation for virus resistance. *Citrus tristeza virus* (CTV) - resistant citrus plants, expressing the coat protein of the virus has been obtained (Domínguez et al., 2000; Domínguez et al., 2002a). In this work, virus resistance was related to the accumulation of the transgenic viral protein in the plant tissue. The mechanism proposed was pathogen derived resistance.

Scorza et al. (2001) demonstrated for the first time that PTGS (RNAi) functions as a mechanism for virus resistance in a woody perennial species. They obtained resistant transgenic plums containing the silenced *Plum pox virus* (PPV) coat protein gene. Signs of PTGS could be observed within the resistant plants such as high level of transgene transcription in the nucleus, low levels of transgene mRNA in the cytoplasm, a complex multicopy transgene insertion with aberrant copies, and methylation of the silenced PPV-CP transgene. Other strategies such as the expression of PPV-specific hairpins in plums have also been effective (Di Nicola-Negri et al., 2005; Zhang et al., 2006). In another case, transgenic viral protein accumulation was negatively correlated to resistance. Silenced transgenic citrus lines for the p23 CTV - silencing suppressor were resistant to CTV. PTGS seems to be the best explanation for these results since resistant citrus plants had multiple copies of the transgene, low levels of the corresponding mRNA, methylation of the silenced transgene, and accumulation of the p23-specific small interfering RNAs (siRNAs) (Fagoaga et al., 2006).

Despite of the potential application of GS as a viral defense system, there is a drawback. Viruses have developed RNAi suppression strategies during co-evolution with plants. The main strategy used by both RNA and DNA viruses is the incorporation of silencing suppressor proteins into their genomes (Moissiard & Voinnet, 2004). It is suggested that dsRNA binding is one of the main strategies used by viral silencing suppressors. The model proposes the sequestering of long and/or short dsRNA molecules preventing the proper functioning of the RNA silencing pathways (Merai et al., 2006). CTV, for instance, is known to contain at least three distinct suppressors of RNAi. Proteins p20, p23, and the coat protein act in different stages of RNAi, affecting both intercellular (p20 and coat protein) and intracellular (p20 and p23) silencing (Lu et al., 2004). RNAi suppressor proteins can alter the pattern of gene expression in virus hosts, since they affect both miRNA and siRNA pathways, leading to developmental abnormalities and possibly viral symptoms (Voinnet, 2005). Ectopic expression of the CTV p23 gene in Mexican limes (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) caused aberrations resembling viral leaf symptoms (Fagoaga et al., 2006). In order to obtain virus resistant plants through GS techniques it is important to understand all of the viral counter defense strategies.

Silencing has also been applied in an effort to protect plants against the crown gall disease, caused by *Agrobacterium tumefaciens* (Escobar et al., 2001). This disease is economically important in fruit and nut orchards, vineyards, and nurseries (Viss et al., 2003). A protection technique based on the silencing of two conserved *Agrobacterium* genes – tryptophan monooxygenase (*iaaM*) and isopentenyl transferase (*ipt*) – have been developed (Escobar et al., 2001; 2002). Inducers of PTGS (self complementary transgenes) homologous to *iaaM* and *ipt* were expressed in *Juglans regia* L., resulting in degradation of oncogene mRNA *in planta* and functional resistance. Crown gall resistant apple tree roots were obtained by transformation with transgenes designed to express double-stranded RNA from the *iaaM* and *ipt* genes (Viss et al., 2003).

GENE SILENCING AND WOOD QUALITY, FRUIT QUALITY AND OTHER TRAITS

During chemical pulping of wood, one of the most expensive and environmentally hazardous processes is to separate lignin from cellulose and hemicellulose (Pilate et al., 2002). The production of plant material with lower contents of lignin would mean a significant reduction of cost and pollution to the paper industry. One of the approaches to obtain reduced lignin forest trees has been the down regulation of lignin

biosynthesis pathways (Hu et al., 1999). The main genes involved with genetic transformation targeting lignin reduction are 4-coumarate: coenzyme A ligase (*Pt4CL1*) (Hu et al., 1999), cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD - the final enzyme in the biosynthesis of lignin monomers) (Baucher et al., 1996) and caffeate/5-hydroxyferulate O-methyltransferase (COMT - enzyme involved in syringyl lignin synthesis) (Lapierre et al., 1999).

The downregulation of the *Pt4CL1* gene in *Populus tremuloides* Michx., produced trees with a 45% reduction of the lignin content compensated by a 15% increase in the cellulose content. In the transgenic lines obtained plant growth was substantially enhanced, and structural integrity maintained both at the cellular and whole-plant levels (Hu et al., 1999).

Silencing was also registered when trying to boost up the expression of the caffeic acid O-methyltransferase (COMT) in *Populus tremula* X *Populus alba*. On some transgenic lines, silencing of the transgene was observed, and the down regulation of COMT reduced the lignin levels in 6-month-old *Populus tremula* X *Populus alba*. This was the first report of lignin reduction in COMT down regulated plants (Jouanin et al., 2000).

Cad GS by transgenic inverted repeats has been reported in *Pinus radiata* (Wagner et al., 2005). The authors also suggested that there are similar mechanisms of GS for angiosperms and gymnosperms species. In order to become rate limiting in lignin biosynthesis, CAD levels must be significantly reduced in *Pinus radiata* and conifers (Moller et al., 2005). In *Eucalyptus camaldulensis* the reduction of CAD activity by using antisense transgenes did not result in lignin reduction in transformed plants (Valério et al., 2003).

In some woody plants, self-incompatibility stands as a major problem in fruit set and breeding programs. Broothaerts et al. (2004), reported the production of transgenic apple trees able to self pollinate and develop fruit. This break through was achieved by silencing of the S-gene responsible for self-incompatibility. The self-compatible transgenic plants lacked the pistil S-RNase protein, which is the product of the S-gene.

Fruit quality has also been addressed by silencing experiments. Several characteristics are involved in fruit quality. Transgenic apple fruits silencing key enzymes involved in autocatalytic ethylene production were significantly firmer and displayed an increased shelf-life (Dandekar et al., 2004). Apples containing reduced amounts of the Mal d 1 allergen were obtained by the expression of an intron spliced hairpin RNA containing Mal d 1-specific inverted repeat sequences (Gilissen et al., 2005). According to these reports, it is possible to produce transgenic hypoallergenic apples

using RNAi. Research on leaf sorbitol silencing suggests that sorbitol distribution affects fruit quality such as starch accumulation and sugar-acid balance (Teo et al., 2006). In *Citrus*, the down regulation of putative thermostable pectin methylesterase genes is projected as a possible solution for the undesirable separation of juice into clear serum and particulate phase (Guo et al., 2005). In this case, RNAi could be used to achieve this goal.

FINAL REMARKS AND PERSPECTIVES

GS techniques represent great opportunities for plant breeding. Several practical applications in economically important crops are possible as well as research on gene function and expression. So far, the basic pathways of gene silencing in plants have been described as shown in this work. There is still much to investigate such as the molecular structures of the proteins involved, the nature of the systemic signal and the stability of these pathways in a given time frame.

RNAi stability in plants is a very important feature to be accessed in the near future as well as the development of tissue specific and inducible promoters. These are two crucial points for the establishment of this technology as a marketable option. Control of metabolic pathways will also represent a major challenge when trying to obtain plants with altered levels of specific metabolites. The use of artificial miRNA to engineer viral resistant plants also shows great potential.

Continuing research on GS in woody plants will probably include plant protection to multiple pathogens (viruses, bacteria), silencing of specific metabolic pathways (lignin synthesis, ethylene, allergens, caffeine and others), improvement of fruit and wood quality, production of secondary metabolites, and developmental and reproductive trait alteration in plants (induced male sterility and self-compatibility). The ability to switch off genes and interfere with expression patterns in plants, provided by gene silencing techniques, will probably represent a great impact in woody plant breeding.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. Leandro Peña and Dr. Rogério Margis for critical comments and suggestions, and Fernanda dos Santos Pereira de Souza for technical assistance and graphical design to elaborate Figure 1.

REFERENCES

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular biology of the cell*. 4.ed. New York: Garland Science, 2002. 1463p.

- ANGELL, S.M.; BAULCOMBE, D.C. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. **The EMBO Journal**, v.16, p.3675-3684, 1997.
- AUKERMAN, M.J.; SAKAI, H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. **The Plant Cell**, v.15, p.2730-3741, 2003.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. **Cell**, v.116, p.281-297, 2004.
- BARTEL, B.; BARTEL, D.P. MicroRNAs: At the root of plant development? **Plant Physiology**, v.132, p.709-717, 2003.
- BAUCHER, M.; CHABBERT, B.; PILATE, G.; VAN DOORSSELAERE, J.; TOLLIER, M.T.; PETIT-CONIL, M.; CORNU, D.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in Poplar. **Plant Physiology**, v.112, p.1479-1490, 1996.
- BAULCOMBE, D.C. RNA silencing in plants. **Nature**, v.431, p.356-363, 2004.
- BAULCOMBE, D.C. Amplified silencing. **Science**, v.315, p.199-200, 2007.
- BERNSTEIN, E.; CAUDY, A.A.; HAMMOND, S.M.; HANNON, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v.409, p.363-366, 2001.
- BONNET, E.; DE PEER, Y.V.; ROUZE, P. The small RNA world of plants. **New Phytologist**, v.171, p.451-468, 2006.
- BRIGNETTI, G.; VOINNET, O.; LI, W.; JI, L.; DING, S.; BAULCOMBE, D.C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **The EMBO Journal**, v.17, p.6739-6746, 1998.
- BROTHAERTS, W.; KEULEMANS, J.; VAN NERUM, I. Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing. **Plant Cell Reports**, v.22, p.497-501, 2004.
- BURCH-SMITH, T.M.; ANDERSON, J.C.; MARTIN, G.B.; DINESH-KUMAR, S.P. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. **The Plant Journal**, v.39, p.734-746, 2004.
- CERUTTI, H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? **Trends in Genetics**, v.19, p.39-46, 2003.
- CHAN, S.W.L.; ZILBERMAN, D.; XIE, Z.; JOHANSEN, L.K.; CARRINGTON, J.C.; JACOBSEN, S.E. RNA silencing genes control de novo DNA methylation. **Science**, v.303, p.1336, 2004.
- CHEN, X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. **Science**, v.303, p.2022-2025, 2004.
- COGONI, C.; MACINO, G. Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.94, p.10233-10238, 1997.
- COSTA, M.A.P. de C.; MENDES, B.J.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Somatic hybridization for improvement of citrus rootstocks: production of five new combinations with potential for improved disease resistance. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.43, p.1151-1156, 2003.
- CURTIS, I.S.; POWER, J.B.; HEDDEN, P.; PHILLIPS, A.; LOWE, K.C.; WARD, D.A.; DAVEY, M.R. Transformation and characterization of transgenic plants of *Solanum dulcamara* L. - Incidence of transgene silencing. **Annals of Botany**, v.86, p.63-71, 2000.
- DANDEKAR, A.M.; TEO, G.; DEFILIPPI, B.G.; URATSU, S.L.; PASSEY, A.J.; KADER, A.A.; STOW, J.R.; COLGAN, R.J.; JAMES, D.J. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. **Transgenic Research**, v.13, p.373-384, 2004.
- DANEHOLT, B. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006** - Advanced Information. Available at: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/adv.html. Accessed at: 14 fev. 2007.
- DAVULURI, G.R.; VAN TUINEN, A.; FRASER, P.D.; MANFREDONIA, A.; NEWMAN, R.; BURGESS, D.; BRUMMELL, D.A.; KING, S.R.; PALYS, J.; UHLIG, J.; BRAMLEY, P.M.; PENNING, H.M.J.; BOWLER, C. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. **Nature Biotechnology**, v.23, p.890-895, 2005.
- DAWE, R.K. RNA interference, transposons, and the centromere. **The Plant Cell**, v.15, p.297-301, 2003.
- DI NICOLA-NEGRI, E.; BRUNETTI, A.; TAVAZZA, M.; ILARDI, V. Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. **Transgenic Research**, v.14, p.989-994, 2005.
- DOMÍNGUEZ, A.; DE MENDOZA, A.H.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, v.19, p.427-433, 2000.
- DOMÍNGUEZ, A.; DE MENDOZA, A.H.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. **Molecular Breeding**, v.10, p.1-10, 2002a.
- DOMÍNGUEZ, A.; FAGOAGA, C.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. **Molecular Genetics Genomics**, v.267, p.544-556, 2002b.
- DUAN, C.G.; WANG, C.H.; GUO, H.S. Regulation of microRNA on plant development and viral infection. **Chinese Science Bulletin**, v.51, p.269-278, 2006.
- ELBASHIR, S.M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21 and 22 nt RNAs. **Genes & Development**, v.15, p.188-200, 2001.
- EMERY, J.F.; FLOYD, S.K.; ALVAREZ, J.; ESHED, Y.; HAWKER, N.P.; IZHAKI, A.; BAUM, S.F.; BOWMAN, J.L. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. **Current Biology**, v.13, p.1768-1774, 2003.
- ESCOBAR, M.A.; CIVEROLO, E.L.; SUMMERFELT, K.R.; DANDEKAR, A.M. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.98, p.13437-13442, 2001.
- ESCOBAR, M.A.; LESLIE, C.A.; MCGRANAHAN, G.H.; DANDEKAR, A.M. Silencing crown gall disease in walnut (*Juglans regia* L.). **Plant Science**, v.163, p.591-597, 2002.
- FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; DE MENDOZA, A.H.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. **Plant Molecular Biology**, v.60, p.153-165, 2006.
- FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v.391, p.806-811, 1998.
- FITCH, M.M.M.; MANSHARDT, R.M.; GONSALVES, D.; SLIGHTOM, J.L.; SANFORD, J.C. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. **Nature Biotechnology**, v.10, p.1466-1472, 1992.
- FRAGA, M.F.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M.J. Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. **Tree Physiology**, v.22, p.813-816, 2002.
- FUNG, R.W.M.; JANSSEN, B.J.; MORRIS, B.A.; GARDNER, R.C. Inheritance and expression of transgenes in kiwifruit. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.26, p.169-179, 1998.
- GALUN, E. RNA silencing in plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.41, p.113-123, 2005.

- GILISSEN, L.J.W.J.; BOLHAAR, S.T.H.; MATOS, C.I.; ROUWENDAL, G.J.A.; BOONE, M.J.; KRENS, F.A.; ZUIDMEER, L.; VAN LEEUWEN, A.; AKKERDAAS, J.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; KNULST, A.C.; BOSCH, D.; VAN DE WEG, W.E.; VAN REE, R. Silencing of the major apple allergen Mal 1 by using RNA interference approach. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.115, p.364-369, 2005.
- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C. GELBART, W.M. **Introdução à genética**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 856p.
- GUO, W.; DUAN, Y.; OLIVARES-FUSTER, O.; WU, Z.; ARIAS, C.R.; BURNS, J.K.; GROSSER, J.W. Protoplast transformation and regeneration of transgenic Valencia sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methyltransferase. **Plant Cell Reports**, v.24, p.482-486, 2005.
- GURA, T. A silence that speaks volumes. **Nature**, v.404, p.804-808, 2000.
- GUTIÉRREZ-E, M.A.; LUTH, D.; MOORE, G.A. Factors affecting agrobacterium-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium L.*) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, v.16, p.745-753, 1997.
- HAMILTON, A.J.; BAULCOMBE, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v.286, p.950-952, 1999.
- HAMMOND, S.M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; HANNON, G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, v.404, p.293-296, 2000.
- HAMMOND, S.M.; BOETTCHER, S.; CAUDY, A.A.; KOBAYASHI, R.; HANNON, G.J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. **Science**, v.293, p.1146-1150, 2001.
- HANNON, G.J. RNA interference. **Nature**, v.418, p.244-251, 2002.
- HAWKINS, S.; LEPLÉ, J.C.; CORNU, D.; JOUANIN, L.; PILATE, G. Stability of transgene expression in poplar: A model forest tree species. **Annals of Forest Science**, v.60, p.427-438, 2003.
- HENDERSON, I.R.; ZHANG, X.; LU, C.; JOHNSON, L.; MEYERS, B.C.; GREEN, P.J.; JACOBSEN, S.E. Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. **Nature Genetic**, v.38, p.721-725, 2006.
- HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. **Nature**, v.303, p.209-213, 1983.
- HILY, J.M.; SCORZA, R.; MALINOWSKI, T.; ZAWADZKA, B.; RAVELONANDRO, M. Stability of gene silencing-based resistance to Plum pox virus in transgenic plum (*Prunus domestica L.*) under field conditions. **Transgenic Research**, v.13, p.427-436, 2004.
- HILY, J.M.; SCORZA, R.; WEBB, K.; RAVELONANDRO, M. Accumulation of the long class of siRNA is associated with resistance to Plum pox virus in a transgenic woody perennial plum tree. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, p.794-799, 2005.
- HU, W.; HARDING, S.A.; LUNG, J.; POPKO, J.L.; RALPH, J.; STOKKE, D.D.; TSAI, C.; CHIANG, V.L. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. **Nature Biotechnology**, v.17, p.808-812, 1999.
- JOUANIN, L.; GOUJON, T.; DE NADAI, V.; MARTIN, M.T.; MILA, I.; VALLET, C.; POLLET, B.; YOSHINAGA, A.; CHABBERT, B.; PETIT-CONIL, M.; LAPIERRE, C. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. **Plant Physiology**, v.123, p.1363-1373, 2000.
- JANICK, J.; MOORE, J.N. **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. 623p.
- KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S. D. Functional siRNA and miRNA exhibit strand bias. **Cell**, v.115, p.209-216, 2003.
- KO, K.; BROWN, S.K.; NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S. Alterations in nptIIand gus expression following micropropagation of transgenic M7 apple rootstock lines. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.123, p.11-18, 1998.
- KOOTER, J.M.; MATZKE, M.A.; MEYER, P. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. **Trends in Plant Science**, v.4, p.340-347, 1999.
- KOZLOWSKI, T.T.; KRAMER, P.J.; PALLARDY, S.G. **The physiological ecology of woody plants**. San Diego: Academic Press, 1991. 657p.
- KUMAGAI, M.H.; DONSON, J.; DELLACIOPPA, G.; HARVEY, D.; HANLEY, K.; GRILL, L.K. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.92, p.1679-1683, 1995.
- KUMAR, S.; FLADUNG, M. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. **Planta**, v.213, p.731-740, 2001.
- KUMAR, D.; FLADUNG, M. Forest tree transgenesis and functional genomics: From fast forward to reverse genetics. **Silvae Genetica**, v.52, p.229-232, 2003.
- LAPIERRE, C.; POLLET, B.; PETIT-CONIL, M.; TOVAL, G.; ROMERO, J.; PILATE, G.; LEPLÉ, J.; BOERJAN, W.; FERRET, V.; DE NADAI, V.; JOUANIN, L. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. **Plant Physiology**, v.119, p.153-164, 1999.
- LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v.75, p.843-854, 1993.
- LINDBO, J.A.; DOUGHERTY, W.G. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. **Virology**, v.189, p.725-733, 1992.
- LIPPMAN, Z.; MARTIENSSON, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, v.431, p.364-370, 2004.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KREIGER, M.; SCOTT, M.P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Biologia celular e molecular**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 1054p.
- LU, R.; FOLIMONOV, A.; SHINTAKU, M.; LI, W.; FALK, B.W.; DAWSON, W.O.; DING, S. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v.101, p.15742-15747, 2004.
- MANSOOR, S.; AMIN, I.; HUSSAIN, M.; ZAFAR, Y.; BRIDDON, R.W. Engineering novel traits in plants through RNA interference. **Trends in Plant Science**, v.11, p.559-565, 2006.
- MARGIS, R.; FUSARO, A.F.; SMITH, N.A.; CURTIN, S.J.; WATSON, J.M.; FINNEGAN, E.J.; WATERHOUSE, P.M. The evolution and diversification of Dieters in plants. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.180, p.2442-2450, 2006.
- MARTINEZ, J.; TUSCHL, T. RISC is a 5-phosphomonoester-producing RNA endonuclease. **Genes & Development**, v.18, p.975-980, 2004.
- MATZKE, M.; MATZKE, A.J.M.; KOOTER, J.M.RNA: Guiding gene silencing. **Science**, v.293, p.1080-1083, 2001.
- MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v.431, p.343-349, 2004.
- MERAI, Z.; KERENYI, Z.; KERTESZ, S.; MAGNA, M.; LAKATOS, L.; SILHAVY, D. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. **Journal of Virology**, v.80, p.5747-5756, 2006.

- MOISSIARD, G.; VOINNET, O. Viral suppression of RNA silencing in plants. **Molecular Plant Pathology**, v.5, p.71–82, 2004.
- MOLLER, R.; STEWARD, D.; PHILLIPS, L.; FLINT, H.; WAGNER, A. Gene silencing of cinnamyl alcohol dehydrogenase in pinus radiata callus cultures. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.1061-1066, 2005.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, v.2, p.279-289, 1990.
- NIU, Q.W.; LIN, S.S.; REYES, J.L.; CHEN, K.C.; WU, H.W.; YEH, S.D.; CHUA, N.H. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. **Nature Biotechnology**, v.24, p.1420-1428, 2006.
- NYKÄNEN, A.; HALEY, B.; ZAMORE, P.D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. **Cell**, v.107, p.309-321, 2001.
- OGITA, S.; UEFUJI, H.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. RNA interference: Producing decaffeinated coffee plants. **Nature**, v.423, p.823, 2003.
- PAK, J.; FIRE, A. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. **Science**, v.315, p.241-244, 2007.
- PALATNIK, J.F.; ALLEN, E.; WU, X.; SCHOMMER, C.; SCHWAB, R.; CARRINGTON, J.C.; WEIGEL, D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. **Nature**, v.425, p.257–263, 2003.
- PAPP, I.; METTE, M.F.; AUFSATZ, W.; DAXINGER, L.; SCHAUER, S.E.; RAY, A.; VAN DER WINDEN, J.; MATZKE, M.; MATZKE, A.J.M. Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short Interfering RNA precursors. **Plant Physiology**, v.132, p.1382-1390, 2003.
- PILATE, G.; GUINEY, E.; HOLT, K.; PETIT-CONIL, M.; LAPIERRE, C.; LEPLÉ, J.; POLLET, B.; MILA, I.; WEBSTER, E.A.; MARSTORP, H.G.; HOPKINS, D.W.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W.; SCHUCH, W.; CORNU, D.; HALPIN, C. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. **Nature Biotechnology**, v.20, p.607-612, 2002.
- RATCLIFF, F.; MARTIN-HERNANDEZ, A.M.; BAULCOMBE, D.C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. **The Plant Journal**, v.25, p.237-245, 2001.
- RAUTNER, M. Designer trees. **Biotechnology and Development Monitor**, v.44, p.2-7, 2001.
- RAVELONANDRO, M.; SCORZA, R.; CALLAHAN, A.; LEVY, L.; JACQUET, C.; MONSION, M.; DAMSTEEGT, V. The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model. **Virus Research**, v.71, p.63-69, 2000.
- REINHART, B.J.; WEINSTEIN, E.G.; RHOADES, M.W.; BARTEL, B.; BARTEL, D.P. MicroRNAs in plants. **Genes & Development**, v.16, p.1616-1626, 2002.
- RHOADES, M.W.; REINHART, B.J.; LIM, L.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, B.; BARTEL, D.P. Prediction of plant microRNA targets. **Cell**, v.110, p.513-20, 2002.
- ROBERTSON, D. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. **Annual Review in Plant Biology**, v.55, p.495–519, 2004.
- ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v.6, p.3343-3353, 1992.
- ROMANO, E.; MONTE, D.C. Plantas transgênicas resistentes a vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1999. v.2, p.783-814.
- RONEMUS, M.; VAUGHN, M.V.; MARTIENSSEN, R.A. MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by Argonaute, Dicer and RNA-dependent RNA polymerase in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.18, p.1559-1574, 2006.
- RUIZ, M.T.; VOINNET, O.; BAULCOMBE, D.C. Initiation and Maintenance of Virus-Induced Gene Silencing. **The Plant Cell**, v.10, p.937-946, 1998.
- SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. The concept of parasite-derived resistance – deriving resistance genes from the parasites own genome. **Journal of Theoretical Biology**, v.113, p.395-405, 1985.
- SASSAKI, F.T.; CAMPOS-PEREIRA, T.; MAIA, I de G. The post-transcriptional gene silencing pathway in Eucalyptus. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p.496-500, 2005.
- SCHRAMKE, V.; ALLSHIRE, R. Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. **Science**, v.301, p.1069–1074, 2003.
- SCHWARZ, D.S.; HUTVAGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P.D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v.115, p.199-208, 2003.
- SCORZA, R.; CALLAHN, A.; LEVY, L.; DAMSTEEGT, V.; WEBB, K.; RAVELONANDRO, M. Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. **Transgenic Research**, v.10, p.201-209, 2001.
- SEGAL, G.; SONG, R.T.; MESSING, J. A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. **Genetics**, v.165, p.387-397, 2003.
- TANG, W.; KINKEN, K.; NEWTON, R.J. Inducible antisense-mediated post-transcriptional gene silencing in transgenic pine cells using green fluorescent protein as a visual marker. **Plant and Cell Physiology**, v.46, p.1255-1263, 2005a.
- TANG, W.; WEIDNER, D.; NEWTON, R.J. Quantitative analysis of siRNA-mediated GFP silencing in transgenic pine cells. **Plant Science**, v.168, p.741-746, 2005b.
- TANG, W.; NEWTON, R.J.; WEIDNER, D.A. Differential gene silencing induced by short interfering RNA in cultured pine cells associates with the cell cycle phase. **Planta**, v.224, p.53-60, 2006.
- TENNANT, P.; FERMIN, G.; FITCH, M.M.; MANSHARDT, R.M.; SLIGHTOM, J.L.; GONSALVES, D. Papaya ringspot virus resistance of transgenic rainbow and sunup is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.645-653, 2001.
- TEO, G.; SUZUKI, Y.; URATSU, S.L.; LAMPIEN, B.; ORMONDE, N.; HU, W.K.; DEJONG, T.M.; DANDEKAR, A.M. Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v.103, p.18842-18847, 2006.
- TOLIA, N.H.; JOSHUA-TOR, L. Slicer and the Argonautes. **Nature Chemical Biology**, v.3, p.36-43, 2006.
- VALÉRIO, L.; CARTER, D.; RODRIGUESM, J.C.; TOURNIER, V.; GOMINHO, J.; MARQUE, C.; BOUDET, A.; MAUNDERS, M.; PEREIRA, H.; TEULIÈRES, C. Down regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a lignification enzyme, in *Eucalyptus camaldulensis*. **Molecular Breeding**, v.12, p.157–167, 2003.
- VAUCHERET, H.; FAGARD, M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. **Trends in Genetics**, v.17, p.29-35, 2001.
- VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, v.114, p.3083-3091, 2001.
- VAZQUEZ, F.; GASCIOLLI, V.; CRÉTÉ, P.; VAUCHERET, H. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. **Current Biology**, v.14, p.346-351, 2004.
- VERDEL, A.; JIA, S.; GERBER, S.; SUGIYAMA, T.; GYGI, S.; GREWAL, S.I.S.; MOAZED, D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS Complex. **Science**, v.303, p.672-676, 2004.

- VISS, W.J.; PITRAK, J.; HUMANN, J.; COOK, M.; DRIVER, J.; REAM, W. Crown-gall-resistant transgenic apple trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes. **Molecular Breeding**, v.12, p.283-295, 2003.
- VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. **Nature Reviews Genetics**, v.6, p.206-220, 2005.
- VOINNET, O.; VAIN, P.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D.C. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. **Cell**, v.95, p.177-187, 1998.
- VOINNET, O.; LEDERER, C.; BAULCOMBE, D.C. Viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. **Cell**, v.103, p.157-167, 2000.
- WAGNER, A.; PJILLIPS, L.; NARAYAN, R.D.; MOODY, J.M.; GEDDES, B. Gene silencing studies in the gymnosperm species *Pinus radiata*. **Plant Cell Reports**, v.24, p.95-102, 2005.
- WASSENEGGER, M. RNA-directed DNA methylation. **Plant Molecular Biology**, v.43, p.203-220, 2000.
- WASSENEGGER, M. Gene Silencing. **International Review of Cytology**, v.219, p.61-113, 2002.
- WASSENEGGER, M.; PELISSIER, T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. **Plant Molecular Biology**, v.37, p.349-362, 1998.
- WATERHOUSE, P.M.; GRAHAM, M.W.; WANG, M.-B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v.95, p.13959-13964, 1998.
- WATERHOUSE, P.M.; WANG, M.-B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defense against viruses. **Nature**, v.411, p.834-842, 2001.
- WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. **Gene & Development**, v.5, p.1813-1824, 1993.
- XIE, Z.; JOHANSEN, L.K.; GUSTAFSON, A.M.; KASSCHAU, K.D.; LELLIS, A.D.; ZILBERMAN, D.; JACOBSEN, S.E.; CARRINGTON, J.C. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. **Public Library of Science Biology**, v.2, p.0642-0652, 2004.
- YE, F.; SIGNER, E.R. RIGS (repeat-induced gene silencing) in Arabidopsis is transcriptional and alters chromatin configuration. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v.93, p.10881-10886, 1996.
- ZHANG, S.C.; TIAN, L.M.; SVIRCEV, A.; BROWN, D.C.W.; SIBBALD, S.; SCHNEIDER, K.E.; BARSZCZ, E.S.; MALUTAN, T.; WEN, R.; SANFACON, H. Engineering resistance to Plum pox virus (PPV) through the expression of PPV-specific hairpin RNAs in transgenic plants. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.28, p.263-270, 2006.

Received July 04, 2007

Accepted August 27, 2007

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)