

MARIANA SANTOS CARDOSO

**CONSTRUÇÃO DE UM VETOR VIRAL, BASEADO NO DNA-A DO
Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), PARA A INDUÇÃO DE
SILENCIAMENTO GÊNICO EM PLANTAS HOSPEDEIRAS**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C268c
2009

Cardoso, Mariana Santos, 1984-

Construção de um vetor viral, baseado no DNA-A do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), para a indução de silenciamento gênico em plantas hospedeiras / Mariana Santos Cardoso. – Viçosa, MG, 2009.
x, 60f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa

Referências bibliográficas: f. 51-60.

1. Plantas - Melhoramento genético. 2. Silenciamento gênico induzido por vírus. 3. Begomovírus. 4. Geminivírus. 5. *Glycine max*. 6. *Lycopersicon esculentum*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 631.52

MARIANA SANTOS CARDOSO

CONSTRUÇÃO DE UM VETOR VIRAL, BASEADO NO DNA-A DO *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), PARA A INDUÇÃO DE SILENCIAMENTO GÊNICO EM PLANTAS HOSPEDEIRAS

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2009.

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Co-orientador)

Dra. Francismar Corrêa Marcelino
(Co-orientadora)

Profa. Valéria Monteze Guimarães

Prof. Luciano Gomes Fietto

Everaldo Gonçalves de Barros
Orientador

A Deus,

Aos meus pais, Darkson e Eloísa,

Ao meu noivo e amigo Marco Polo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar a minha vida, guiar os meus passos em todos os momentos e por me dar forças para superar as dificuldades e sabedoria para escolher os melhores caminhos.

Aos meus pais, Darkson e Eloísa, pelo apoio e confiança, pelos conselhos e orações nos momentos de dificuldades e por torcerem sempre pelo meu sucesso. O apoio de vocês foi fundamental!

Ao Marco pelo amor, carinho, amizade, incentivo e dedicação em todos os momentos. Pela ajuda com os experimentos nos momentos mais difíceis, pelas sugestões e pela disposição em aprender para poder me ajudar. Enfim, por fazer as dificuldades parecerem pequenas e os sonhos se tornarem reais. Não conseguiria sem você!

A minha irmã Isabel e meu cunhado Ricardo pela amizade, pela torcida e pela compreensão pelos momentos de ausência.

À família do Marco por sempre torcerem pela minha vitória e pela nossa felicidade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) por fornecer a estrutura e ambiente para a realização deste trabalho.

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

Ao Professor Everaldo G. de Barros pela orientação, apoio, confiança e pela oportunidade de trabalho.

Ao Professor Murilo Zerbini pela co-orientação e pelas sugestões ao longo deste trabalho.

À Doutora Francismar C. Marcelino pela co-orientação, incentivo, apoio, amizade e por todos os ensinamentos.

Aos Professores Luciano G. Fietto e Valéria Monteze por terem aceitado participar da minha banca examinadora.

Aos amigos do Laboratório de Sequenciamento, Larissa, Pricila, Magali, Michellia, Márcia, Ana, Carol, Rafa, Lucas, Léo, Maria Andréia, Cassi,

Bia, Roberta, Camila, Denise, Maíra e Valquíria, pelo incentivo, aprendizado e por torcerem sempre por mim. Sentirei saudades de todos!

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Proteínas e Biomol por ajudarem tão prontamente todas as vezes que precisei, em especial, Giselle, Dermeson, Dani, Marcão, Fábio, Fernanda e Josi.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular pelo apoio, auxílio e sugestões, em especial, Poliane, Alison, Dani, Antônio Wilson, Carol, Fábio, Fernanda, Jorge e Sávio.

À Andreia Barcelos pela amizade, apoio e por todos os ensinamentos durante a graduação.

Ao Carlos Alexandre e ao Alison pela ajuda e contribuição na execução de parte dos experimentos.

Aos funcionários, Cássio, Gláucia, Marlene, Sr. Fausto e Zé Carlos, pela presteza e auxílio sempre com boa vontade.

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

BIOGRAFIA

MARIANA SANTOS CARDOSO, filha de Darkson Cardoso Coelho e Eloísa Helena dos Santos Cardoso, nasceu em 27 de abril de 1984, em Belo Horizonte, MG.

Em maio de 2002, ingressou no curso de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se como bacharel em Bioquímica em março de 2007. Durante a graduação, desenvolveu atividades de Iniciação Científica nas linhas de pesquisa de Biologia Molecular e Enzimologia (2003/04) e de Genética Molecular de Plantas (2005/07), ambas no BIOAGRO/UFV.

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Família Geminiviridae	3
2.2. Gênero Begomovirus.....	4
2.2.1. Replicação viral.....	6
2.2.2. Movimento do vírus na planta	7
2.3. Begomovirus em soja no Brasil	7
2.4. Begomovirus em tomateiro.....	8
2.5. Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)	10
2.6. Genes marcadores para o silenciamento gênico em plantas	14
2.6.1. Fitoeno dessaturase.....	14
2.6.2. Myo-inositol-1-fosfato sintase	14
2.6.3. Estaquiase sintase	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Isolado viral	18
4.2. Construção do vetor viral.....	18
4.2.1. Desenho de oligonucleotídeos específicos	18
4.2.2. Amplificação e clonagem dos fragmentos no vetor <i>pBluescript</i>	20
4.2.3. Transformação de <i>Escherichia coli</i> e análise dos transformantes ..	21
4.2.4. Sequenciamento	22
4.3. Material vegetal	22
4.4. Isolamento e clonagem de fragmentos no vetor viral para indução do silenciamento gênico	23
4.4.1. Extração de RNA total de folhas de soja e tomate e de semente de soja	23
4.4.2. Síntese de cDNA por RT-PCR.....	24
4.4.3. Desenho de oligonucleotídeos específicos	25
4.4.4. Amplificação e clonagem dos fragmentos no vetor pGEM-T Easy .	26
4.4.5. Clivagem do vetor pToR-A1.4ΔCP e clonagem dos fragmentos de interesse	26
4.5. Inoculação via biobalística em soja, tomate e <i>N. benthamiana</i> e teste de infectividade.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Construção do vetor viral.....	29
5.2. Clonagem de fragmentos de interesse no vetor pToR-A1.4ΔCP para indução do silenciamento gênico.....	38
5.3. Teste de infectividade.....	45
6. CONCLUSÕES	49
7. PERSPECTIVAS.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

CARDOSO, Mariana Santos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Construção de um vetor viral, baseado no DNA-A do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), para a indução de silenciamento gênico em plantas hospedeiras.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-orientadores: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Francismar Corrêa Marcelino.

Os begomovírus pertencem à família *Geminiviridae*, que inclui vírus com genoma composto por uma ou duas moléculas de DNA circular de fita simples, encapsidado em partículas icosaédricas geminadas. Os begomovírus são transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci* e causam doenças de importância econômica em diversas culturas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, há diversos relatos de begomovírus causando sérias perdas nas culturas do feijoeiro e tomateiro e relatos esporádicos de incidência na cultura da soja. O silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) é uma alternativa atraente e rápida para o estudo da expressão e função de genes, pois não há necessidade de transformação genética da planta. Vírus com genoma de RNA e de DNA têm sido utilizados com sucesso como vetores para indução de silenciamento gênico em plantas. Entretanto, existem poucos vetores eficientes para a inoculação em plantas de tomate e de soja. O objetivo deste trabalho foi a construção de um vetor viral, baseado no DNA-A do begomovírus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), para a indução do silenciamento de genes em plantas de soja, tomate e *Nicotiana benthamiana*. O vetor viral, denominado pToR-A1.4ΔCP, foi construído a partir de um clone infeccioso do ToRMV-A do qual foi removido o gene da proteína capsial, substituindo pelo sítio múltiplo de clonagem do vetor pBluescript KS+ (pKS+). Assim como outros begomovírus, o ToRMV não requer a proteína capsial para causar infecção sistêmica. A construção do vetor viral foi confirmada por PCR, clivagem enzimática e sequenciamento. Para serem utilizados em experimentos de silenciamento gênico, fragmentos referentes aos genes fitoeno dessaturase (PDS) de soja e tomate, *myo*-inositol-1-fosfato sintase (MIPS) de soja e estaquiase sintase (STS) de soja foram isolados a partir de cDNA dessas plantas, utilizando *primers* específicos,

contendo sítios de restrição adequados para as clonagens. Após a amplificação, todos os fragmentos obtidos foram clonados em pGEM-T Easy, sequenciados e sua identificação foi confirmada por meio de alinhamento utilizando o algoritmo BLASTn. Para a clonagem no vetor viral, os fragmentos foram liberados do vetor pGEM-T Easy com as enzimas de restrição adequadas, purificados e inseridos no vetor pToR-A1.4ΔCP, previamente clivado em seu sítio múltiplo de clonagem com as mesmas enzimas. A reação de ligação foi realizada utilizando T4 DNA ligase e células de *Escherichia coli* ultracompetentes foram transformadas por meio de choque térmico. Os transformantes foram analisados por PCR e reação de clivagem enzimática. A infecção sistêmica de plantas de soja, tomate e *Nicotiana benthamiana* pelo vetor pToR-A1.4ΔCP vazio, inoculado conjuntamente com o DNA-B do ToRMV, foi diagnosticada via PCR aos 21 dias após a inoculação. Em *N. benthamiana*, o vetor viral apresentou 82% de infectividade, indicando um grande potencial de uso em estudos de VIGS nessa planta. Já em plantas de soja e tomate, o vetor viral apresentou baixa taxa de replicação. Portanto, novo teste de infectividade deve ser realizado para confirmar os resultados obtidos. Dessa forma, espera-se que este vetor viral sirva como um complemento e uma alternativa em estudos de genômica funcional e na análise de genes envolvidos em vários processos biológicos.

ABSTRACT

CARDOSO, Mariana Santos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Construction of a viral vector based on DNA-A of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) for induction of gene silencing in host plants.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-advisers: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Francismar Corrêa Marcelino.

Begomoviruses belong to the *Geminiviridae* family which includes viruses with genomes containing one or two single stranded DNA molecules within icosahedral geminate particles. Begomoviruses are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* and may cause diseases of economical importance in several crops mainly in tropical and subtropical regions. In Brazil there are several reports of begomovirus causing serious losses to the common bean and tomato crops, and sporadic reports of infection of soybean. Virus-induced gene silencing (VIGS) is an attractive and fast alternative for studying the expression and function of genes because it does not require plant transformation. Viruses with RNA or DNA genomes have been successfully used as vectors to induce gene silencing in plants. However, there are few examples of efficient vectors for inoculation of tomato and soybean. The main goal of this work was to build a viral vector based on the DNA-A of the begomovirus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) to induce gene silencing in plants of soybean, tomato and *Nicotiana benthamiana*. The viral vector, designated pToR-A1.4 Δ CP, was built from an infectious ToRMV-A clone from which the gene encoding the capsid protein was removed and replaced by the multiple cloning site of the plasmid vector pBluescript KS+ (pKS+). Like other begomoviruses, ToRMV does not require the capsid protein to cause a systemic infection. The construction of the viral vector was confirmed by PCR, enzymatic cleavage and DNA sequencing. To be used on gene silencing experiments, fragments from the following genes were PCR amplified from cDNA clones: phytoene desaturase (PDS) from soybean and tomato, *myo*-inositol-1-phosphate synthase (MIPS) from soybean and stachyose synthase (STS) from soybean. All fragments were amplified with primers contained restriction sites for cloning. After amplification, the fragments were cloned in pGEM-T Easy vector, sequenced and aligned to the corresponding cDNAs to confirm their identity. To clone these fragments in the

viral vector they were cleaved out of the pGEM-T Easy vector, purified and cloned into the pToR-A1.4ΔCP vector previously cleaved at the multiple cloning site with the same enzymes used to cleave the plasmid vector. The ligation reaction used T4 DNA ligase and ultracompetent *Escherichia coli* cells were transformed by heat shock. Transformants colonies were analyzed by PCR and enzymatic cleaved. Systemic infection of soybean, tomato and *Nicotiana benthamiana* plants with the empty pToR-A1.4ΔCP vector co-inoculated with ToRMV DNA-B was checked by PCR 21 days after inoculation. In the case of *N. benthamiana*, the viral vector presented 82% infectivity, indicating the high potential of this vector for VIGS studies in this plant species. In the case of soybean and tomato, the viral vector presented low replication efficiency. New infectivity tests need to be done to confirm these results. It is expected that this viral vector will represent an alternative for functional genomic studies and for the analysis of genes involved in several biological processes.

1. INTRODUÇÃO

Geminiviridae é uma família de vírus de planta caracterizada pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA circular de fita simples, com 2.500 a 3.000 nucleotídeos (Rojas *et al.*, 2005). A família é dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*), de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005).

As espécies pertencentes ao gênero *Begomovirus*, que ocorrem no continente americano, possuem dois componentes genômicos, são transmitidas por *Bemisia tabaci* e infectam espécies dicotiledôneas (Stanley *et al.*, 2005). No Brasil, há diversos relatos de begomovírus causando sérias perdas nas culturas do feijoeiro e tomateiro e relatos esporádicos de incidência na cultura da soja (Morales e Anderson, 2001; Mello *et al.*, 2002). O surgimento de novas espécies de begomovírus infectando tomateiros nas Américas (Morales e Jones, 2004; Polston e Anderson, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003) veio ressaltar de forma dramática o impacto causado por esses patógenos à agricultura.

O silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) é uma técnica de supressão da expressão de genes desenvolvida recentemente para a caracterização da função de genes de plantas. VIGS pode ser um rápido e eficiente modo de avaliar fenótipos relacionados a um determinado gene candidato em várias espécies de plantas (Jeong *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2008).

Vírus de plantas, incluindo os begomovírus, têm sido utilizados com sucesso para a construção de vetores para a indução de silenciamento em diversas espécies de plantas (Kjemtrup *et al.*, 1998; Fofana *et al.*, 2004; Godge *et al.*, 2008). Entretanto, existem poucos vetores eficientes para a inoculação em plantas de tomate e de soja (revisado por Senthil-Kumar *et al.*, 2008).

A soja (*Glycine max*) é uma das culturas economicamente mais importantes do mundo. Portanto, há uma demanda para o desenvolvimento de ferramentas de genômica funcional para esta cultura. Tentativas de silenciar genes de soja usando VIGS não foram bem sucedidas no passado e há poucos relatos na literatura empregando VIGS para o estudo de genes dessa

leguminosa (Jeong *et al.*, 2005; Zhang e Ghabrial, 2006; Nagamatsu *et al.*, 2007).

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é considerado uma das hortaliças de maior importância econômica no Brasil, tanto para o consumo *in natura* como para o setor agroindustrial (Alves-Júnior, 2008). Ferramentas alternativas para o estudo de genética reversa de genes do tomate são necessárias, já que a eficiência de transformação dessa hortaliça é baixa (Liu *et al.*, 2002). Um vetor construído a partir DNA β associado ao *Tomato yellow leaf curl China virus* isolado Y10 (TYLCCNV-Y10) foi um dos mais promissores em plantas de tomateiro (Tao e Zhou, 2004; Huang *et al.*, 2009). No entanto, o TYLCCNV não ocorre no Brasil, o que impede o uso desse vetor viral em trabalhos realizados no país. Já o vetor baseado no *Tomato rattle vírus* (TRV) mostrou-se bastante eficiente para indução do silenciamento gênico em tomate (Liu *et al.*, 2002).

Portanto, o desenvolvimento de um vetor viral baseado no *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), um begomovírus descrito no Brasil infectando plantas de tomateiro (Fernandes *et al.*, 2006), permitiria o uso de VIGS para a determinação da função de genes nessa espécie de planta, e em outras espécies hospedeiras como soja e *N. benthamiana*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é caracterizada pelo aspecto geminado da partícula viral, contendo um genoma composto por DNA circular de fita simples (ssDNA), com 2.500 a 3.000 nucleotídeos (nt), encapsidado por um único tipo de proteína estrutural, formando dois icosaedros incompletos (Lazarowitz, 1992; Rybicki, 1994; Zhang *et al.*, 2001).

Os geminivírus compreendem a segunda família mais numerosa entre os vírus de plantas, superada apenas pela família *Potyviridae* (Berger *et al.*, 2005). A família *Geminiviridae* é subdividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (Stanley *et al.*, 2005).

O gênero *Mastrevirus* inclui os geminivírus com um componente genômico transmitidos por cigarrinhas (*Homoptera:Cicadellidae*) a plantas monocotiledôneas. Este gênero inclui alguns patógenos importantes de culturas como o milho (*Maize streak virus*, MSV) e o trigo (*Wheat dwarf virus*, WDV). O gênero *Curtovirus* engloba geminivírus com um componente genômico transmitidos por cigarrinhas a espécies dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a principal espécie de importância econômica. O gênero *Topocuvirus* possui apenas uma espécie (*Tomato pseudo-curly top virus*, TPCTV), com um componente genômico e transmitida por cigarrinhas (*Homoptera: Auchenorrhyncha*) a espécies dicotiledôneas (Stanley *et al.*, 2005).

O gênero *Begomovirus* inclui espécies com um ou dois componentes genômicos transmitidas por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) a espécies dicotiledôneas (Stanley *et al.*, 2005). Begomovírus do Velho Mundo (Europa, Ásia, África e Oceania) são na sua maioria monossegmentados e estão, geralmente, associados a um DNA satélite denominado DNA beta (Bridson, 2003). Já os begomovírus nativos do Novo Mundo (Américas) são bissegmentados. Entre os begomovírus de maior importância econômica pode-se citar o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Potter *et al.*, 2003; Were *et al.*, 2004; Moriones e Navas-Castillo, 2000).

2.2. Gênero *Begomovirus*

As espécies virais classificadas no gênero *Begomovirus* incluem alguns dos principais patógenos de plantas em regiões tropicais e subtropicais do globo (Polston e Anderson, 1997; Morales e Anderson, 2001; Morales e Jones, 2004), ocorrendo em diversas culturas, como o feijoeiro, a soja, o tomateiro, o pimentão, o fumo, o algodão e a mandioca, bem como em plantas invasoras e ornamentais. Um fator que favoreceu o aumento de sua incidência nas últimas décadas foi o grande aumento populacional de seu inseto vetor, a “mosca-branca”, *Bemisia tabaci* (Polston e Anderson, 1997).

Nas Américas, o tomateiro é uma das espécies de plantas mais afetadas por begomovirose, com epidemias que podem levar a 100% de perdas e sérias consequências econômicas e sociais (Faria *et al.*, 2000; Morales e Anderson, 2001).

Os begomovírus, em sua maioria, possuem genoma dividido em dois componentes, denominados DNA-A e DNA-B. Seu genoma contém capacidade limitada para codificar proteínas, dependendo de fatores do hospedeiro para replicação do DNA e movimento (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004). No DNA-A encontram-se os genes que codificam as proteínas necessárias para a replicação viral e encapsidação. O DNA-B possui os genes codificadores das proteínas responsáveis pelo movimento célula-a-célula do vírus na planta (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica de plantas.

Os componentes genômicos de uma mesma espécie viral não possuem identidade de sequência, exceto por uma região intergênica com aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), que é altamente conservada (acima de 90% de identidade para o DNA-A e DNA-B de uma determinada espécie). A partir da região intergênica divergem os genes virais, nos sentidos viral e complementar (Lazarowitz, 1992; Fontes *et al.*, 1994; Stanley, 1983) (Figura 1).

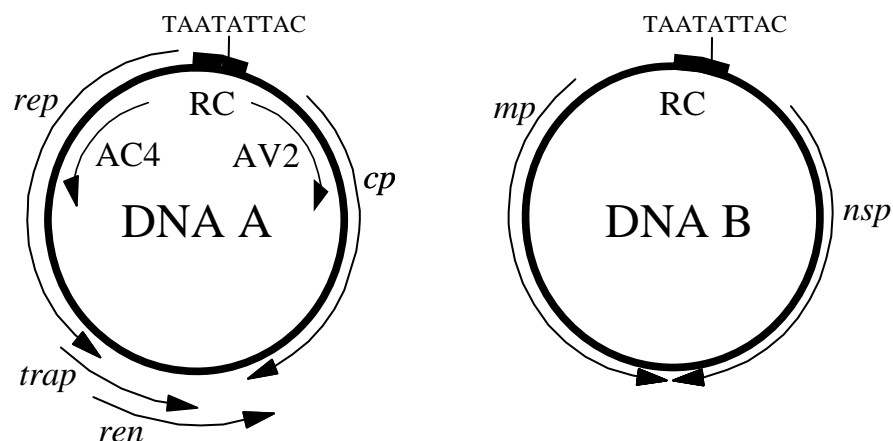


Figura 1. Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico. Os círculos representam o genoma viral, constituído por dois componentes (DNA-A e DNA-B), cada um com aproximadamente 2.600 nucleotídeos. As setas indicam os genes virais e o sentido em que ocorre a transcrição: *rep*, “replication-associated protein”; *trap*, “trans-activating protein”; *ren*, “replication-enhancer protein”; *cp*, proteína capsial (“coat protein”); *mp*, “movement protein”; *nsp*, “nuclear shuttle protein”. A região comum (RC) também está indicada. A sequência TAATATTAC, conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*, constitui a origem de replicação do genoma viral.

As espécies do gênero *Begomovirus* têm o potencial de codificar de quatro a seis proteínas no DNA-A. Na fita de sentido viral, encontram-se os genes *cp* e a ORF AV2 (ou *precoat*, presente apenas nos begomovírus do hemisfério oriental). Na fita de sentido complementar, encontram-se os genes *rep*, *trap*, *ren* e a ORF AC4. O gene *cp* codifica a proteína do capsídeo viral. Além da montagem da partícula, a proteína capsial é essencial à transmissão do vírus e determina a especificidade do inseto vetor (Bridson *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997). Entretanto, para a maioria dos begomovírus, essa proteína não é necessária para a infecção sistêmica da planta (Gardiner *et al.*, 1988). O gene *rep* (*replication-associated protein*) codifica a única proteína essencial ao processo de replicação destes vírus (Elmer *et al.*, 1988). A proteína Rep não é considerada uma replicase, mas está associada à replicação do DNA, com propriedade de ligação sítio-específico a DNA de fita simples e dupla (Fontes *et al.*, 1992), clivagem e ligação do DNA em sequências específicas (Laufs *et al.*, 1995b) e hidrólise de ATP (Desbiez *et al.*, 1995). O gene *ren* (*replication-enhancer protein*) codifica uma proteína acessória à replicação viral (Sunter *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1991; Pedersen e Hanley-Bowdoin, 1994). O produto do gene *trap* (*trans-activating protein*) é uma proteína ativadora da transcrição dos

genes localizados no sentido viral em ambas as fitas (*cp* e *nsp*) (Sunter *et al.*, 1990; Sunter e Bisaro, 1991; Sunter e Bisaro, 1992). Alguns begomovírus apresentam em seu genoma uma ORF denominada AC4, que codifica uma proteína supressora de silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*, 2004).

O DNA-B contém dois genes, cujos produtos são necessários para o movimento célula-a-célula e a longa distância. O gene *mp*, localizado na fita de sentido complementar, codifica a proteína envolvida no movimento célula-a-célula do DNA viral por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994). O gene *nsp*, localizado na fita de sentido viral, codifica a proteína *nuclear shuttle*, necessária para o tráfego intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma da célula vegetal e vice-versa (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; Sanderfoot *et al.*, 1996).

2.2.1. Replicação viral

No processo de infecção e replicação, as partículas virais são inoculadas na planta por meio do inseto vetor e o genoma viral se dissocia do capsídeo de forma espontânea (Lazarowitz, 1992; Palmer e Rybicki, 1998). Em seguida, o DNA viral é transportado para o núcleo da célula hospedeira, onde o ssDNA é convertido em um intermediário de fita dupla, denominado forma replicativa ou RF. A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, porém evidências indiretas indicam que é realizada por fatores do hospedeiro. A RF serve como molde para a síntese de novos ssDNA e para os mRNAs virais. O genoma viral é replicado por meio do mecanismo de círculo rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13, utilizando a RF como molde (Stanley, 1995).

A origem de replicação está localizada na região intergênica, comum entre os dois componentes genômicos. Nesta região está localizada uma seqüência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, que forma uma estrutura conservada (*structurally-conserved element*, SCE) em forma de grampo, com uma alça contendo a seqüência conservada 5'-TAATATTAC-3', encontrada em todos os geminivírus (Orozco e Hanley-Bowdoin, 1996). É neste nonanucleotídeo que ocorre a clivagem pela proteína Rep, que inicia o processo de replicação por círculo rolante. A proteína Rep

atua como uma endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e de seqüência (Laufs *et al.*, 1995a; Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998). Na região comum encontram-se também seqüências específicas para a ligação da proteína Rep (Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, responsável pela transcrição dos genes virais.

2.2.2. Movimento do vírus na planta

O estabelecimento de um processo infeccioso na planta depende da capacidade do vírus de replicar na primeira célula infectada e em seguida mover-se sistemicamente, alcançando inicialmente as células vizinhas e por fim os tecidos distantes da célula inicialmente infectada. O movimento no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos: movimento célula-a-célula, via plasmodesmas, e movimento a longa distância, no qual o vírus atinge o sistema vascular e é transportado sistemicamente para toda a planta hospedeira (Gilbertson e Lucas, 1996).

Para isto, os begomovírus com dois componentes codificam a partir do DNA-B duas proteínas relacionadas ao movimento viral. Tanto MP quanto NSP reconhecem o DNA de maneira específica em relação à forma e comprimento (Rojas *et al.*, 1998), o que a princípio eliminaria a necessidade da proteína capsidial para o movimento a longa distância. Estudos de mutagenese demonstraram que begomovírus mutantes para o gene *cp* são capazes de causar infecção sistêmica, embora com sintomas atenuados, em seus hospedeiros originais e no hospedeiro artificial *Nicotiana benthamiana* (Gardiner *et al.*, 1988).

2.3. Begomovírus em soja no Brasil

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill) é de grande importância para a economia brasileira, consistindo há mais de dez anos no principal produto agrícola da pauta de exportações. Atualmente, ocupa mais de 21 milhões de hectares com produção superior a 59 milhões de toneladas (CONAB, 2008). A produção média nacional vem crescendo gradualmente,

devido a programas de melhoramento genético de cultivares e ao uso de técnicas mais avançadas de cultivo.

Entretanto, a produção ainda é prejudicada devido ao grande número de doenças que acometem a cultura. O nematóide dos cistos (*Heterodera glycines*) e a ferrugem asiática causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Balardin, 2004) são as doenças de maior impacto e que têm causado as maiores perdas na cultura.

Embora os begomovírus não sejam considerados de importância econômica para a cultura da soja no Brasil, existem diversos relatos de sua ocorrência nessa espécie e em plantas daninhas associadas (Mello, 2001; Mello *et al.*, 2002). Além disso, a soja é excelente hospedeira do inseto vetor (Menten e Roston, 1980), o que aumenta os riscos de ocorrência de doenças causadas por begomovírus para a cultura.

Uma das espécies que infectam a soja é o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), um vírus de grande importância econômica na cultura do feijoeiro em todas as regiões em que ocorre (Faria, 1994). No início da década de 70, o Brasil era o maior produtor mundial de feijão, com 5 milhões de hectares plantados. Com a expansão da cultura da soja e consequente disseminação de *B. tabaci*, que coloniza com grande eficiência este hospedeiro, porém sem causar danos, o BGMV passou a causar perdas severas em cultivares suscetíveis de feijão, particularmente nos meses mais secos do ano, quando as populações do inseto atingem o nível máximo e migram da soja para o feijoeiro (Menten e Roston, 1980; De Fazio, 1985).

2.4. Begomovírus em tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) é cultivado em regiões de clima tropical e subtropical, em todos os continentes durante praticamente todo o ano. O Brasil é o nono produtor mundial de tomate, com uma produção de aproximadamente 3,3 milhões de toneladas e um rendimento médio de 59,6 toneladas por hectare em 2007 (IBGE, 2008). A cultura é altamente rentável e possui importância social devido ao grande número de empregos gerados. É considerada uma das hortaliças de maior importância econômica no Brasil, tanto para o consumo *in natura* como

para o setor agroindustrial. Entretanto, diversos problemas de ordem fitossanitária podem comprometer sua produtividade.

Nos últimos 30 anos, problemas fitossanitários associados a insetos do gênero *Bemisia* (*Homoptera:Aleyrodidae*), conhecidos vulgarmente por “mosca-branca”, têm se tornado frequentes em tomateiros cultivados em todo o mundo (Morales e Anderson, 2001; Naranjo e Ellsworth, 2001). Uma das principais consequências do aumento populacional desses insetos é o aumento da incidência e severidade de viroses causadas por vírus pertencentes à família *Geminiviridae* (Mansoor *et al.*, 2003; Morales e Jones, 2003).

Mais de 40 espécies de begomovírus já foram relatadas infectando o tomateiro (Fauquet *et al.*, 2003). A emergência de novas espécies de begomovírus infectando o tomateiro nas Américas desde a década de 1980, associada à disseminação do biótipo B de *B. tabaci*, vem causando sérias perdas na produtividade dessa cultura (Polston e Anderson, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Morales e Jones, 2004).

Semelhanças entre espécies encontradas em tomateiro e em plantas daninhas indicam que vírus nativos podem ser transferidos a partir de hospedeiros silvestres para o tomateiro, por meio do inseto vetor (Ambrozevicius *et al.*, 2002). A análise dos genomas virais indica que recombinação e pseudo-recombinação vem ocorrendo entre as diferentes espécies, gerando a oportunidade de uma rápida evolução de novas espécies melhor adaptadas ao tomateiro (Zerbini *et al.*, 2002; Galvão *et al.*, 2003).

No Triângulo Mineiro, uma nova espécie de begomovírus foi identificada em tomateiros em 1996 (Rezende *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1996). A comparação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A e do DNA-B com as de outros begomovírus comprovou tratar-se de uma nova espécie, denominada *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006). Levantamento de campo realizado em junho de 2000 nos municípios de Araguari, Indianópolis e Uberlândia indicou a prevalência do ToRMV, detectado em 73% das 148 amostras coletadas e positivas para begomovírus (Fernandes, 2001). O ToRMV foi caracterizado biológica e molecularmente (Fernandes *et al.*, 2006).

2.5. Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm se empenhado no sequenciamento do genoma de inúmeras espécies de organismos vegetais e animais. Uma das maiores limitações no estudo funcional desses genomas é a dificuldade de atribuir funções gênicas a uma grande parte das sequências geradas. O silenciamento gênico constitui uma forma simples e eficaz para estudar genes com funções desconhecidas em plantas e animais (Waterhouse e Helliwell, 2003; Dorsett e Tuschl, 2004; Miki e Shimamoto, 2004; Paddison *et al.*, 2004).

O silenciamento constitui um mecanismo celular que tem como alvo sequências específicas de ácidos nucleicos, resultando na regulação negativa da expressão gênica. O fenômeno pode ocorrer no núcleo em nível transcricional (*transcriptional gene silencing*, TGS), por meio de alterações no DNA, como a metilação (Vaucheret e Fagard, 2001; Matzke *et al.*, 2002), e também no citoplasma, em nível pós-transcricional (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS).

O silenciamento gênico pós-transcricional, também denominado silenciamento de RNA, resulta na degradação de uma população de mRNAs de maneira altamente específica em termos de sequência (Tang *et al.*, 2003; Yu e Kumar, 2003), reduzindo assim o acúmulo de mRNA no citoplasma sem afetar a taxa de transcrição. O silenciamento de RNA pode ser induzido por vírus, transgenes ou genes endógenos e, uma vez ativado, o mRNA correspondente (exógeno e/ou endógeno) é degradado de forma sequência-específica (Baulcombe, 2002). O mecanismo é ativado pela produção de RNA de fita dupla (dsRNA). O dsRNA é clivado por uma RNase III denominada *Dicer* em *Drosophila* e DCL (*Dicer-like*) em *Arabidopsis*, gerando moléculas de RNA com 21-25 nucleotídeos, denominadas siRNAs (*short interfering RNAs*). Os siRNAs são incorporados a um complexo denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), do qual DCL também faz parte. O complexo RISC direciona a degradação de mRNAs com sequência complementar ao siRNA (Figura 2) (revisado por Zerbini *et al.*, 2005).

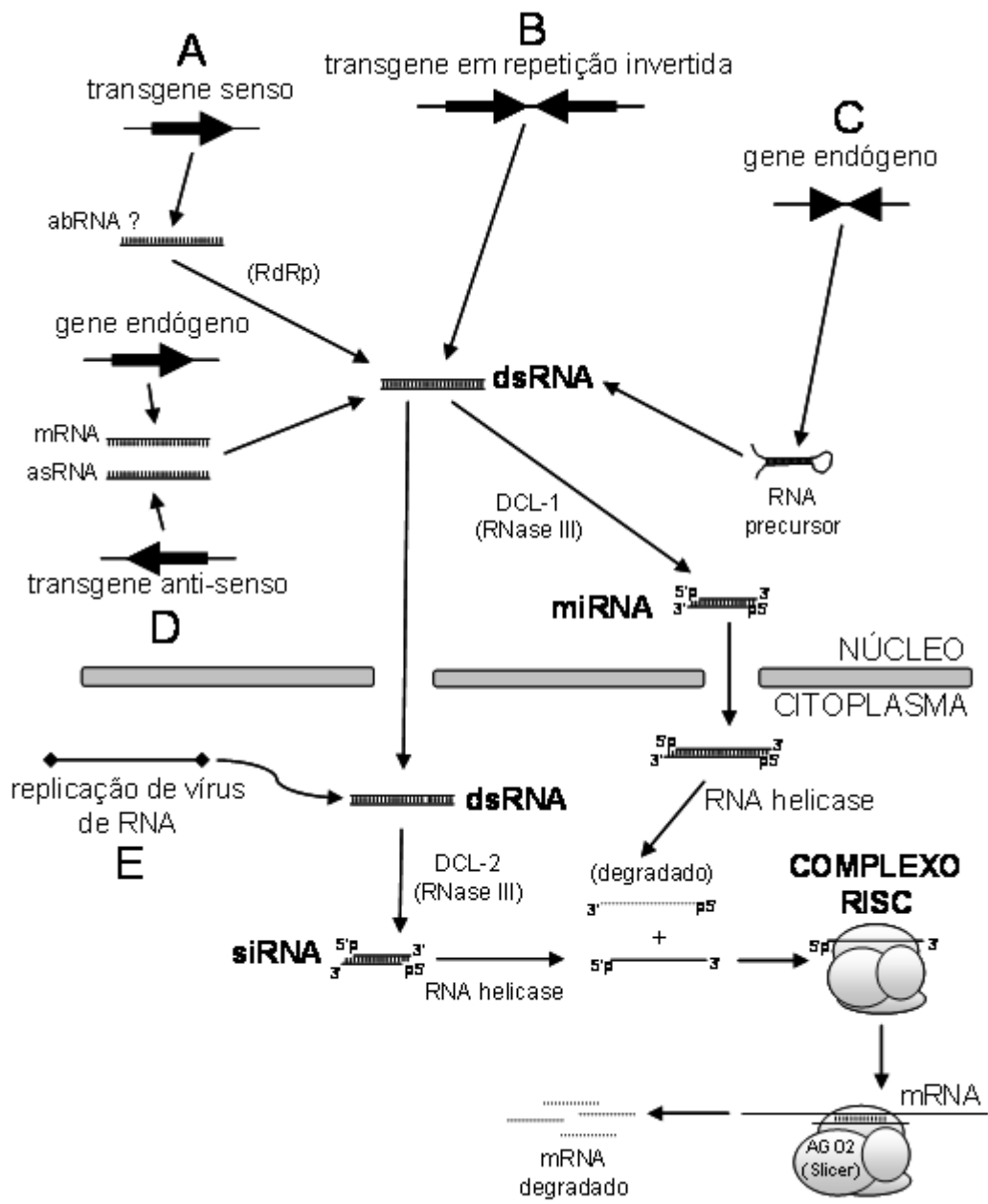


Figura 2. Representação esquemática abordando os diferentes mecanismos sugeridos para a ocorrência de silenciamento gênico, o qual pode ser induzido por transgenes *sense* e/ou *antisense* (A, D), repetições invertidas (B), genes endógenos (C) e também por vírus (E). Todos esses processos culminam com a formação de RNA fita dupla (dsRNA) que direcionam a degradação de mRNAs com sequência homóloga (modificada de Zerbini *et al.*, 2005).

O silenciamento gênico induzido por vírus (*virus-induced gene silencing*, VIGS) é uma alternativa atraente e rápida para o estudo da expressão e função de genes, pois não há necessidade de transformação genética da planta (Peele *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2003; Godge *et al.*, 2008). Para a obtenção de VIGS, um fragmento do gene de interesse é inserido em um

vetor viral, em substituição a genes dispensáveis à infecção sistêmica. Após inoculação na planta, o fragmento de interesse é então replicado e disseminado pela planta como parte do vírus recombinante. Uma vez iniciado o processo de silenciamento, o mRNA endógeno correspondente ao fragmento transportado pelo vetor viral é degradado via silenciamento de RNA (Baulcombe, 1999; Lu *et al.*, 2003; Grønlund *et al.*, 2008).

O uso de vetores virais para o silenciamento gênico apresenta algumas importantes vantagens. Em primeiro lugar, é um procedimento rápido. As construções podem ser montadas com facilidade e o fenótipo de silenciamento pode ser observado entre duas a quatro semanas após a inoculação (Lu *et al.*, 2003; Senthil-Kumar *et al.*, 2008; Godge *et al.*, 2008). Em segundo lugar, podem ser montados por clonagem direta, não envolvendo a construção na forma de repetições invertidas, as quais podem ser instáveis durante a propagação em *Escherichia coli*. Os vetores para VIGS têm sido frequentemente empregados em estudos de genética reversa, sendo promissores para plantas difíceis de serem transformadas caso estas sejam suscetíveis à infecção viral (Robertson, 2004; Shao *et al.*, 2008; Grønlund *et al.*, 2008; Godge *et al.*, 2008). Além disso, VIGS permite analisar genes que possuem um fenótipo letal, uma vez que esse sistema é aplicado em plantas adultas, não havendo morte do embrião como normalmente ocorre em sistemas de mutagênese insercional (Baulcombe, 1999).

Para a construção de vetores virais podem-se utilizar vírus com genoma composto de RNA, como o potexvírus *Potato virus X* (PVX) (Chapman *et al.*, 1992) e o tobrovírus *Tobacco rattle virus* (TRV) (Ratcliff *et al.*, 2001), ou de DNA, como os begomovírus *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Kjemtrup *et al.*, 1998), *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) (Turnage *et al.*, 2002) e *African cassava mosaic virus* (ACMV) (Fofana *et al.*, 2004). Genes de plantas podem ser efetivamente silenciados utilizando vetores baseados no TGMV e CaLCuV (Kjemtrup *et al.*, 1998; Peele *et al.*, 2001). No entanto, os sintomas causados pela infecção viral podem interferir com a interpretação do fenótipo resultante do silenciamento do gene que o vetor carrega.

Vetores virais baseados em begomovírus constituem boas ferramentas para expressão transiente de genes em plantas, por possuírem

genoma pequeno (2.600 a 3.000 nt) e moverem-se sistemicamente sem necessidade do gene da proteína capsidial, podendo assim transportar um DNA exógeno de aproximadamente 800 a 1.000 nucleotídeos de forma estável, sem afetar substancialmente sua replicação e/ou movimento (Saunders *et al.*, 1991). Além disso, infectam uma ampla gama de hospedeiros (Turnage *et al.*, 2002; Robertson, 2004).

Nicotiana benthamiana é o hospedeiro no qual VIGS tem sido mais utilizado, pois a resposta fenotípica é geralmente mais forte e mais persistente nessa espécie em comparação a outras (Lu *et al.*, 2003). Consequentemente, alguns pesquisadores têm transferido o gene de interesse de outras plantas para *N. benthamiana*, em experimentos que utilizam análise de VIGS. Este fato constitui uma grande limitação, uma vez que o gene em estudo deve ser bem caracterizado e o caminho biossintético no qual ele participa deve ser funcional em *N. benthamiana* (Jeong *et al.*, 2005; Godge *et al.*, 2008).

Como consequência desta limitação, diversos estudos estão sendo realizados em busca de vetores virais propícios à indução de VIGS em outros hospedeiros, incluindo *Barley stripe mosaic virus* para VIGS em cevada (*Hordeum vulgare*) (Holzberg *et al.*, 2002), *Cabbage leaf curl virus* para VIGS em *Arabidopsis thaliana* (Turnage *et al.*, 2002) e *Tobacco rattle virus* para VIGS em tomate (Liu *et al.*, 2002).

Para indução do silenciamento gênico em soja, vetores baseados em vírus com genoma de RNA foram desenvolvidos, como o comovírus *Bean pod mottle virus* (Zhang e Ghabrial, 2006), o tobrovírus *Tobacco rattle virus* (Jeong *et al.*, 2005) e o cucumovírus *Cucumber mosaic virus* (Nagamatsu *et al.*, 2007).

Dessa forma, a criação de um sistema VIGS eficiente para a indução de silenciamento gênico em plantas de tomateiro e soja seria de grande utilidade.

2.6. Genes marcadores para o silenciamento gênico em plantas

Alguns genes são comumente utilizados como indicadores do silenciamento gênico nos diversos tecidos de plantas, como o fitoeno dessaturase (PDS) e proteína verde fluorescente (GFP) (Godge *et al.*, 2008).

Nesta dissertação de mestrado, foram isolados três genes para serem utilizados como marcadores na indução do silenciamento gênico por vírus.

2.6.1. Fitoeno dessaturase

Os carotenóides são pigmentos fotoprotetores presentes em todos os organismos fotossintetizantes. As funções de absorção da luz e a fotoproteção são mediadas por uma estrutura de duplas ligações conjugadas, denominada cromóforo, formada por sucessivas adições de insaturações no composto fitato, precursor da via (Bartley *et al.*, 1991). Fitoeno dessaturase é a enzima que catalisa a introdução de duas insaturações no fitato, convertendo-o a ζ -caroteno, um carotenóide amarelo (Demmig-Adams *et al.*, 1996).

O gene que codifica a enzima fitoeno dessaturase (*pds*) é muito utilizado para avaliar a capacidade de indução de VIGS por vetores virais. Uma vez silenciado, é observado nas plantas o surgimento de sintomas de branqueamento e nanismo (Holzberg *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Ratcliff *et al.*, 2001; Godge *et al.*, 2008). O gene *pds* é um ótimo indicador de silenciamento gênico no tecido foliar, pois apresenta função conhecida e um fenótipo de mutação de fácil percepção (Jeong *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2008).

2.6.2. Myo-inositol-1-fosfato sintase

O ácido fítico, um derivado fosforilado do *myo*-inositol, é a principal forma de armazenamento do fósforo em sementes de plantas. *Myo*-inositol fosfatados, incluindo o ácido fítico, exercem importantes funções como moléculas na transdução de sinal, osmoprotetores e constituintes da parede celular (Hegeman *et al.*, 2001). Adicionalmente, *myo*-inositol polifosfatados participam no remodelamento da cromatina, na expressão gênica e na exportação de mRNA para o citoplasma (York *et al.*, 1999; Odom *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2003).

Em plantas, o *myo*-inositol-1-fosfato é sintetizado a partir de glicose-6-fosfato em uma reação catalisada pela enzima *myo*-inositol-1-fosfato sintase (MIPS) (EC 5.5.1.4) (Nunes *et al.*, 2006).

Em soja, mais de 60% do fósforo está na forma de fitato ou ácido fítico (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato) (Raboy, 2002). Porém, o fosfato presente no fitato não é absorvido por animais ruminantes, porque eles não possuem a enzima fitase necessária para a hidrólise do fitato (Meis *et al.*, 2003).

Várias pesquisas estão sendo conduzidas para obter uma variedade de soja com baixo conteúdo de fitato. Nunes *et al.* (2006) silenciaram, via interferência de RNA, o gene *GmMIPS1*, que codifica a enzima *myo*-inositol-1-fosfato sintase, visando a obtenção de sementes com conteúdo reduzido de fitato. Embora o silenciamento tenha sido altamente eficiente, com redução de 94,5% no conteúdo de fitato, as sementes obtidas não foram viáveis. No entanto, este fenótipo de inibição no desenvolvimento da semente poderá ser usado como marcador para o silenciamento gênico induzido por vírus em semente de plantas.

2.6.3. Estaquiase sintase

Os galacto-oligossacarídeos (GO) estão presentes em altos níveis nas sementes de leguminosas e apresentam um importante papel na aclimatização ao frio, conferindo tolerância a dessecação durante a maturação da semente (Jones *et al.*, 1999), além de serem uma importante fonte primária de energia durante a germinação das sementes (Lahuta *et al.*, 2000). No entanto, a presença dos GO's em sementes maduras de leguminosas constitui um fator antinutricional para humanos e animais.

A estaquiase sintase (EC 2.4.1.67, STS) é uma das enzimas envolvidas na via biossintética dos GO em diversas plantas. Esta enzima catalisa a adição de uma unidade de galactose à rafinose, a partir de galactinol, produzindo estaquiase e *myo*-inositol (Peterbauer *et al.*, 2002).

Em soja, a estaquiase está presente em níveis mais elevados que a rafinose (Guimarães *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2005) e é um dos principais causadores de distúrbios gastrointestinais em humanos e animais (Neus *et al.*,

2005). Uma vez que a estaquiose é sintetizada pela enzima estaquiose sintase, uma das maneiras de reduzir o conteúdo de estaquiose em sementes de soja é através do silenciamento do gene que codifica a enzima STS e assim alterar a via de síntese desse açúcar. Portanto, há um grande interesse para o desenvolvimento de variedades de soja mais adequadas ao consumo humano, com baixo conteúdo de estaquiose.

O gene que codifica a enzima STS em soja foi isolado e sequenciado por Fialho (2007). Ensaios de RT-PCR demonstraram que o gene STS é expresso em todos os estádios de desenvolvimento da semente de soja, assim como em folhas, caule e raiz desta planta. No entanto, ensaios para a determinação da atividade enzimática da estaquiose sintase e a quantificação de estaquiose em sementes de soja mostraram que a enzima STS está ativa somente em sementes maduras, onde a quantidade de mRNA produzido é 45 vezes maior que nos outros estádios (Fialho, 2007). Este gene poderá ser usado como indicador de silenciamento gênico tanto em folha, quanto em semente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Os objetivos deste trabalho foram a construção de um vetor viral, baseado no DNA-A do begomovírus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), para a indução do silenciamento de genes endógenos em plantas de soja, tomate e *Nicotiana benthamiana*, além do isolamento e clonagem de fragmentos gênicos a serem silenciados nestas plantas.

3.2. Objetivos específicos

- Construir um vetor viral para VIGS baseado no DNA-A do ToRMV;
- Amplificar e isolar os fragmentos dos genes que codificam as enzimas fitoeno dessaturase em soja e tomate, *myo*-inositol-1-fosfato-sintase em soja, e estaquiase sintase em soja, a partir de cDNA dessas plantas;
- Clonar os fragmentos gênicos no vetor viral pToR-A1.4 Δ CP;
- Testar a infectividade do vetor viral pToR-A1.4 Δ CP vazio, inoculado conjuntamente com o DNA-B cognato, em plantas de *Nicotiana benthamiana*, tomate da variedade 'Santa Clara' e soja da variedade 'MSoy 8400'.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolado viral

Foram utilizados os clones pUb1-G1 (clone infeccioso do DNA-A do ToRMV) e pUb1-G4 (clone infeccioso do DNA-B do ToRMV), obtidos do isolado viral MG-Ub1 caracterizado por Fernandes *et al.* (2006). Esses clones foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Virologia Vegetal Molecular (BIOAGRO/UFV). As sequências do genoma viral do ToRMV estão depositadas no banco de dados *Genbank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com os números de acesso AF291705 (DNA-A) e AF291706 (DNA-B).

4.2. Construção do vetor viral

O vetor viral para VIGS foi construído com base no clone pUb1-G1 com a substituição do gene *cp*, que codifica a proteína capsidial, pelo sítio múltiplo de clonagem derivado do plasmídeo pBluescript KS+ (pKS+) da Stratagene.

4.2.1. Desenho de oligonucleotídeos específicos

Oligonucleotídeos contendo sítios específicos para as enzimas de restrição *Kpn* I e *Xho* I foram sintetizados para a amplificação de um fragmento de 562 pb que contém a região comum, incluindo a origem de replicação, a partir do clone pUb1-G1. Foram também desenhados, a partir deste mesmo clone, oligonucleotídeos contendo sítios para as enzimas *Not* I e *Sac* II para a amplificação de um fragmento de 1.909 pb, que corresponde a todo o genoma do DNA-A do ToRMV, com exceção do gene *cp*, mas permanecendo seus códons de iniciação e terminação. As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas na Tabela 1 e as regiões amplificadas estão representadas na Figura 3.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos do clone pUb1-G1 para construção do vetor viral pToR-A1.4ΔCP. As bases sublinhadas indicam os sítios para as enzimas de restrição.

Oligonucleotídeo	Sequência	Enzima de restrição
P1-CP	5' GCC <u>CCGCGG</u> CATCGCGCTTAGGCATTTTG 3'	<i>Sac</i> II
P2-Ren	5' TTT <u>GCGGCCGCG</u> GATAACAAATTAATAAATTTTG 3'	<i>Not</i> I
P3-CP	5' GGC <u>CTCGAGG</u> CATCGCGCTTAGGCATTTTG 3'	<i>Xho</i> I
P4-Rep	5' GGC <u>GGTACC</u> TTCGAATTGAAGAAGCACATGG 3'	<i>Kpn</i> I

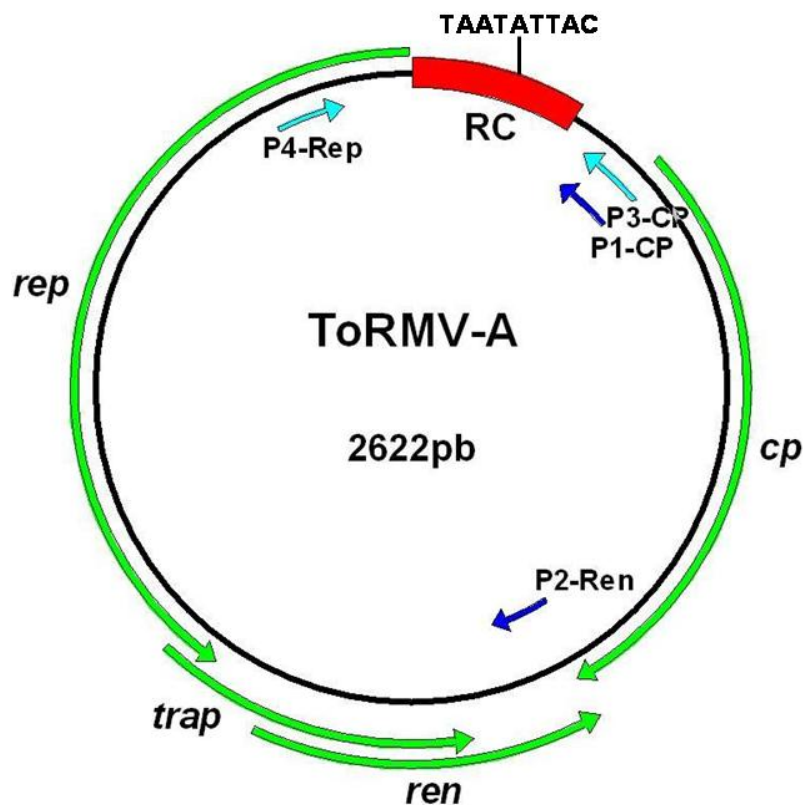


Figura 3. Representação esquemática do genoma do DNA-A do ToRMV e dos oligonucleotídeos utilizados para a construção do vetor viral pToR-A1.4ΔCP. As setas em verde indicam os genes virais e o sentido em que ocorre a transcrição: *rep* (*replication-associated protein*); *trap* (*trans-activating protein*); *ren* (*replication-enhancer protein*); *cp* (proteína capsidial ou *coat protein*). A região comum (RC) e a sequência que constitui a origem de replicação do genoma viral também estão indicadas. As setas azuis indicam a região de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para a construção do vetor viral. P1-CP e P2-Ren, amplificação de fragmento de 1.909 pb. P3-CP e P4-Rep, amplificação de fragmento de 562 pb.

4.2.2. Amplificação e clonagem dos fragmentos no vetor *pBluescript*

As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador *Mastercycler ep Gradient*, modelo 5341 (Eppendorf), com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 4 min, seguida por 30 ciclos (94°C por 1 min; 60°C por 1 min; e 72°C por 2 min) e um período adicional de polimerização a 72°C, por 7 min. Cada reação de amplificação continha 15 ng de DNA do clone pUb1-G1; Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; dNTPs 0,2 mM de cada nucleotídeo; 0,2 µM de cada par de *primer* e 1 U de Taq DNA Polimerase (Phoneutria), totalizando um volume final de 25 µL.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado com o auxílio do equipamento *Eagle Eye II* (Stratagene).

Após a confirmação da amplificação, os fragmentos obtidos foram cortados do gel, purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante, e utilizados em reações de restrição enzimática com as enzimas adequadas.

Inicialmente, foi realizada a clivagem do fragmento de 562 pb com 500 ng de DNA, 5 U da enzima *Kpn I* e tampão de clivagem (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 7 mM, KCl 50 mM e DTT 1 mM) por 5 h a 37°C. Em seguida, foram adicionados 0,53 µL de NaCl 3 M e 5 U da enzima *Xho I* e a reação foi incubada a 37°C por mais 5 h. A reação foi parada a 70°C por 5 min.

O fragmento de 562 pb clivado com *Kpn I* e *Xho I* foi inserido no plasmídeo pKS+, previamente clivado com as mesmas enzimas, gerando o clone pToR-A0.4. A reação de ligação foi feita para um volume final de 10 µL, utilizando 50 ng de DNA clivado, 10 ng de vetor clivado, tampão de reação (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM e 25% (p/v) de polietileno glicol-8000) e 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen). A reação foi incubada a 4°C por 16 h. Em seguida, foi realizada a transformação de *Escherichia coli* por choque térmico, análise dos transformantes por PCR, reações de clivagem e sequenciamento para a confirmação da clonagem.

Para a clonagem do fragmento de 1.909 pb, este foi clivado com *Not I* e *Sac II* e inserido no clone pToR-A0.4, previamente clivado com as mesmas

enzimas, originando o clone pToR-A1.4ΔCP. A clivagem foi realizada com 500 ng de DNA, 5 U da enzima Sac II e tampão de clivagem (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, BSA 0,1 mg/mL) por 5 h a 37°C. Em seguida, foram adicionados 2,2 µL de NaCl 3 M, 2,8 µL de Tris-HCl 1 M e 5 U da enzima Not I e a reação foi incubada a 37°C por mais 5 h. A reação foi interrompida por incubação a 70°C por 5 min. A reação de ligação foi realizada como descrito anteriormente e utilizada para a transformação de *Escherichia coli*.

4.2.3. Transformação de *Escherichia coli* e análise dos transformantes

As células de *Escherichia coli* DH5α ultracompetentes foram transformadas por choque térmico de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Foram adicionados 10 µL da reação de ligação a 50 µL de células ultracompetentes em um microtubo e este foi incubado no gelo por 20 min. O choque térmico foi realizado a 42°C por 50 s, seguido de uma incubação no gelo por 2 min. Para a recuperação das células, foram adicionados 800 µL de meio SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, NaCl 10 mM, MgSO₄ 10 mM, KCl 2,5 mM e 20% de glicose) e a cultura foi incubada a 37°C por 1 h a 150 rpm. Após esse período as células foram concentradas por centrifugação a 1.500 g por 10 min, ressuspendidas em 100 µL de meio SOC e plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (50 µg/mL) e 20 µL de X-gal (50 mg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por cerca de 15 h.

Para a análise dos transformantes, foram selecionadas algumas colônias brancas e o diagnóstico para a confirmação da transformação foi feito por meio de PCR, seguindo as mesmas condições descritas no item anterior. As colônias que mostraram a amplificação do produto esperado foram inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C por 16 h sob agitação de 180 rpm. Após o crescimento, as bactérias foram aliquoteadas em glicerol 25%, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

O isolamento do DNA plasmidial foi feito pelo método de purificação em colunas, utilizando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram utilizadas em ensaios de PCR com os *primers* específicos, em

reações de restrição enzimática e também em reações de sequenciamento para a confirmação da clonagem.

4.2.4. Sequenciamento

O sequenciamento dos clones recombinantes foi realizado em sequenciador automático *MegaBACE™ 500* de 48 capilares (GE Healthcare), usando o kit *DYEnamic™ ET Dye Terminators* (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram baseadas na técnica de sequenciamento por terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos (ddNTPs), descrita por Sanger *et al.* (1977).

Foram utilizados nestas reações 100 a 150 ng de DNA, 0,5 µM do oligonucleotídeo universais (T7 ou T3), e 2,0 µL de *DYEnamic™ ET Terminators Sequencing Premix* em volume final de 5 µL. As condições de PCR foram 95°C por 10 s, 50°C por 5 s e 60°C por 2 min repetidas 35 vezes. Em seguida, o DNA foi precipitado adicionando-se 27,5 µL de etanol absoluto e acetato de amônio para uma concentração final de 0,75 M. Após 10 minutos à temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas por 45 min a 3.500 g. O DNA então foi lavado com 100 µL de etanol 70%, centrifugado novamente a 3.500 g por 10 min e secado por 10 min. Após a precipitação, o DNA foi ressuscitado em 5 µL de *Loading Buffer* (GE Healthcare).

As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio do programa *Sequencher™* versão 4.1.4 (Genes Code Corporation) e a busca por similaridades com outras sequências depositadas no *Genbank* foi feita usando o algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

4.3. Material vegetal

Foram utilizadas, para a realização dos experimentos, a variedade de soja 'MSoy 8400', a variedade de tomate 'Santa Clara' e *Nicotiana benthamiana*. Todas as plantas foram cultivadas em casa de vegetação.

Para a extração de RNA total, foram coletadas folhas jovens de soja e tomate, e sementes de soja no terceiro estágio de desenvolvimento da semente. Os estádios foram determinados com base no peso de matéria fresca da semente: 1º - 0 a 125 mg; 2º - 126 a 250 mg; 3º - 251 a 375 mg e 4º - 376

mg em diante. As folhas e as sementes das plantas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a sua utilização.

4.4. Isolamento e clonagem de fragmentos no vetor viral para indução do silenciamento gênico

4.4.1. Extração de RNA total de folhas de soja e tomate e de semente de soja

O RNA total de folhas de soja e tomate e de sementes de soja foi isolado pelo método de extração usando fenol, tiocianato de guanidina e clorofórmio, desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987), com algumas modificações. Todas as etapas de isolamento do RNA foram conduzidas a 4°C e em condições livre de ribonucleases.

Foram macerados cerca de 500 mg de cada amostra de folha ou de semente na presença de nitrogênio líquido, utilizando cadinho e pistilo. Em seguida, os materiais foram transferidos para microtubos de 2,0 mL, aos quais foram adicionados 1,0 mL do reagente Trizol (Invitrogen) e as amostras foram homogeneizadas em vortex por 15 s. Após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio. As amostras foram agitadas em vortex por 15 s, incubadas a temperatura ambiente por 2 a 3 min e, em seguida, submetidas a um passo de centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4°C. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e submetida à precipitação com 0,5 mL de isopropanol por 2 h a -20°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4°C e os precipitados resultantes foram lavados duas vezes com 1,0 mL de etanol 70% e secados à temperatura ambiente. Cada amostra foi ressuspensa em 100 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

As amostras de RNA total foram quantificadas em espectrofotômetro (A_{260nm}) e a sua qualidade avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (Tris-borato 89 mM e EDTA 2 mM), contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do RNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema de fotodocumentação *Eagle Eye II* (Stratagene).

4.4.2. Síntese de cDNA por RT-PCR

Para as reações de RT-PCR, todas as amostras de RNA total foram tratadas com *RQ1 RNase-free DNase* (Promega), conforme as recomendações do fabricante. Foram adicionados a 20 µg de cada amostra de RNA, tampão DNase 1X (Tris-HCl 40mM, pH 8,0; MgSO₄ 10 mM e CaCl₂ 1 mM), DTT 10 mM e 4 U da enzima DNase. As reações foram incubadas por 45 min a 37°C e o RNA foi extraído com igual volume de fenol e de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), após centrifugação a 12.000 g por 2 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e realizada outra extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase superior foi submetida à precipitação com acetato de sódio 3 M e etanol 95% por 1 h a -20°C e depois centrifugada a 12.000 g por 5 min a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 70%, secado e ressuspendido em água DEPC. As amostras foram novamente quantificadas em espectrofotômetro e analisadas em gel de agarose 1,5%.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o kit *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA tratado (1 µg) foram incubadas com 1 µL de oligo (dT)₁₂₋₁₈ 50 µM e 1 µL de dNTPs 10mM cada a 65°C por 15 min e, em seguida, incubadas no gelo. Posteriormente, foram adicionados tampão de PCR (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM), DTT 5 mM e 200 U da enzima transcriptase reversa *Superscript III*. As reações foram incubadas a 50°C por 1 h e, em seguida, a enzima foi inativada a 70°C por 15 min. Para cada amostra foi feito um controle negativo que continha todos os reagentes exceto a enzima transcriptase reversa.

Adicionalmente, para as amostras de folha e semente de soja, foram feitas reações controle usando os *primers* de actina 3 de soja (F 5' CCCCTCAA CCCAAAGGTCAACAG 3' e R 5' GGAATCTCTCTGCCCAATTGTG 3'), com a finalidade de verificar possíveis contaminações com DNA genômico e padronizar a quantidade de cDNA molde, que foi usado para isolamento dos fragmentos de interesse. Quando na presença de DNA genômico de soja, a reação de amplificação com os *primers* da actina 3, produz um fragmento de 520 pb, já na presença de cDNA observa-se apenas um fragmento de 439 pb devido à remoção de um íntron de 81 pb (Shah *et al.*, 1982).

4.4.3. Desenho de oligonucleotídeos específicos

Os oligonucleotídeos específicos foram construídos a partir de sequências de nucleotídeos de cDNA correspondentes aos genes que codificam as enzimas: fitoeno dessaturase (PDS) de soja (número de acesso M64704) e de tomate (S36691); e *myo*-inositol-1-fosfato sintase (MIPS) de soja (AY038802), depositadas no banco de dados *Genbank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI). Como a sequência de cDNA do gene que codifica a enzima estaquiase sintase (STS) de soja ainda não se encontra depositada em banco de dados, esta foi clonada e sequenciada por Fialho (2007) e utilizada para desenho de oligonucleotídeos.

Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa *Primer3 Input v. 0.4.0* (<http://frodo.wi.mit.edu>). Os sítios de restrição adequados para a clonagem no vetor viral pToR-A1.4ΔCP foram adicionados à extremidade 5' de cada par de *primers*. As sequências estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos desenhados para a amplificação dos fragmentos dos genes de interesse. As bases sublinhadas indicam os sítios para as enzimas de restrição.

Oligonucleotídeo	Sequência	Enzima de restrição
PDS soja F	5' GGCGGATCCTCAGACGCCACAATTCGTT 3'	<i>Bam</i> HI
PDS soja R	5' GGCTCTAGATGTGTAGGCCTGTCTCGTACC 3'	<i>Xba</i> I
PDS tom F	5' CTTTGGATCCCGAGGTCGTC 3'	<i>Bam</i> HI
PDS tom R	5' ATGCCATCTAGACTCGTACC 3'	<i>Xba</i> I
MIPS1 F	5' GGCGGATCCACCACCGAACTTGTTTAC 3'	<i>Bam</i> HI
MIPS1 R	5' GGCTCTAGAAAATCTCAGCCTCATTTC 3'	<i>Xba</i> I
MIPS2 F	5'GGCAAGCTTCTAACCGAGAGGGCATTTC3'	<i>Hind</i> III
MIPS2 R	5' GGCTCTAGACTCTCTGTGTTGGCAGTCCA 3'	<i>Xba</i> I
STS1 F	5' GGCGGATCCCGAGCTTGCAAAGGCTTATT 3'	<i>Bam</i> HI
STS1 R	5' GGCTCTAGATCATGAGAGCCCACACTGTC 3'	<i>Xba</i> I
STS2 F	5' GGCGGATCCTGCCAAAATTGCTGACAAG 3'	<i>Bam</i> HI
STS2 R	5' GGCAAGCTTCAGACGAAACAGCCTCATCA 3'	<i>Hind</i> III

4.4.4. Amplificação e clonagem dos fragmentos no vetor pGEM-T Easy

Os fragmentos dos genes de interesse foram isolados via PCR, utilizando o cDNA sintetizado a partir do RNA total de soja ou tomate. Cada reação de amplificação continha 0,5 µL da reação de síntese de cDNA; Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; dNTPs 0,2 mM de cada nucleotídeo; 0,2 µM de cada *primer* e 1 U de Taq DNA Polimerase (Phoneutria), totalizando um volume final de 25 µL.

As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador *Mastercycler ep Gradient*, modelo 5341 (Eppendorf), com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos (94°C por 45 s; 55°C por 45 s; e 72°C por 45 s) e um período adicional de polimerização a 72°C, por 7 min. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

Após a confirmação da amplificação, os fragmentos obtidos foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega), de acordo com as recomendações dos fabricantes.

O vetor, contendo o inserto, foi utilizado para transformar células ultracompetentes de *E. coli* DH5α por choque térmico. A análise dos transformantes e a confirmação da clonagem foram feitas como descritas no item 4.2.3 e 4.2.4.

4.4.5. Clivagem do vetor pToR-A1.4ΔCP e clonagem dos fragmentos de interesse

Para a clonagem no vetor viral, os fragmentos de interesse foram liberados do vetor pGEM-T Easy com as enzimas de restrição adequadas.

A clivagem dos fragmentos de PDS de soja e tomate, MIPS1 e STS1 de soja foi realizada com 500 ng de cada DNA, 5 U da enzima *Bam* HI, 5 U da enzima *Xba* I e tampão de clivagem (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM, KCl 100 mM, Triton X-100 0,02%, BSA 0,1 mg/mL) por 12 h a 37°C. Já a clivagem do fragmento STS2 foi realizada como descrito acima, exceto pelas enzimas, que foram *Bam* HI e *Xba* I. A clivagem do fragmento MIPS2 foi realizada com

500 ng de DNA, 5 U da enzima *Hind* III, 5 U da enzima *Xba* I e tampão de clivagem (Tris-acetato 33 mM pH 7,9, acetato de magnésio 10 mM, acetato de potássio 66 mM, BSA 0,1 mg/mL) por 12 h a 37°C. Os fragmentos clivados foram purificados do gel com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

O vetor viral pToR-A1.4ΔCP foi clivado em seu sítio múltiplo de clonagem com as mesmas enzimas de restrição que foram utilizadas para clivar os fragmentos amplificados. As reações de ligação, transformação de *E. coli* DH5α e a análise dos transformantes foi realizada como descrito anteriormente.

4.5. Inoculação via biobalística em soja, tomate e *N. benthamiana* e teste de infectividade

Plantas de tomateiro 'Santa Clara' e *N. benthamiana*, no estágio de 4-6 folhas definitivas, e radículas de soja da variedade 'MSoy 8400', 72 horas após a embebição, foram co-inoculadas com os clones pToR-A1.4ΔCP e pUb1-G4, correspondendo ao vetor VIGS e ao DNA-B completo do ToRMV, respectivamente. A inoculação foi realizada via biobalística (Aragão *et al.*, 1996), utilizando 2 µg de cada componente genômico. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação durante toda a duração do experimento.

Para verificar a infectividade do vetor viral, DNA total de todas as plantas foi extraído, 21 dias após a inoculação, pelo método descrito por Dellaporta *et al.* (1983). Discos foliares de 1,0 cm de diâmetro, retirados de folhas jovens das plantas inoculadas, foram macerados com pistilo de plástico após a adição de 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM; NaCl 500 mM; β-mercaptoetanol 10 mM). Em seguida, foram adicionados 33 µL de SDS 20% e as amostras foram homogeneizadas em vortex por 2 min. Após uma incubação a 65°C por 10 min, foram adicionados 160 µL de acetato de potássio 5 M. As amostras foram agitadas em vortex por 2 min e centrifugadas a 16.000 g por 10 min à temperatura ambiente. Ao sobrenadante foram adicionados 0,5 volumes de isopropanol, seguido de centrifugação por a 16.000 g por 10 min. O precipitado foi lavado com 500 µL

de etanol 70% e centrifugado novamente a 16.000 *g* por 5 min. Cada amostra foi ressuspensa em 100 μ L de água autoclavada.

A infecção das plantas pelo vetor viral foi verificada via PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para o DNA-A do ToRMV (*primers* P3 e P4) e oligonucleotídeos universais para o DNA-B de begomovírus (Rojas *et al.*, 1993).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Construção do vetor viral

Para a construção do vetor viral, dois fragmentos do genoma do ToRMV-A foram amplificados a partir do clone pUb1-G1 e seus tamanhos confirmados por eletroforese em gel de agarose (Figura 4). Com os oligonucleotídeos P1-CP e P2-Ren, foi amplificado um fragmento de 1.909 pb, que corresponde a todo o genoma do DNA-A do ToRMV, com exceção do gene da proteína capsial. Já os oligonucleotídeos P3-CP e P4-Rep amplificaram um fragmento de 562 pb, que contém a região comum do genoma viral, incluindo a origem de replicação.

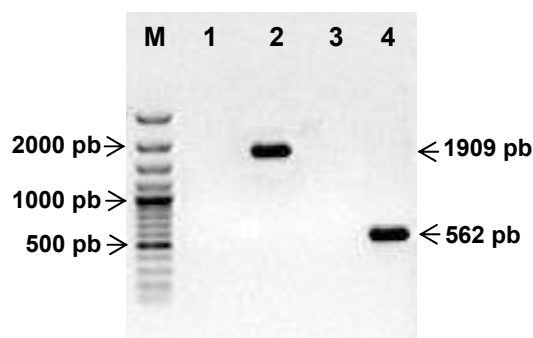


Figura 4. Análise eletroforética em gel de agarose (0,8%) dos fragmentos amplificados para a construção do vetor pToR-A1.4 Δ CP. M – Marcador de tamanho (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* - Fermentas); 1 – Controle negativo (branco) da reação de PCR com os *primers* P1-CP e P2-Ren; 2 – Fragmento amplificado de 1.909 pb; 3 – Controle negativo (branco) da reação de PCR com os *primers* P3-CP e P4-Rep; 4 – Fragmento amplificado de 562 pb.

Após a clivagem do fragmento de 562 pb (0,4 cópias do ToRMV-A) e do plasmídeo pKS+ com as enzimas *Xho* I e *Kpn* I, foi feita a reação de ligação e transformação de *E. coli*. Foram selecionadas 7 colônias para a realização do PCR, usando os *primers* P3-CP e P4-Rep (Figura 5). Todas as colônias analisadas apresentaram o fragmento clonado.

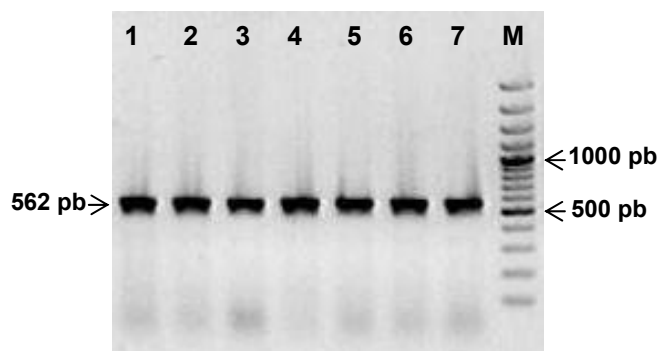


Figura 5. Análise eletroforética em gel de agarose (0,8%) do PCR de colônia para confirmação da clonagem do fragmento de 562 pb. 1 a 7 – Fragmento de 562 pb amplificado a partir das colônias selecionadas; M – Marcador de tamanho (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* - Fermentas).

Foi selecionada uma das colônias positivas para a extração do DNA plasmidial e o clone obtido foi denominado pToR-A0.4. A clonagem foi confirmada por clivagem com enzimas de restrição (Figura 6) e por meio de sequenciamento do DNA plasmidial do clone isolado utilizando os *primers* T3 e T7, específicos para o pKS+.

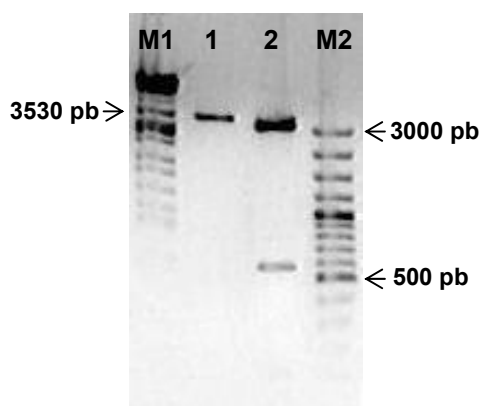


Figura 6. Análise eletroforética em gel de agarose (0,8%) da reação de clivagem do clone pToR-A0.4. M1 – Marcador de tamanho derivado do DNA de fago λ clivado com as enzimas *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III; 1 – Plasmídeo clivado com a enzima *Kpn* I, gerando um fragmento de 3.523 pb que corresponde ao clone linearizado; 2 – Plasmídeo clivado com as enzimas *Kpn* I e *Xho* I, liberando um fragmento de 2.961 pb, correspondente ao pKS+, e um fragmento de 562 pb, correspondente a 0.4 cópias do ToRMV-A; M2 – Marcador de tamanho (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* - Fermentas).

Uma vez comprovada a clonagem do fragmento de 562 pb, foi feita uma nova reação de ligação e transformação de *E. coli* para a clonagem do fragmento de 1.909 pb, correspondente a uma cópia do ToRMV-A, previamente

clivado com as enzimas *Sac* II e *Not* I. Para verificar quais colônias foram transformadas com o plasmídeo contendo o inserto, 6 colônias foram analisadas por meio de PCR usando os *primers* P1-CP e P2-Ren (Figura 7). Apenas 3 colônias apresentaram o fragmento de 1.909 pb clonado. Foi realizada a extração do DNA plasmidial de uma das colônias positivas e o clone obtido foi designado pToR-A1.4ΔCP.

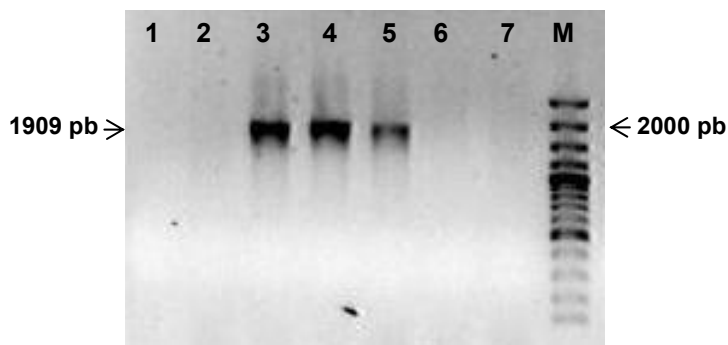


Figura 7. Análise eletroforética em gel de agarose (0,8%) do PCR de colônia para confirmação da clonagem do fragmento de 1.909 pb. 1 – Controle negativo (branco) da reação de PCR; 3, 4 e 5 – Fragmento de 1.909 pb amplificado a partir das colônias selecionadas; 2, 6 e 7 – Nenhum fragmento foi amplificado, indicando que as colônias não continham o plasmídeo recombinante; M – Marcador de tamanho (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* - Fermentas).

O vetor pToR-A1.4ΔCP foi submetido a várias clivagens enzimáticas para a confirmação da clonagem. Para a clivagem com as enzimas *Sac* II/*Kpn* I/*Hind* III, foram observados fragmentos de aproximadamente 2.900 pb, correspondente ao plasmídeo pKS+, e 1.950 pb e 580 pb, correspondentes a 1,0 cópia e 0,4 cópias do ToRMV-A, respectivamente. Para as clivagens utilizando as enzimas *Sac* II/*Hind* III e *Sac* II/*Not* I, foram obtidos os fragmentos de aproximadamente 3.450 pb, correspondente ao pToR-A0.4, e 1.950 pb, correspondente a 1,0 cópia do ToRMV-A. Já na clivagem com *Kpn* I/*Hind* III e *Kpn* I/*Xho* I, foram liberados um fragmento de aproximadamente 580 pb, referente a 0,4 cópias do ToRMV-A, e um fragmento de 4.800 pb, referente ao plasmídeo pToR-AΔCP. A digestão do vetor viral com a enzima *Sac* I gerou os fragmentos de 2.910 pb, 1.973 pb e 512 pb. Esta enzima foi utilizada para a clivagem por apresentar um sítio de restrição dentro da região comum (RC) da sequência do ToRMV-A e outro sítio no plasmídeo pKS+. Para a linearização

do vetor pToR-A1.4 Δ CP foi utilizada a enzima *Hind* III, obtendo-se um fragmento de 5.395 pb (Figura 8).

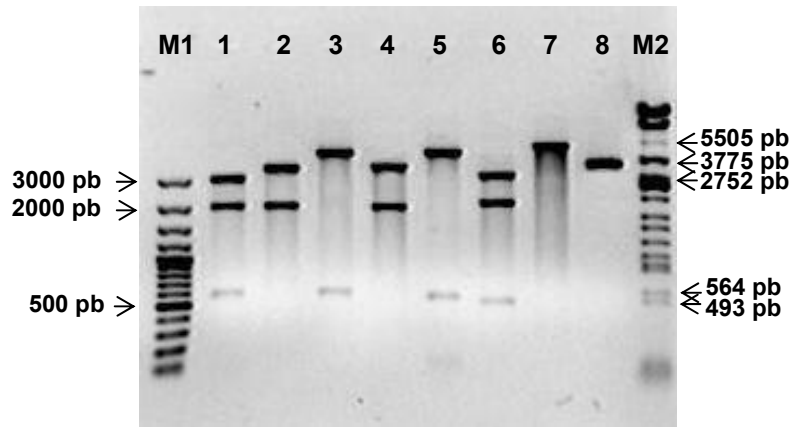


Figura 8. Análise eletroforética em gel de agarose (0,8%) da reação de restrição do clone pToR-A1.4 Δ CP clivado com as enzimas: *Sac* II/*Kpn* I/*Hind* III (1), gerando os fragmentos de 2.900 pb, 1.950 pb e 580 pb; *Sac* II/*Hind* III (2) e *Sac* II/*Not* I (4), liberando os fragmentos de 3.450 pb e 1.950 pb; *Kpn* I/*Hind* III (3) e *Kpn* I/*Xho* I (5), gerando os fragmentos de 4.800 pb e 580 pb; *Sac* I (6), liberando os fragmentos de 2.910 pb, 1.973 pb e 512 pb; e *Hind* III (7), apresentando um fragmento de 5.395 pb do vetor linearizado. 8 – Refere-se ao plasmídeo não clivado; M1 – Marcador de tamanho (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* - Fermentas); M2 – Marcador de tamanho derivado do DNA de fago λ clivado com as enzimas *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III.

Para a confirmação da construção do vetor viral, foi feito também sequenciamento do DNA plasmidial do clone pToR-A1.4 Δ CP (Figura 9). As sequências obtidas foram analisadas no programa *Sequencher*TM versão 4.1.4 (Genes Code Corporation) e comparadas com a sequência depositada no *GenBank*, com o auxílio do BLAST, confirmando a identidade dos fragmentos de 562 pb e 1.909 pb com a sequência do DNA-A do ToRMV.

(A) **ToRMV-ΔACP** 5 GGCATCGCGCTTAGGCATTTTGAATTAAGTTAACGACATATGCACGTTTAAATTTATAGC 64
 |||
AF291705 359 GGCATCGCGCTTAGGCATTTTGAATTAAGTTAACGACATATGCACGTTTAAATTTATAGC 300

ToRMV-ΔACP 65 CGTTATGCAACTTGGGCGTTAAGTAGTTCTAAATATCTTAGCTCGTCAAATGCATCATGA 124
 |||
AF291705 299 CGTTATGCAACTTGGGCGTTAAGTAGTTCTAAATATCTTAGCTCGTCAAATGCATCATGA 240

ToRMV-ΔACP 125 TTGGGCCAAAATTATTTTCAATAAAAATTAAGGTGA-AGGCCCAAAGAGAGGCC-AAA 182
 |||
AF291705 239 TTGGGCCAAAATTATTTTCAATAAAAATTAAGGTGAGAGGCCCCCAACAGAGGCCCGATG 180

ToRMV-ΔACP 183 CTAAATGGGCCTTAAAAAATCGCGCGGCCATCCGGTAATATTATATCGGATGGCC-GCC 241
 |||
AF291705 179 CTAAATGGGCCTTATAAAAAATCGCGCGGCCATCCGGTAATATTATATCGGATGGCCGGCC 120

ToRMV-ΔACP 242 ACGTGTAGCAATCTCCTTAAAGGAACTTCTAGTATATAAGAGCTACCATAACTACCAATT 301
 |||
AF291705 119 ACGTGTAGCAATCTCCTTAAAGGAACTTCTAGTATATAAGAGCTACCATAACTACCAATT 60

ToRMV-ΔACP 302 CATATGAGTTTTAGAGCAGCTACCAATTGGTAGTAAGGGTCATATTTACAAATATGCCA 360
 |||
AF291705 59 CATATGAGTTTTAGAGCAGCTACCAATTGGTAGTAAGGGTCATATTTACAAATATGCCA 1

ToRMV-ΔACP 361 TCAGCTACAAGGCGCTTCAAATAAAAGCCAAGAATTATTCCTAACATATCCCAAATGC 420
 |||
AF291705 2622 TCAGCTACAAGGCGCTTCAAATAAAAGCCAAGAATTATTCCTAACATATCCCAAATGC 2563

ToRMV-ΔACP 421 TCAATATCGAAAGAAGAAGCACTTCCCAATTGAAAAACCTAAACACTCCTACAAATAAG 480
 |||
AF291705 2562 TCAATATCGAAAGAAGAAGCACTTCCCAATTGAAAAACCTAAACACTCCTACAAATAAG 2503

ToRMV-ΔACP 481 AAGTTCATCAAAGTTTTGCAGAGAGCTCCATGAAAATGGGGAGCCTCATCTCCATGTGCTT 540
 |||
AF291705 2502 AAGTTCATCAAAGTTTTGCAGAGAGCTCCATGAAAATGGGGAGCCTCATCTCCATGTGCTT 2443

ToRMV-ΔACP 541 CTTCAATTCGAAGGCAACTACTGCTGCCAAAATCAACGATTCTTCGACCTGGTCTCCCCA 600
 |||
AF291705 2442 CTTCAATTCGAAGGCAACTACTGCTGCCAAAATCAACGATTCTTCGACCTGGTCTCCCCA 2383

ToRMV-ΔACP 601 ACAAGGTCAACACATTTCCATCCGAACATTCAGAGAGCTAAATCATCGTCCGACGTCAAG 660
 |||
AF291705 2382 ACAAGGTCAACACATTTCCATCCGAACATTCAGAGAGCTAAATCATCGTCCGACGTCAAG 2323

ToRMV-ΔACP 661 TCCTATGTCGACAAGGACGGAGATACTATCGAATGGGGGGAATTCCAAATCGACGGCAGA 720
 |||
AF291705 2322 TCCTATGTCGACAAGGACGGAGATACTATCGAATGGGGGGAATTCCAAATCGACGGCAGA 2263

ToRMV-ΔACP 721 AGTGCTAGAGGCGGTTGCCAGACAGCTAACGACGCTGCCGAGAAGCCTTGAACGCACCT 780
 |||
AF291705 2262 AGTGCTAGAGGCGGTTGCCAGACAGCTAACGACGCTGCCGAGAAGCCTTGAACGCACCT 2203

ToRMV-ΔACP 781 TCCCAAAGACATCGCCTTGCAGATAATCCGGGAGAAGATGCCGGAAAAGTTCTTATTTCA 840
 |||
AF291705 2202 TCC-AAAGACATCGCCTTGCAGATAATCCGGGAGAAGATGCCGGAAAAGTTCTTATTTCA 2144

ToRMV-ΔACP 841 GTTTCACAATCTAAATAGTAATTTAGATAGGATATTTGCAAGGGCTCCGGAGCCATGGGC 900
 |||
AF291705 2143 GTTTCACAATCTAAATAGTAATTTAGATAGGATATTTGCAAGGGCTCCGGAGCCATGGGC 2084

ToRMV-ΔACP 901 CCCTACGTTTCCCCTCTCCTCTTTCACTAACGTACCGAGAGAGATGCAAGATTGGGCAGA 960
 |||
AF291705 2083 CCCTACGTTTCCCCTCTCCTCTTTCACTAACGTACCGAGAGAGATGCAAGATTGGGCAGA 2024

ToRMV-ΔACP 961 TGACTATTTTGGGAGAGGTGCCGCTGCGCGGCCGGAACGACCTATTAGTATCATCATTGA 1020
 |||
AF291705 2023 TGACTATTTTGGGAGAGGTGCCGCTGCGCGGCCGGAACGACCTATTAGTATCATCATTGA 1964

ToRMV-ΔCP 1021 AGGTGATTCTCGAACGGGAAAGACGATGTGGGCACGTGCATTAGGGGCCATAATTATTT 1080
|||||
AF291705 1963 AGGTGATTCTCGAACGGGAAAGACGATGTGGGCACGTGCATTAGGGGCCATAATTATTT 1904

ToRMV-ΔCP 1081 GAGTGGTCACCTCGATTTC AATCCTAGGGTTTATTCAAATCATGTTGAATATAACGTCAT 1140
|||||
AF291705 1903 GAGTGGTCACCTCGATTTC AATCCTAGGGTTTATTCAAATCATGTTGAATATAACGTCAT 1844

ToRMV-ΔCP 1141 CGATGACATCGCACCGCACTATCTAAAGTTAAAGCACTGGAAAGAATTGATTGGGGCCCA 1200
|||||
AF291705 1843 CGATGACATCGCACCGCACTATCTAAAGTTAAAGCACTGGAAAGAATTGATTGGGGCCCA 1784

ToRMV-ΔCP 1201 AAGGGATTGGCAATCAAAC TGTAAATACGGAAAGCCAGTTCAAATTAAGGTGGTATCCC 1260
|||||
AF291705 1783 AAGGGATTGGCAATCAAAC TGTAAATACGGAAAGCCAGTTCAAATTAAGGTGGTATCCC 1724

ToRMV-ΔCP 1261 ATGCATCGTGCTTTGCAATCCTGGCGAGGGGGCCAGCTATAAATGTTTCCTCGACAAAGA 1320
|||||
AF291705 1723 ATGCATCGTGCTTTGCAATCCTGGCGAGGGGGCCAGCTATAAATGTTTCCTCGACAAAGA 1664

ToRMV-ΔCP 1321 AGAGAACTCAGCATTAAAGTAGTTGGACAAAGCACAATGCACAATTCATCTTCCTCAACTC 1380
|||||
AF291705 1663 AGAGAACTCAGCATTAAAGTAGTTGGACAAAGCACAATGCACAATTCATCTTCCTCAACTC 1604

ToRMV-ΔCP 1381 CCCCCTCTATCAAAGTTCAACATCGGGCTGCTAAGAGGAGAGCTATACGAAGAAGACGAA 1440
|||||
AF291705 1603 CCCCCTCTATCAAAGTTCAACATCGGGCTGCTAAGAGGAGAGCTATACGAAGAAGACGAA 1544

ToRMV-ΔCP 1441 TTGATTTACAGTGCGGCTGCTCCATTTTCGTACACATAGATTGCGCAGGACATGGATTCA 1500
|||||
AF291705 1543 TTGATTTACAGTGCGGCTGCTCCATTTTCGTACACATAGATTGCGCAGGACATGGATTCA 1484

ToRMV-ΔCP 1501 CGCACAGGGGAACTCATCACTGCACATCAGGCAGAGAATGGCGTGTATACTTGGGAAATA 1560
|||||
AF291705 1483 CGCACAGGGGAACTCATCACTGCACATCAGGCAGAGAATGGCGTGTATACTTGGGAAATA 1424

ToRMV-ΔCP 1561 TCAAATCCCCTTTATTTCAAGATGTACAACGTCGAGGACATACTATAACGAGGACCAGA 1620
|||||
AF291705 1423 TCAAATCCCCTTTATTTCAAGATGTACAACGTCGAGGACATACTATAACGAGGACCAGA 1364

ToRMV-ΔCP 1621 GTCTACCACGTCCAAATACGGTTCAACCACAACCTGAGGAGAGTACTGGGTCTCCACAAG 1680
|||||
AF291705 1363 GTCTACCACGTCCAAATACGGTTCAACCACAACCTGAGGAGAGTACTGGGTCTCCACAAG 1304

ToRMV-ΔCP 1681 GCTTATCTCAACTTCCAAATCTGGACGACATCCCTGAGAGCTTCTGGGATGACATATTTA 1740
|||||
AF291705 1303 GCTTATCTCAACTTCCAAATCTGGACGACATCCCTGAGAGCTTCTGGGATGACATATTTA 1244

ToRMV-ΔCP 1741 AATAGATTTAAATATTTACTTATGTTGTACATAGATCAGCTAGGCGTTATTTAGTTAAT 1800
|||||
AF291705 1243 AATAGATTTAAATATTTACTTATGTTGTACATAGATCAGCTAGGCGTTATTTAGTTAAT 1184

ToRMV-ΔCP 1801 AATGTAATTAGAGCTGTTGCTTCGCAACAGACAGACAATATGTAATGCTGTACTCGAG 1860
|||||
AF291705 1183 AATGTAATTAGAGCTGTTGCTTCGCAACAGACAGACAATATGTAATGCTGTACTCGAG 1124

ToRMV-ΔCP 1861 AATCATCAATAAAAAGTCAAAAATTTATTAATTTGTTATCG 1900
|||||
AF291705 1123 AATCATCAATAAAAAGTCAAAAATTTATTAATTTGTTATCG 1084

(B) SMC 1 TCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTC 60
|||||
x52327 677 TCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTC 736

SMC 61 GAC 63
|||
x52327 737 GAC 739

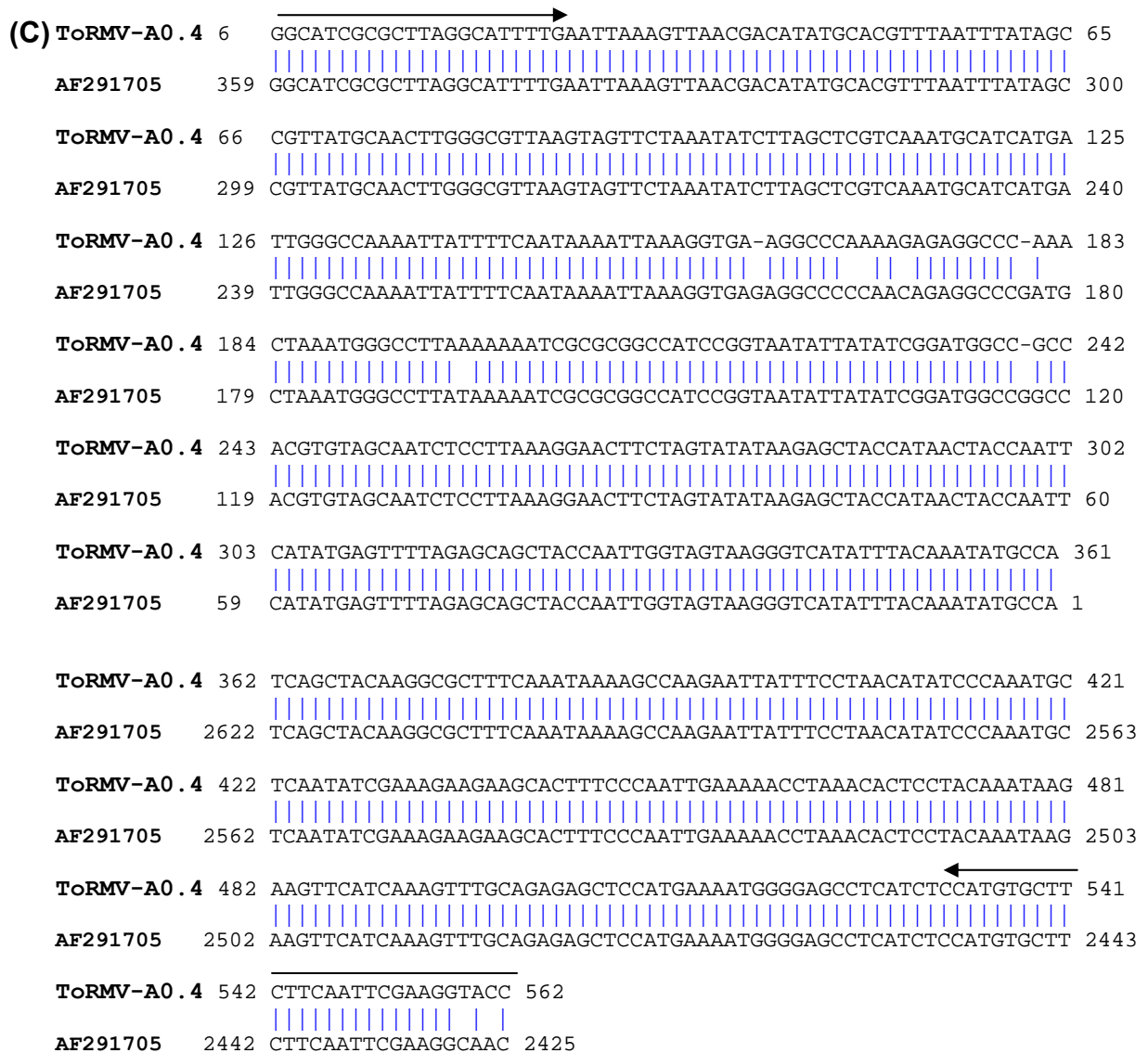


Figura 9. Alinhamento da sequência do clone pToR-A1.4ΔCP com a sequência depositada no *GenBank* (AF291705 – sequência completa do DNA-A do ToRMV) e com a sequência do pKS+ (X52327). **(A)** Refere-se ao ToRMV-AΔCP; **(B)** refere-se ao sítio múltiplo de clonagem (SMC) do pKS+; e **(C)** refere-se ao ToRMV-A0.4. As barras em azul indicam as bases idênticas no alinhamento e as setas referem-se aos locais de anelamento dos oligonucleotídeos.

O vetor viral pToR-A1.4ΔCP possui 5.395 pb, sendo 2.900 pb provenientes do plasmídeo pKS+, 1.909 pb do ToRMV-AΔCP e 562 pb do ToRMV-A0.4. O vetor possui duas origens de replicação virais derivadas do clone pUb1-G1, enquanto o sítio múltiplo de clonagem e os genes de seleção são derivados do plasmídeo pKS+. O códon de terminação da ORF CP foi mantido no fragmento de 1.909 pb e o códon de iniciação da mesma ORF foi preservado em ambos os fragmentos (Figuras 10 e 11).

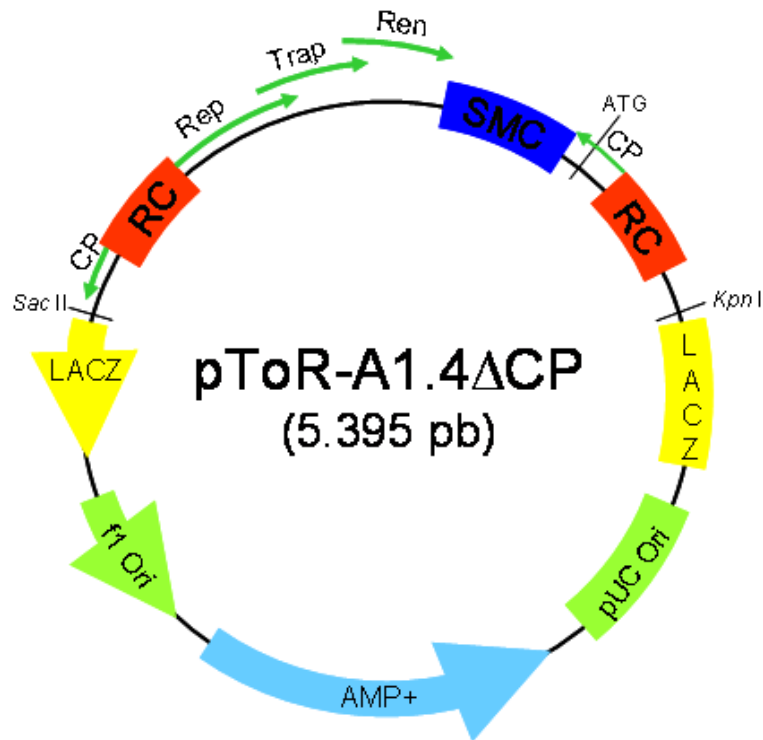


Figura 10. Representação esquemática do vetor viral pToR-A1.4ΔCP, baseado no DNA-A do begomovírus ToRMV e no plasmídeo pKS+, que teve seu sítio múltiplo de clonagem (SMC) interrompido em ambas as regiões terminais para a inserção do ToRMV-A0.4 e do ToRMV-AΔCP.

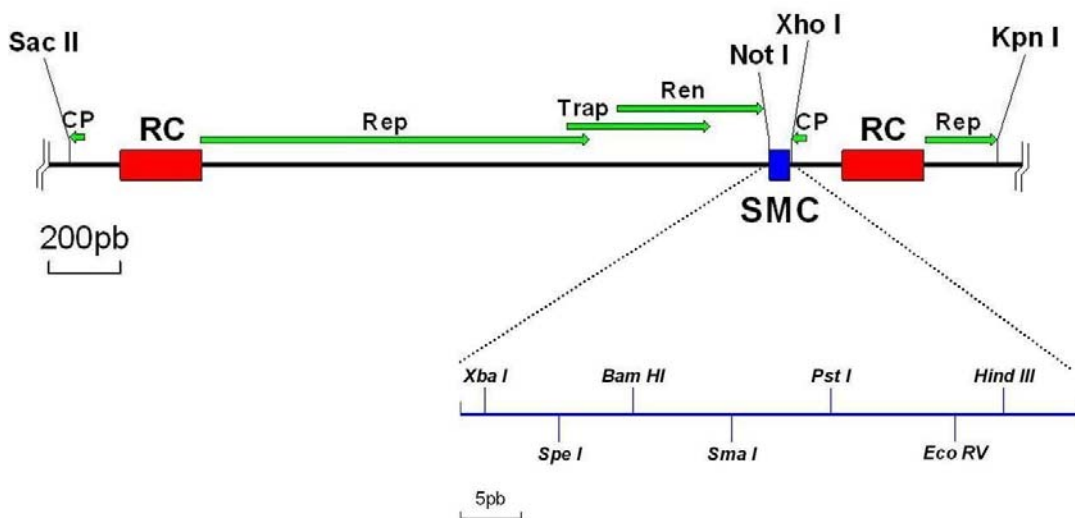


Figura 11. Representação esquemática parcial do vetor viral pToR-A1.4ΔCP, ressaltando a localização do sítio de clivagem das sete enzimas de restrição remanescentes do sítio múltiplo de clonagem (SMC) do pKS+ (*Xba* I, *Spe* I, *Bam* HI, *Sma* I, *Pst* I, *Eco* RV e *Hind* III). As setas verdes indicam os genes virais provenientes do ToRMV-A e o sentido em que ocorre a transcrição: *rep* (*replication-associated protein*); *trap* (*trans-activating protein*); *ren* (*replication-enhancer protein*); *cp* (proteína capsidial). A região comum (RC) e o códon de iniciação da ORF CP também estão indicados.

As duas origens de replicação, cada uma localizada em uma região comum (RC), são essenciais para que a proteína Rep promova a separação da parte do vetor proveniente do vírus, da parte proveniente do plasmídeo pKS+, durante a primeira replicação do vetor na célula. Assim, a partir desse momento, o vetor se replicará independente do pKS+ (Figura 12).

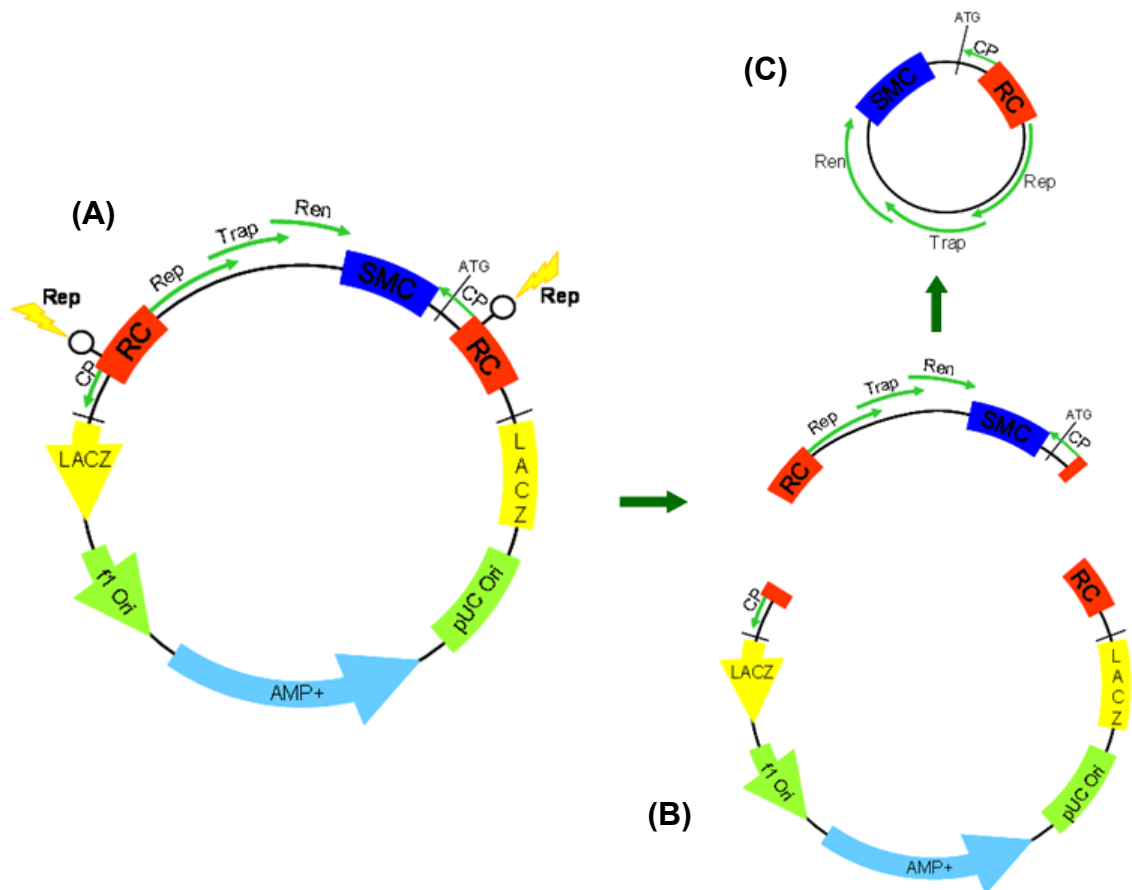


Figura 12. Representação esquemática da etapa inicial do processo de replicação do vetor viral pToR-A1.4ΔCP. **(A)** Clivagem do vetor pela proteína Rep no grupo existente nas duas regiões comuns (RC), contendo a sequência conservada 5'-TAATATTAC-3'. **(B)** Separação da parte do vetor proveniente do vírus, da parte proveniente do plasmídeo pKS+. **(C)** Vetor viral, com aproximadamente, 1.980 pb passa a se replicar independente do plasmídeo pKS+.

A construção do vetor pToR-A1.4ΔCP baseou-se no princípio de que os begomovírus não requerem a proteína capsidial para causar infecção sistêmica (Saunders *et al.*, 1991). Assim, esse gene foi removido, permanecendo apenas seus códons de iniciação e de terminação. Uma vez que a porção *upstream* à região codificadora do gene *cp* não foi eliminada,

permaneceram o promotor e os *cis*-elementos necessários à transcrição do fragmento a ser inserido no vetor. O sítio múltiplo de clonagem do pToR-A1.4ΔCP contém sítios para sete enzimas de restrição (*Xba* I, *Spe* I, *Bam* HI, *Sma* I, *Pst* I, *Eco* RV e *Hind* III). A clivagem por duas dessas enzimas (*Eco* RV e *Sma* I) gera extremidades abruptas, o que facilitará estudos posteriores caso o fragmento que venha a ser inserido não possua sítios de clivagem para as enzimas presentes no vetor.

5.2. Clonagem de fragmentos de interesse no vetor pToR-A1.4ΔCP para indução do silenciamento gênico

Para a obtenção de fragmentos dos genes de interesse, o cDNA foi sintetizado a partir de RNA total de folhas de soja e tomate e de sementes de soja e os fragmentos foram obtidos por PCR, utilizando *primers* específicos.

A amplificação dos fragmentos foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose e o tamanho dos fragmentos observados correspondeu ao tamanho esperado para o produto amplificado a partir dos *primers* específicos para cada gene. Os tamanhos dos fragmentos foram de 382 pb, para fitoeno dessaturase (PDS) de soja; 438 pb, para PDS de tomate; 703 pb, para *myo*-inositol-1-fosfato sintase (MIPS1); 457 pb, para MIPS2; 366 pb, para estaquiose sintase (STS1); e 387 pb, para STS2 (Figura 13).

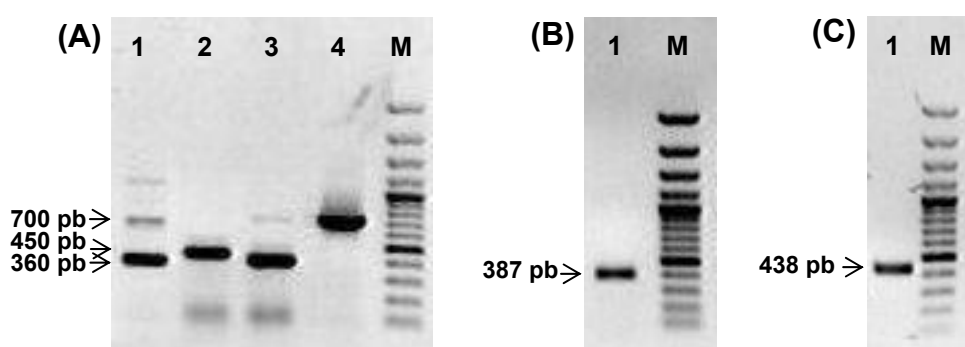


Figura 13. Análise eletroforética em gel de agarose (0,8%) dos fragmentos amplificados a partir do cDNA utilizando *primers* específicos. **(A)** 1 – PDS de soja, com 382 pb; 2 – MIPS2, 457 pb; 3 – STS1, 366 pb; 4 – MIPS1, 703 pb. **(B)** 1 – STS 2, com 387 pb; **(C)** 1 – PDS de tomate, com 438 pb. M – Refere-se ao marcador de tamanho (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* - Fermentas).

Foram isolados dois fragmentos de MIPS para verificar possíveis diferenças no silenciamento devido ao tamanho dos fragmentos. Para STS,

foram isolados dois fragmentos de regiões diferentes do gene. STS2 tem similaridade apenas com estaquiose sintase, já STS1 apresenta similaridade com rafinose sintase e estaquiose sintase (Fialho, 2007).

O uso de sequências relativamente pequenas para o silenciamento tem sido bastante descrito por vários autores (Ogita *et al.*, 2004; Miles *et al.*, 2005). Além de serem suficientes para garantir um silenciamento eficaz, pequenos fragmentos são de fácil manipulação e favorecem a eficiência da clonagem e da transformação, já que a construção de cassetes de expressão geralmente envolve vetores de alto peso molecular.

Em experimentos de VIGS, foi demonstrado que o gene fitoeno dessaturase pode ser silenciado com insertos de até 23 nucleotídeos (Thomas *et al.*, 2001). Entretanto, o silenciamento é menos extensivo e mais transiente do que quando insertos de 150 a 500 nt são utilizados. Insertos maiores podem ser usados, mas geralmente são mais instáveis em vetores virais e não causam um aumento no fenótipo de silenciamento (Lu *et al.*, 2003).

Após a confirmação da amplificação, os fragmentos obtidos foram cortados e purificados do gel de agarose, para eliminar fragmentos inespecíficos eventualmente amplificados nas reações de PCR. Os fragmentos foram ligados ao vetor pGEM-T Easy e utilizados para transformar células ultracompetentes de *Escherichia coli*. Dez colônias recombinantes para cada inserto foram analisadas por meio de PCR, usando *primers* específicos, e todas continham o fragmento esperado. Uma colônia de cada experimento foi escolhida e a clonagem foi confirmada por meio de sequenciamento do DNA plasmidial dos clones isolados.

As sequências isoladas de fitoeno dessaturase (PDS) de soja e tomate e de *myo*-inositol-1-fosfato sintase (MIPS1 e MIPS2) de soja foram alinhadas com as sequências depositadas no banco de dados, com o auxílio do BLAST, o que confirmou a similaridade de cada fragmento com as sequências dos genes aos quais eles se referem (Figura 14 e Figura 15). Para os fragmentos do gene da estaquiose sintase (STS1 e STS2), foram feitos alinhamentos com a sequência de cDNA obtida por Fialho (2007), pois a sequência completa desse gene ainda não se encontra depositada no *GenBank* (Figura 16).

(A)

PDS soja	1	TCAGACGCCACAATTTTCGTTATCATTGGCGGGAGCGATTCAATGGGTCTTAGTTTGC	60
M64704	299	TCAGACGCCACAATTTTCGTTTTCATTGGCGGGAGCGACTCAATGGGTCTTACTTTGC	358
PDS soja	561	CCCCTCCAATTCGTGCTCCTAAGAGGAACCATTTCTCTCCCTTGCCTGTCGTTTGC	120
M64704	359	CCCCTCCGATTCGTGCTCCTAAGAGGAACCATTTCTCTCCCTTGCCTGTCGTTTGC	418
PDS soja	121	GATTATCCTCGACCGGAGCTCGAAAACACTGTTAATTTTCGTCGAAGCTGCTTACTTGTCT	180
M64704	419	GATTATCCACGCCAGAGCTCGAAAACACCGTTAATTTTCGTTGAAGCTGCTTACTTGTCT	478
PDS soja	181	TCCACCTTCCGTGCTTCTCCGCGTCCACTAAAACCTTGAACATCGTTATTGCTGGCGCA	240
M64704	479	TCCACCTTTTCGTGCTTCTCCGCGTCCCTAAAACCTTGAACATCGTTATTGCCGGTGCA	538
PDS soja	241	GGATTGGCTGGTTTATCAACTGCAAAATATTTGGCTGATGCTGGGCATAAACCTATATTG	300
M64704	539	GGATTGGCTGGTTTATCAACTGCAAAATATTTGGCTGATGCTGGGCATAAACCTATATTG	598
PDS soja	301	CTGGAAGCAAGAGACGTTCTAGGTGAAAGGTTGCTGCATGGAAAGACAAGGATGGAGAC	360
M64704	599	CTGGAAGCAAGAGACGTTCTAGGTGAAAGGTTGCTGCATGGAAAGACAAGGATGGAGAC	658
PDS soja	361	TGGTACGAGACAGGCCTACACA	382
M64704	659	TGGTACGAGACAGGCCTACACA	680

(B)

PDS tomate	1	CTTTGGAGCTCGAGGTCGTTCTTTGGGAACTGAAAGTCGAGATGGTTGCTTGCAAAGG	60
S36691	505	CTTTGGAGCTCGAGGTCGTTCTTTGGGAACTGAAAGTCGAGATGGTTGCTTGCAAAGG	564
PDS tomate	61	AATTCGTTATGTTTTGCTGGTAGCGAATCAATGGGTGATAAGTTAAAGATTCGACTCCC	120
S36691	65	AATTCGTTATGTTTTGCTGGTAGCGAATCAATGGGTGATAAGTTAAAGATTCGACTCCC	624
PDS tomate	121	CTTGCCACGACCAGAAGATTGGTTAAGGACTTGGGGCCTTTAAAGGTCGTATGCATTGAT	180
S36691	625	CATGCCACGACCAGAAGATTGGTTAAGGACTTGGGGCCTTTAAAGGTCGTATGCATTGAT	684
PDS tomate	181	TATCCAAGACCAGAGCTGGACAATACAGTTAACTATTTGGAGGCTGCATTTTATCATCA	240
S36691	685	TATCCAAGACCAGAGCTGGACAATACAGTTAACTATTTGGAGGCTGCATTTTATCATCA	744
PDS tomate	241	ACGTTCCGTGCTTCTCCGCGCCCAACTAAACCATTGGAGATTGTTATTGCTGGTGCAGGT	300
S36691	745	ACGTTCCGTGCTTCTCCGCGCCCAACTAAACCATTGGAGATTGTTATTGCTGGTGCAGGT	804
PDS tomate	301	TTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAAATATTTGGCAGATGCTGGTCACAAACCGATACTGCTG	360
S36691	805	TTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAAATATTTGGCAGATGCTGGTCACAAACCGATACTGCTG	864
PDS tomate	361	GAGGCAAGGGATGTTCTAGGTGAAAGGTAGCTGCATGGAAAGATGATGATGGAGATTGG	420
S36691	865	GAGGCAAGGGATGTTCTAGGTGAAAGGTAGCTGCATGGAAAGATGATGATGGAGATTGG	924
PDS tomate	421	TACGAGACTCCATGGCAT	438
S36691	925	TACGAGACTGGTTTGCAT	942

Figura 14. Alinhamento entre as sequências clonadas e as sequências de cDNA, depositadas no *GenBank*, dos genes que codificam a enzima fitoeno dessaturase (PDS) em soja **(A)** e em tomate **(B)**. As barras em azul indicam as bases idênticas no alinhamento e as setas referem-se aos locais de anelamento dos oligonucleotídeos.

(A)MIPS1 1 ACCACCGAACTTGTTACGAGAACAGGAATGGCACCTATCAGTGGATTGTCAAACCCAAA 60
 |||
 AY038802 92 ACCACCGAACTTGTTACGAGAACAGGAATGGCACCTATCAGTGGATTGTCAAACCCAAA 151

MIPS1 61 TCTGTCAAATACGAATTTAAAACCAACATCCATGTTCTAAATTAGGGGTAATGCTTGTG 120
 |||
 AY038802 152 TCTGTCAAATACGAATTTAAAACCAACATCCATGTTCTAAATTAGGGGTAATGCTTGTG 211

MIPS1 121 GGTGGGGTGGAAACAACGGCTCAACCCTCACCGGTGGTGTATTGCTAACCGAGAGGGC 180
 |||
 AY038802 212 GGTGGGGTGGAAACAACGGCTCAACCCTCACCGGTGGTGTATTGCTAACCGAGAGGGC 271

MIPS1 181 ATTTTCATGGGCTACAAAGGACAAGATTCAACAAGCCAATTACTTTGGCTCCCTCACCCAA 240
 |||
 AY038802 272 ATTTTCATGGGCTACAAAGGACAAGATTCAACAAGCCAATTACTTTGGCTCCCTCACCCAA 331

MIPS1 241 GCCTCAGCTATCCGAGTTGGGTCCCTCCAGGGAGAGGAAATCTATGCCCCATTCAAGAGC 300
 |||
 AY038802 332 GCCTCAGCTATCCGAGTTGGGTCCCTCCAGGGAGAGGAAATCTATGCCCCATTCAAGAGC 391

MIPS1 301 CTGCTTCCAATGGTTAACCTGACGACATTGTGTTTGGGGGATGGGATATCAGCAACATG 360
 |||
 AY038802 392 CTGCTTCCAATGGTTAACCTGACGACATTGTGTTTGGGGGATGGGATATCAGCAACATG 451

MIPS1 361 AACCTGGCTGATGCCATGGCCAGGGCAAAGGTGTTTGACATCGATTTGCAGAAGCAGTTG 420
 |||
 AY038802 452 AACCTGGCTGATGCCATGGCCAGGGCAAAGGTGTTTGACATCGATTTGCAGAAGCAGTTG 511

MIPS1 421 AGGCCTTACATGGAATCCATGCTTCCACTCCCCGGAATCTATGACCCGGATTTTCATTGCT 480
 |||
 AY038802 512 AGGCCTTACATGGAATCCATGCTTCCACTCCCCGGAATCTATGACCCGGATTTTCATTGCT 571

MIPS1 481 GCCAACCAAGAGGAGCGTGCCAACAACGTGATCAAGGGCACAAAGCAAGAGCAAGTTCAA 540
 |||
 AY038802 572 GCCAACCAAGAGGAGCGTGCCAACAACGTGATCAAGGGCACAAAGCAAGAGCAAGTTCAA 631

MIPS1 541 CAAATCATCGAAGACATCAAGGCGTTTAAGGAAGCCACCAAAGTGGACAAGGTGGTTGTA 600
 |||
 AY038802 632 CAAATCATCGAAGACATCAAGGCGTTTAAGGAAGCCACCAAAGTGGACAAGGTGGTTGTA 691

MIPS1 601 CTGTGGACTGCCAACACAGAGAGGTACAGTAATTTGGTTGTGGGCCTTAATGACACCATG 660
 |||
 AY038802 692 CTGTGGACTGCCAACACAGAGAGGTACAGTAATTTGGTTGTGGGCCTTAATGACACCATG 751

MIPS1 661 GAGAATCTCTGGCTGCTGTGGACAGAAATGAGGCTGAGATTT 703
 |||
 AY038802 752 GAGAATCTCTGGCTGCTGTGGACAGAAATGAGGCTGAGATTT 794

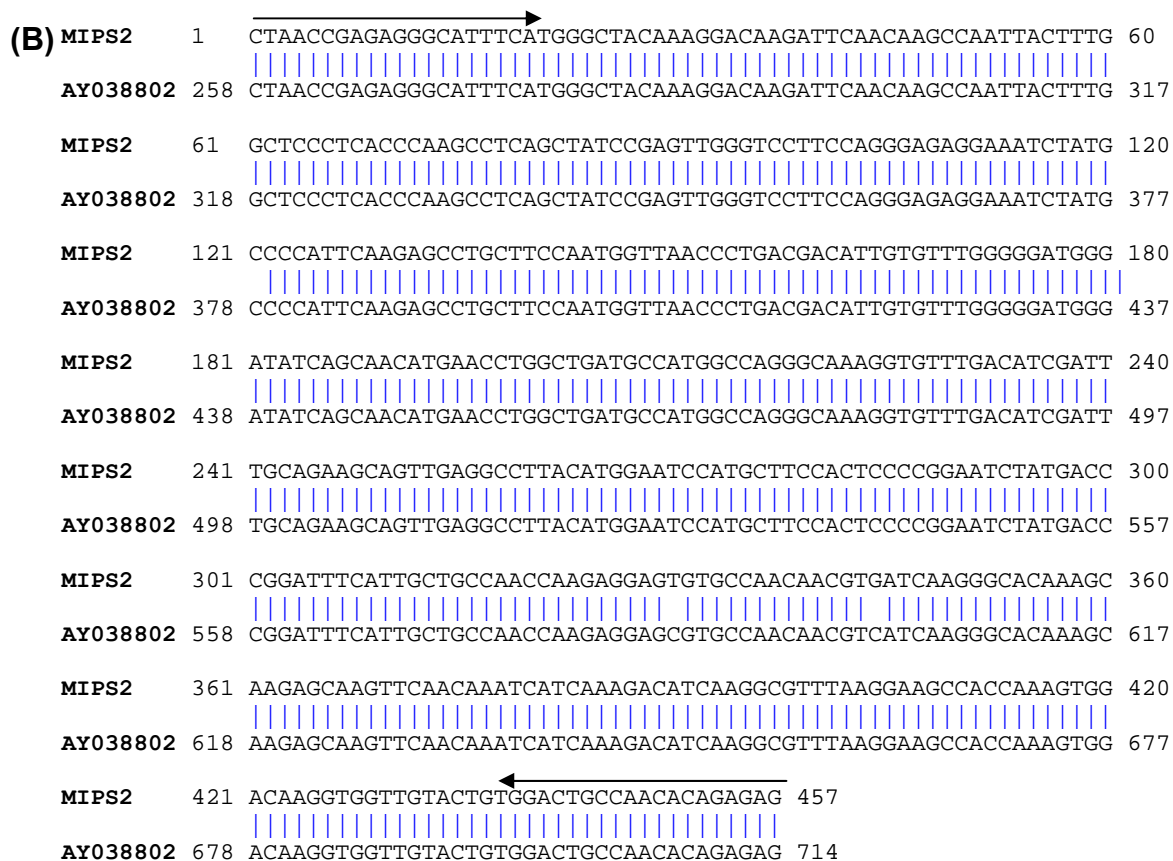


Figura 15. Alinhamento entre as sequências clonadas e a sequência de cDNA, depositada no *GenBank*, do gene que codifica a enzima *myo*-inositol-1-fosfato sintase. **(A)** Refere-se ao fragmento MIPS1 de 703 pb e **(B)** refere-se ao fragmento MIPS2 de 457 pb. As barras em azul indicam as bases idênticas no alinhamento e as setas referem-se aos locais de anelamento dos oligonucleotídeos.

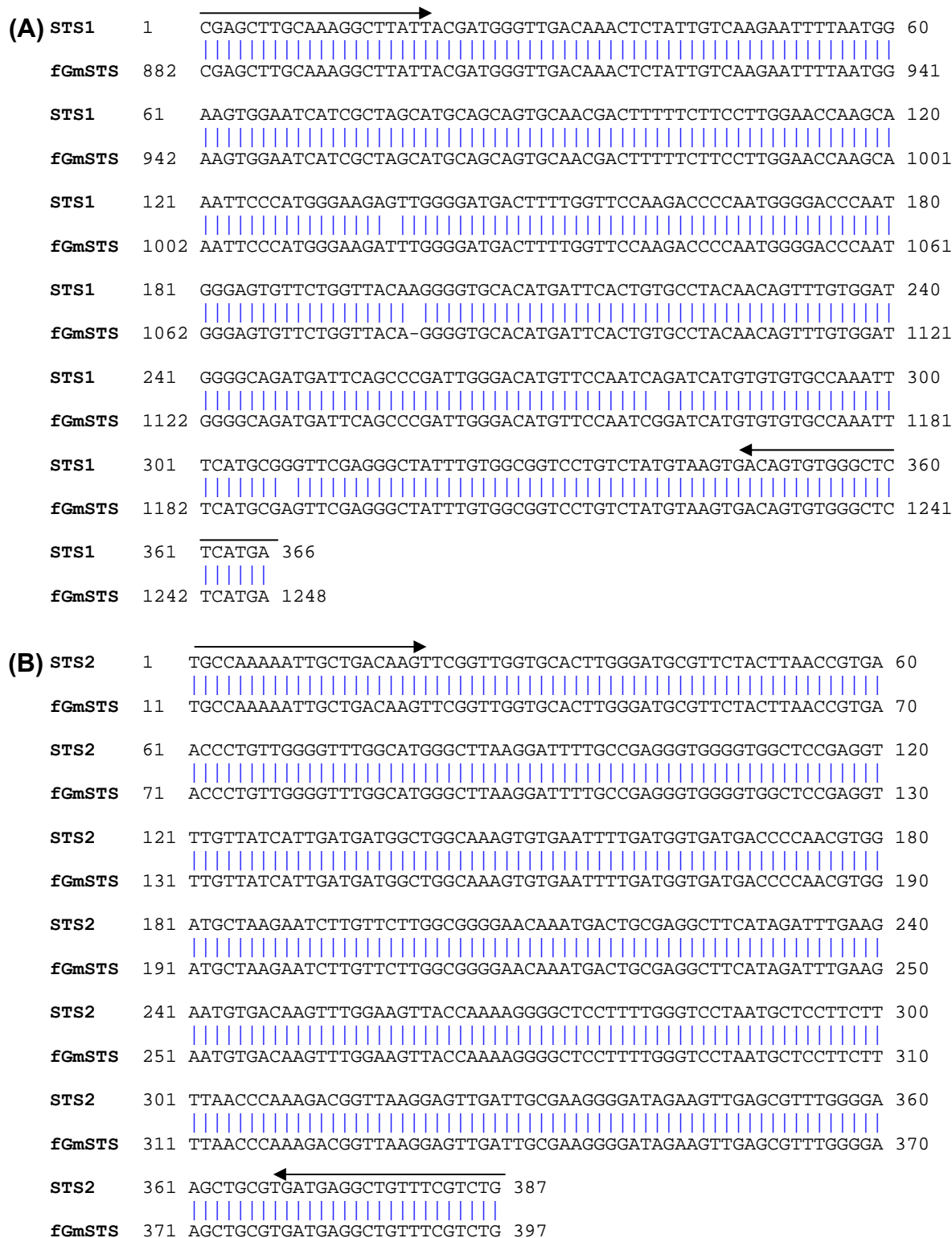


Figura 16. Alinhamento entre as sequências clonadas e a sequência de cDNA, clonada e sequenciada por Fialho (2007), do gene que codifica a enzima estaquiose sintase em soja. **(A)** Refere-se ao fragmento STS1 de 366 pb e **(B)** refere-se ao fragmento STS2 de 387 pb. As barras em azul indicam as bases idênticas no alinhamento e as setas referem-se aos locais de anelamento dos oligonucleotídeos.

Para a clonagem no vetor viral, os fragmentos foram liberados do vetor pGEM-T Easy por meio de clivagem com as enzimas *Bam* HI e *Xba* I, para PDS de soja e tomate, MIPS1 e STS1; com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III, para STS2; e *Xba* I e *Hind* III, para MIPS2. Os fragmentos foram purificados e inseridos no vetor viral pToR-A1.4ΔCP, previamente clivado em seu sítio múltiplo de clonagem com as mesmas enzimas de restrição que foram utilizadas para clivar os fragmentos amplificados. O DNA plasmidial foi extraído e a clonagem foi confirmada por PCR (Figura 17) e pela clivagem enzimática dos clones isolados (Figura 18).

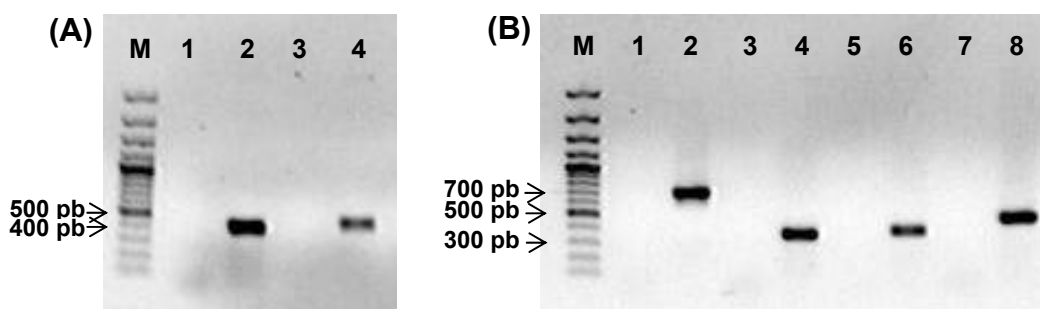


Figura 17. Análise eletroforética em gel de agarose (0,8%) do PCR a partir do DNA plasmidial para confirmação da clonagem dos fragmentos no vetor pToR-A1.4ΔCP. **(A)** 1 e 3 – Controle negativo (branco) da reação de PCR com *primers* específicos para cada fragmento; 2 – Fragmento amplificado de 382 pb, correspondente ao PDS de soja; 4 – Fragmento amplificado de 438 pb, correspondente ao PDS de tomate; **(B)** 1, 3, 5 e 7 – Controle negativo (branco) da reação de PCR com *primers* específicos para cada fragmento; 2 – Fragmento amplificado de 703 pb, correspondente ao MIPS1; 4 – Fragmento amplificado de 366 pb, correspondente à STS1; 6 – Fragmento amplificado de 387 pb, correspondente à STS2; 8 – Fragmento amplificado de 457 pb, correspondente ao MIPS2. M – refere-se ao marcador de tamanho (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* - Fermentas).

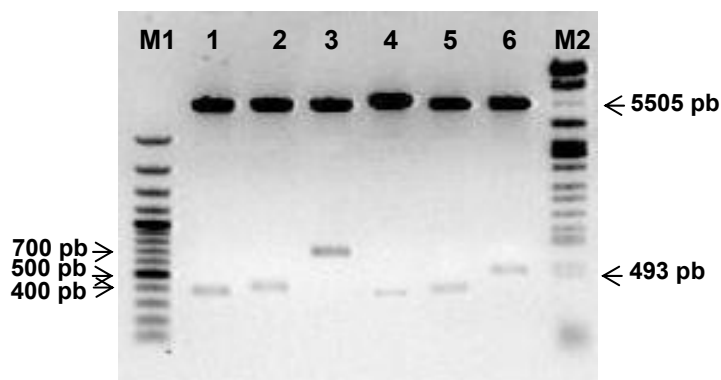


Figura 18. Análise eletroforética em gel de agarose (0,8%) da reação de restrição dos clones pToR-A1.4 Δ CP contendo os fragmentos: PDS de soja de 382 pb (1); PDS de tomate de 438 pb (2); MIPS1 de 703 pb (3); STS1 de 366 pb (4); STS2 de 387 pb (5); e MIPS2 de 457 pb (6). O fragmento de 5.400 pb corresponde ao vetor viral linearizado. As enzimas utilizadas para a clivagem de (1), (2), (3) e (4) foram *Bam* HI e *Xba* I. (5) foi clivado com *Bam* HI e *Hind* III. Já em (6), as enzimas utilizadas foram *Xba* I e *Hind* III. M1 – Marcador de tamanho (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* - Fermentas); M2 – Marcador de tamanho derivado do DNA de fago λ clivado com as enzimas *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III.

Essas construções serão inoculadas, via biobalística, em plantas de soja e tomate para a indução do silenciamento gênico. Um fragmento do gene de fitoeno dessaturase de *N. benthamiana* também será isolado e clonado no vetor viral pToR-A1.4 Δ CP, para posteriormente ser inoculado nesta planta para indução de VIGS.

5.3. Teste de infectividade

Para verificar a infectividade do vetor viral, plantas de tomateiro ‘Santa Clara’ e *N. benthamiana* e radículas de soja da variedade ‘MSoy 8400’ foram co-inoculadas, via biobalística, com os clones pToR-A1.4 Δ CP (vetor viral vazio) e pUb1-G4 (ToRMV-B).

O DNA total de todas as plantas foi extraído 21 dias após a inoculação e a infecção sistêmica pelo vetor viral foi verificada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para o DNA-A do ToRMV (*primers* P3-CP e P4-Rep).

O fragmento amplificado a partir do DNA extraído de plantas de *N. benthamiana* foi de 562 pb, correspondendo ao tamanho esperado para o produto amplificado pelos *primers* (Figura 19 A). Os resultados obtidos indicam

que 82% das plantas inoculadas foram infectadas sistemicamente com o vetor viral (Tabela 3).

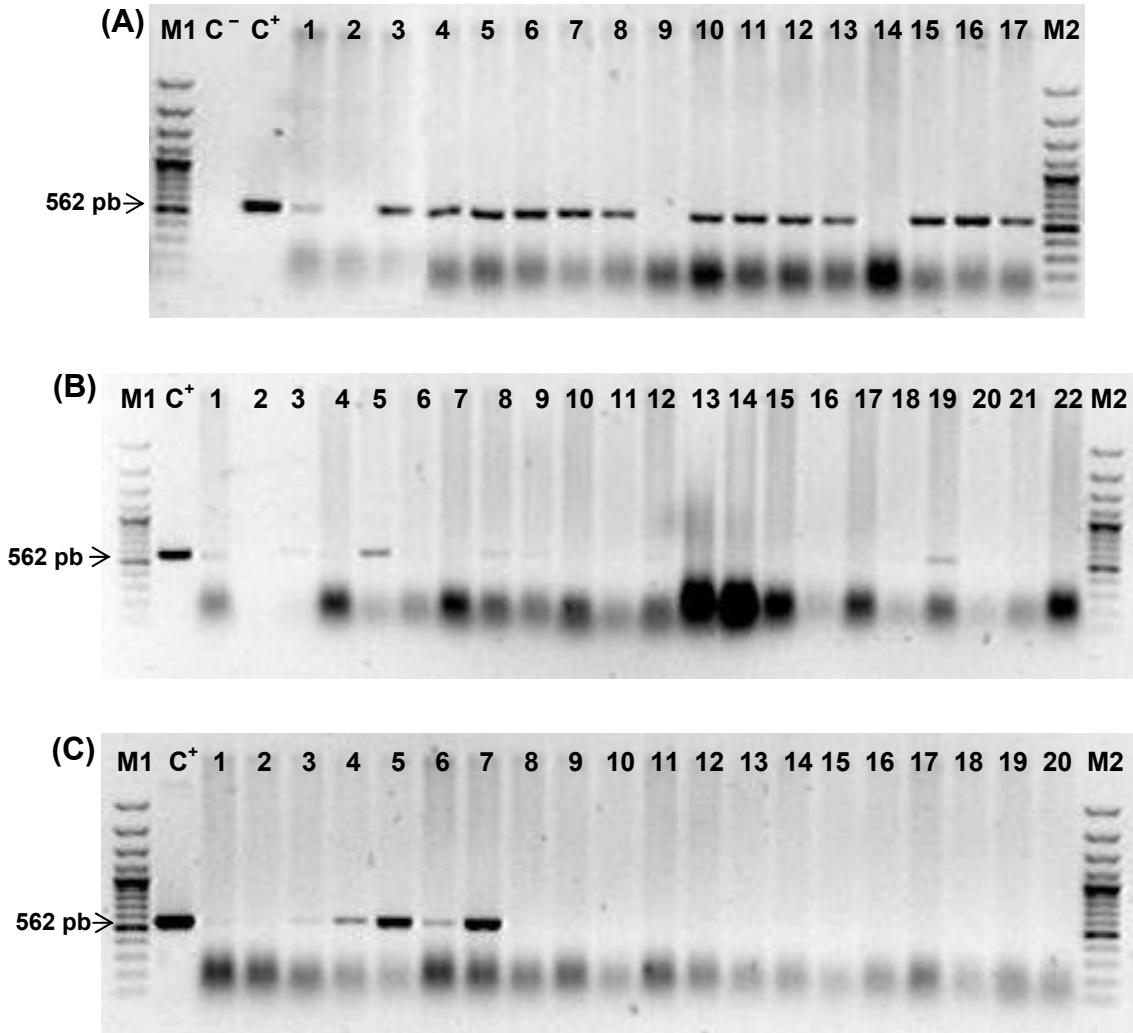


Figura 19. Análise eletroforética em gel de agarose (0,8%) dos produtos amplificados com os *primers* P3-CP e P4-Rep, para verificação do teste de infectividade. **(A)** Amplificação a partir de DNA extraído de plantas de *N. benthamiana* bombardeadas: apenas com partículas de tungstênio (1 e 2); com os clones pUb1-G1 (ToRMV-A) e pUb1-G4 (ToRMV-B) (3 a 6); e com o vetor pToR-A1.4ΔCP e o clone pUb1-G4 (7 a 17). **(B)** Amplificação a partir de DNA extraído de plantas de soja bombardeadas: apenas com partículas de tungstênio (1 a 4); com os clones pUb1-G1 e pUb1-G4 (5 a 7); e com o vetor pToR-A1.4ΔCP e o clone pUb1-G4 (8 a 22). **(C)** Amplificação a partir de DNA extraído de plantas de tomate bombardeadas: apenas com partículas de tungstênio (1 a 3); com os clones pUb1-G1 e pUb1-G4 (4 a 7); e com o vetor pToR-A1.4ΔCP e o clone pUb1-G4 (8 a 20). M – refere-se ao marcador de tamanho (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* - Fermentas); C⁺ – refere-se ao controle positivo do PCR (utilizando o vetor pToR-A1.4ΔCP como DNA molde); C⁻ – refere-se ao controle negativo do PCR (branco).

Tabela 3. Resultado da inoculação de plantas de *N. benthamiana*, soja e tomate com o vetor pToR-A1.4ΔCP vazio juntamente com o clone pUb1-G4 (ToRMV-B). As plantas foram inoculadas via biobalística e a infecção viral foi confirmada via PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o vetor viral, 21 dias após a inoculação.

Espécie	Infectividade (nº de plantas infectadas/nº de plantas inoculadas)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	9/11
Soja 'MSoy 8400'	1/15
Tomate 'Santa Clara'	0/13

As plantas de *N. benthamiana* testadas, que foram positivas para infecção viral, não apresentaram sintomas macroscópicos. Este fato constitui uma grande vantagem em estudos futuros utilizando VIGS, uma vez que não deverá ocorrer sobreposição entre o fenótipo do silenciamento e os sintomas da infecção viral.

As reações de PCR a partir de DNA extraído de plantas de soja 'MSoy 8400' e de tomate 'Santa Clara', inoculadas com o vetor viral, apresentaram pouca ou nenhuma amplificação com os *primers* P3-CP e P4-Rep (Figura 19 B-C e Tabela 3).

Estes resultados indicam que o vetor pToR-A1.4ΔCP apresentou uma baixa taxa de replicação nestas plantas ou o movimento foi prejudicado devido ao menor comprimento do vetor vazio (cerca de 1.980 nt após clivagem por Rp) em relação ao DNA-A do ToRMV, que é de 2.622 nt. Segundo Rojas *et al.* (1998), as proteínas de movimento MP e NSP reconhecem o DNA de maneira específica em relação à forma e ao comprimento. Para investigar essa hipótese do movimento deve-se realizar um novo teste de infectividade com o vetor viral contendo um fragmento espaçador de aproximadamente 800 nt no sítio múltiplo de clonagem.

Outra possibilidade é que apesar de o tomateiro ser um dos principais hospedeiros do vírus ToRMV, quando este foi utilizado para construção de um vetor para VIGS, pode ter perdido a capacidade de infectar plantas dessa espécie. Como já foi relatado para o vetor construído a partir do begomovírus *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), que passou a ser utilizado

para VIGS em plantas de fumo, já que perdeu a capacidade de infectar plantas de tomate (Peele *et al.*, 2001).

Portanto, um novo teste de infectividade deve ser realizado para verificar estes resultados, inoculando, com o vetor viral, outras variedades de soja, já que com a variedade 'MSoy 8400' apenas uma planta do controle positivo foi infectada, indicando que essa variedade de soja pode ter uma baixa suscetibilidade ao vírus ToRMV.

Outro fato que precisa ser investigado é a amplificação em pequena extensão de um fragmento de 562 pb a partir de plantas bombardeadas apenas com partículas de tungstênio. Uma possível explicação é o fato da casa de vegetação utilizada na execução desses experimentos não ser à prova de insetos, apesar destes serem controlados por outros métodos. Portanto, poderia ter ocorrido a transmissão do vírus ToRMV de uma planta inoculada para outra não-inoculada por meio da mosca-branca. Contaminações durante a realização do PCR ou da extração do DNA também precisam ser verificadas através de novo teste de infectividade.

6. CONCLUSÕES

- Foi possível construir um vetor viral baseado no DNA-A do begomovírus ToRMV para ser utilizado na indução do silenciamento de genes em plantas.
- Foram isolados e clonados no vetor viral fragmentos referentes aos genes fitoeno dessaturase (PDS) de soja e tomate, *myo*-inositol-1-fosfato sintase (MIPS) e estaquiase sintase (STS), ambos de soja, para serem utilizados em experimentos futuros de silenciamento gênico nessas plantas.
- Plantas de soja, tomate e *N. benthamiana* foram co-inoculadas com o vetor pToR-A1.4 Δ CP e o clone pUb1-G4, via biobalística. Em *N. benthamiana*, o vetor viral apresentou 82% de infectividade, indicando um grande potencial de uso em estudos de VIGS nessa planta. Já em plantas de soja e tomate, o vetor viral apresentou baixa taxa de replicação ou movimento. Portanto, novo teste de infectividade deve ser realizado para confirmar os resultados obtidos.

7. PERSPECTIVAS

Para avaliar a capacidade de indução de silenciamento gênico pelo vetor viral pToR-A1.4ΔCP, serão desenvolvidos ensaios de silenciamento do gene fitoeno dessaturase de soja, tomate e *N. benthamiana*. A eficiência do vetor para indução de silenciamento de RNA nessas plantas também será comprovada por análise molecular, verificando-se o acúmulo de siRNAs e a degradação de mRNAs homólogos àqueles cujos fragmentos foram inseridos no vetor viral.

Uma vez comprovado o seu potencial de uso como vetor de VIGS, o pToR-A1.4ΔCP poderá ser utilizado em estudos de genômica funcional, para analisar genes envolvidos em uma ampla gama de processos biológicos. Sendo uma ferramenta muito útil no estudo de genes utilizados na construção de cassetes para a produção de plantas transgênicas, que estão sendo desenvolvidas no Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402. 1997.
- ALVES-JÚNIOR, M. Estudo dos mecanismos envolvidos na adaptabilidade diferencial de dois begomovírus em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*. (Tese D.S.) Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2008.
- AMBROZEVICIUS, L.P., CALEGARIO, R.F., FONTES, E.P.B., CARVALHO, M.G. & ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27:372-377. 2002.
- ARAGÃO, F.J.L., BARROS, L.M.G., BRASILEIRO, A.C.M., RIBEIRO, S.G., SMITH, F.D., SANFORD, J.C., FARIA, J.C. & RECH, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics* 93:142-150. 1996.
- BALARDIN, R.S. Ferrugem asiática da soja. *Fitopatologia Brasileira* 29:18. 2004.
- BARTLEY, G.E., VIITANEN, P.V., PECKER, I., CHAMOVITZ, D., HIRSCHBERG, J. & SCOLNIK, P.A. Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding of phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88:6532-6536. 1991.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing. *Current Biology* 12:82-84. 2002.
- BAULCOMBE, D.C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* 2:109-113. 1999.
- BERGER, P.H., ADAMS, M.J., BARNETT, O.W., BRUNT, A.A., HAMMOND, J., HILL, J.H., JORDAN, R.L., KASHIWAZAKI, S., RYBICKI, E.P., SPENCE, N., STENGER, D.C., OHKI, S.T., UYEDA, I., VAN ZAAYEN, A., VALKONEN, J.P. & VELTEN, H.J. Family Potyviridae. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (Eds.) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego. Elsevier Academic Press. 2005. pp. 819-841.
- BRIDDON, R.W., BULL, S.E., AMIN, I., IDRIS, A.M., MANSOOR, S., BEDFORD, I.D., DHAWAN, P., RISHI, N., SIWATCH, S.S., ABDEL-SALAM, A.M., BROWN, J.K., ZAFAR, Y. & MARKHAM, P.G. Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* 312:106-121. 2003.

- BRIDDON, R.W., PINNER, M.S., STANLEY, J. & MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177:85-94. 1990.
- CHAPMAN, S., KAVANAGH, T. & BAULCOMBE, D. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant Journal* 2:549-557. 1992.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159. 1987.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) Safra de grãos no Brasil no período de 2007/2008. Disponível em <http://www.conab.gov.br>. Acessado em junho de 2008.
- DE FAZIO, G. O mosaico dourado do feijoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 10:41-48. 1985.
- DELLAPORTA, S.L, WOOD, J. & HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version III. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21. 1983.
- DEMMIG-ADAMS, B., GILMORE, A.M. & ADAMS, W.W. Carotenoids 3: *In vivo* function of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal* 10:403-412. 1996.
- DESBIEZ, C., DAVID, C., METTOUCHI, A., LAUFS, J. & GRONENBORN, B. Rep protein of tomato yellow leaf curl geminivirus has an ATPase activity required for viral DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:5640-5644. 1995.
- DORSETT, Y. & TUSCHL, T. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 3:318-329. 2004.
- ELMER, J.S., BRAND, L., SUNTER, G., GARDINER, W., BISARO, D.M. & ROGERS, S.G. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus. II. The conserved AL1 ORF product is essential for replication. *Nucleic Acids Research* 16:7043-7049. 1988.
- FARIA, J.C. & ZERBINI, F.M. Família Geminiviridae - Taxonomia, replicação e movimento. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 8:25-65. 2000.
- FARIA, J.C., GILBERTSON, R.L., HANSON, S.F., MORALES, F.J., AHLQUIST, P.G., LONIELLO, A.O. & MAXWELL, D.P. Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. *Phytopathology* 84:321-329. 1994.
- FAUQUET, C.M., BISARO, D.M., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., HARRISON, B.D., RYBICKI, E.P., STENGER, D.C. & STANLEY, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148:405-421. 2003.

- FERNANDES, J.J. Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do triângulo Mineiro. (Tese D.S.). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- FERNANDES, J.J., CARVALHO, M.G., ANDRADE, E.C., BROMMONSCHENKEL, S.H., FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55:513-522. 2006.
- FIALHO, L.S. Purificação de uma α -galactosidase em sementes de *Tachigali multijuga* e clonagem parcial do gene da estaquiose sintase de soja. (Tese D.S.). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2007.
- FOFANA, I.B.F., SANGARE, A., COLLIER, R., TAYLOR, C. & FAUQUET, C.M. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant Molecular Biology* 56:613-624. 2004.
- FONTES, E.P.B., GLADFELTER, H.J., SCHAFFER, R.L., PETTY, I.T.D. & HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* 6:405-416. 1994.
- FONTES, E.P.B., LUCKOW, V.A. & HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell* 4:597-608. 1992.
- GALVÃO, R.M., MARIANO, A.C., LUZ, D.F., ALFENAS, P.F., ANDRADE, E.C., ZERBINI, F.M., ALMEIDA, M.R. & FONTES, E.P.B. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology* 84:715-726. 2003.
- GARDINER, W., SUNTER, G., BRAND, L., ELMER, J.S., ROGERS, S.G. & BISARO, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: The coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *EMBO Journal* 7:899-904. 1988.
- GILBERTSON, R.L. & LUCAS, W.J. How do viruses traffic on the "vascular highway"? *Trends in Plant Science* 1:260-268. 1996.
- GODGE, M.R., PURKAYASTHA, A., DASGUPTA, I. & KUMAR, P.P. Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant Cell Reports* 27:209-219. 2008.
- GRØLUND, M., CONSTANTIN, G., PIEDNOIR, E., KOVACEV, J., JOHANSEN, I.E. & LUND, O.S. Virus-induced gene silencing in *Medicago truncatula* and *Lathyrus odorata*. *Virus Research* 135:345-349. 2008.
- GUIMARÃES, V.M., DE REZENDE, S.T., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. & FELIX, C.R. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry* 58:67-73. 2001.

- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., OROZCO, B.M., NAGAR, S. & ROBERTSON, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:71-106. 1999.
- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B. & ROBERTSON, D. Reprogramming plant gene expression: A prerequisite to geminivirus DNA replication. *Molecular Plant Pathology* 5:149-156. 2004.
- HEGEMAN, C.E., GOOD, L.L. & GRABAU, E.A. Expression of D-*myo*-Inositol-3-phosphate synthase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 125:1941-1948. 2001.
- HOFER, P., BEDFORD, I.D., MARKHAM, P.G., JESKE, H. & FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology* 236:288-295. 1997.
- HOLZBERG, S.; BROSIO, P.; GROSS, C.; POGUE, G.P. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant Journal* 30:315-327. 2002.
- HUANG, C., XIE, Y. & ZHOU, X. Efficient virus-induced gene silencing in plants using a modified geminivirus DNA1 component. *Plant Biotechnology Journal* 7:254-265. 2009.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2008. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em junho de 2008.
- JEONG, R.D., HWANG, S.H., KANG, S.H., CHOI, H.S., PARRK, J.W. & KIM, K.H. Virus-induced gene silencing as tool for functional genomics in a *Glycine max*. *Plant Pathology Journal* 21:158-163. 2005.
- JONES, D.A., DUPONT, M.S., AMBROSE, M.J., FRIAS, J. & HEDLEY, L.C. The discovery of compositional variation for the raffinose family of oligosaccharides in pea seeds. *Seed Science Research* 9:305-310. 1999.
- KJEMTRUP, S., SAMPSON, K.S., PEELE, C., NGUYEN, L., CONKLING, M., THOMPSON, W. & ROBERSON, D. Gene silencing from DNA carried by a geminivirus. *Plant Journal* 14:91-100. 1998.
- LAHUTA, L.B., GORECKI, R.J., MICHALCZYK, D. & PIOTROWICZ-CIESLAK, A.I. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus L.*) seeds. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 3:1-10. 2000.
- LAUFS, J., SCHUMACHER, S., GEISLER, N., JUPIN, I. & GRONENBORN, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters* 377:258-262. 1995a.
- LAUFS, J., TRAUT, W., HEYRAUD, F., MATZEIT, G., ROGERS, S.G., SCHELL, J. & GRONENBORN, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf

- curl virus. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92:3879-3883. 1995b.
- LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. Critical Reviews in Plant Sciences 11:327-349. 1992.
- LIU, Y., SCHIFF, M. & DINESH-KUMAR, S.P. Virus-induced gene silencing in tomato. Plant Journal 31:777-786. 2002.
- LU, R., MARTIN-HERNANDEZ, A.M., PEART, J.R., MALCUIT, I. & BAULCOMBE, D.C. Virus-induced gene silencing in plants. Methods 30:296-303. 2003.
- MANSOOR, S., BRIDDON, R.W., ZAFAR, Y. & STANLEY, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. Trends in Plant Science 8:128-34. 2003.
- MATZKE, M.A., AUFSATZ, W., KANNO, T., METTE, M.F. & MATZKE, A.J. Homology-dependent gene silencing and host defense in plants. Advances in Genetics 46:235-275. 2002.
- MEIS, S.J., FEHR, W.R. & SCHNEBLY, S.R. Seed source effect on field emergence of soybean lines with reduced phytate and raffinose saccharides. Crop Science 43:1336-1339. 2003.
- MELLO, R.N. Begomovírus em soja no Brasil e ferramentas moleculares para sua identificação. (Tese M.S.). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- MELLO, R.N., COTRIM, M.A.A., LOPES, E.F., MOREIRA, A.G., CONTIN, F.S., FONTES, E.P.B., ALMEIDA, A.M.R. & ZERBINI, F.M. Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of *Sida mottle virus* (SiMoV) infecting this crop in Brazil. Virus Reviews and Research 7(Supplement):157. 2002.
- MENTEN, J.O. & ROSTON, A.J. Mosaico dourado e a necessidade da regionalização da cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. Revista da Agricultura 55:287-300. 1980.
- MIKI, D. & SHIMAMOTO, K. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. Plant and Cell Physiology 45:490-495. 2004.
- MILES, G.P., SAMUEL, M.A., ZHANG, Y. & ELLIS, B.E. RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. Environmental Pollution 138:230-237. 2005.
- MORALES, F.J. & ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. Archives of Virology 146:415-441. 2001.

- MORALES, F.J. & JONES, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research* 100:57-65. 2004.
- MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71:123-134. 2000.
- MORRIS, B., RICHARDSON, K., EDDY, P., ZHAN, X., HALEY, A. & GARDNER, R. Mutagenesis of the AC3 open reading frame of *African cassava mosaic virus* DNA-A reduces DNA-B replication and ameliorates disease symptoms. *Journal of General Virology* 72:1205-1213. 1991.
- NAGAMATSU, A., MASUTA, C., SENDA, M., MATSUURA, H., KASAI, A., HONG, J.S., KITAMURA, K., ABE, J. & KANAZAWA, A. Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnology Journal* 5:778-790. 2007.
- NARANJO, S.E. & ELLSWORTH, P.C. Challenges and opportunities for pest management of *Bemisia tabaci* in the new century. *Crop Protection* 20:707. 2001.
- NEUS, J.D., FEHR, W.F. & SCHNEBLY, S.R. Agronomic and seed characteristics of soybean with reduced raffinose and stachyose. *Crop Science* 45:589-592. 2005.
- NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 76:925-932. 1994.
- NUNES, A.C.S., VIANNA, G.R., CUNEO, F., AMAYA-FARFÁN, J., CAPDEVILLE, G., RECH, E.L. & ARAGÃO, F.J.L. RNAi-mediated silencing of the *myo*-inositol-1-phosphate syntase gene (*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* 224:125-132. 2006.
- ODOM, A.R., STAHLBERG, A., WENTE, S.R. & YORK, J.D. A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science* 287:2026-2029. 2000.
- OGITA, S., UEFUJI, H., YAMAGUCHI, Y., KOIZUMI, N. & SANO, H. Producing decaffeinated coffee plants. *Nature* 423:823. 2003.
- OROZCO, B.M. & HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of Virology* 70:148-58. 1996.
- OROZCO, B.M. & HANLEY-BOWDOIN, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry* 273:24448-24456. 1998.
- PADDISON, P.J., SILVA, J.M., CONKLIN, D.S., SCHLABACH, M., LI, M.M., ARULEBA, S., BALIJA, V., O'SHAUGHNESSY, A., GNOJ, L., SCOBIE, K., CHANG, K., WESTBROOK, T., CLEARY, M., SACHIDANANDAM, R.,

- MCCOMBIE, W.R., ELLEDGE, S.J. & HANNON, G.J. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* 428:427-431. 2004.
- PALMER, K.E. & RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research* 50:183-234. 1998.
- PEDERSEN, T.J. & HANLEY-BOWDOIN Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. *Virology* 202:1070-1075. 1994.
- PEELE, C., JORDAN, C.V., MUANGSAN, N., TURNAGE, M., EGELKROUT, E., EAGLE, P., HANLEY-BOWDOIN, L. & ROBERTSON, D. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant Journal* 27:357-366. 2001.
- PETERBAUER, T., MUCHA, J., MACH, L. & RICHTER, A. Chain elongation of raffinose in pea seeds: Isolation, characterization, and molecular cloning of a multifunctional enzyme catalyzing the synthesis of stachyose and verbascose. *Journal of Biological Chemistry* 227:194-200. 2002.
- POLSTON, J.E. & ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* 81:1358-1369. 1997.
- POTTER, J.L., NAKHLA, M.K., MEJÍA, L. & MAXWELL, D.P. PCR and DNA hybridization methods for specific detection of bean-infecting begomoviruses in the Americas and Caribbean. *Plant Disease* 87:1205-1212. 2003.
- RABOY, V. Progress in breeding low phytate crops. *Journal of Nutrition* 132: 503S-505S. 2002.
- RATCLIFF, F., HERNANDEZ MARTIN, A. & BAULCOMBE, D. *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal* 25:237-245. 2001.
- REZENDE, E.A., FILGUEIRA, F.A.R., ZERBINI, F.M., MACIEL-ZAMBOLIM, E., FERNANDES, J.J. & GILBERTSON, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 21:424. 1996.
- RIBEIRO, S.G., AMBROZEVICIUS, L.P., ÁVILA, A.C., BEZERRA, I.C., CALEGARIO, R.F., FERNANDES, J.J., LIMA, M.F., MELLO, R.N., ROCHA, H. & ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148:281-295. 2003.
- ROBERTSON, D. VIGS vectors for gene silencing: Many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology* 55:495-519. 2004.
- ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.L., RUSSELL, D.R. & MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77:340-347. 1993.

- ROJAS, M.R., NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell* 95:105-113. 1998.
- ROJAS, M.R., HAGEN, C., LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of Geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43:361-394. 2005.
- RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of Virology* 139:49-77. 1994.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANDERFOOT, A.A. & LAZAROWITZ, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell* 7:1185-1194. 1995.
- SANDERFOOT, A.A., INGHAM, D.J. & LAZAROWITZ, S.G. A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiology* 110:23-33. 1996.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74:5463-5467. 1977.
- SAUNDERS, K., LUCY, A. & STANLEY, J. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus are consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic Acids Research* 19:2325-2330. 1991.
- SENTHIL-KUMAR, M., GOWDA, H.V.R., HEMA, R., MYSORE, K.S. & UDAYAKUMAR, M. Virus-induced gene silencing and its application in characterizing genes involved in water-deficit-stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* 165:1404-1421. 2008.
- SHAH, D.M., HIGHTOWER, R.C. & MEAGHER, R.B. Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79:1022-1026. 1982.
- SHAO, Y., ZHU, H.L., TIAN, H.Q., WANG, X.G., LIN, X.J., ZHU, B.Z., XIE, Y.H. & LUO, Y.B. Virus-induced gene silencing in plant species. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 168-174. 2008.
- SHEN, X., XIAO, H., RANALLO, R., WU, W.H. & WU, C. Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science* 299:112-114. 2003.
- STANLEY, J. Analysis of *African cassava mosaic virus* recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* 206:707-712. 1995.

- STANLEY, J. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. *Nature* 305:643-645. 1983.
- STANLEY, J., BISARO, D.M., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., FAUQUET, C.M., HARRISON, B.D., RYBICKI, E.P. & STENGER, D.C. Family *Geminiviridae*. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (Eds.) *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. Elsevier Academic Press. 2005. pp. 301-326.
- SUNTER, G. & BISARO, D.M. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* 180:416-422. 1991.
- SUNTER, G. & BISARO, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 4:1321-1331. 1992.
- SUNTER, G., HARTITZ, M.D., HORMUZDI, S.G., BROUGH, C.L. & BISARO, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* 179:69-77. 1990.
- TANG, G., REINHART, B.J., BARTEL, D.P. & ZAMORE, P.D. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development* 17:49-63. 2003.
- TAO, X. & ZHOU, X. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *Plant Journal* 38:850-860. 2004.
- THOMAS, C.L., JONES, L., BAULCOMBE, D.C. & MAULE, A.J. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant Journal* 25:417-425. 2001.
- TURNAGE, M.A., MUANGSAN, N., PEELE, C.G. & ROBERTSON, D. Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 30:107-114. 2002.
- VANITHARANI, R., CHELLAPPAN, P., PITA, J.S. & FAUQUET, C. M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal Virology* 78:9487-9498. 2004.
- VAUCHERET, H. & FAGARD, M. Transcriptional gene silencing in plants: Targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics* 17:29-35. 2001.
- VIANA, S.F., GUIMARÃES, V.M., JOSÉ, I.C., OLIVEIRA, M.G.A., COSTA, N.M.B., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. & DE REZENDE, S.T. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase. *Food Chemistry* 93:665-670. 2005.

- WATERHOUSE, P.M. & HELLIWELL, C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics* 4:29-38. 2003.
- WERE, H.K., WINTER, S. & MAISS, E. Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease* 88:17-22. 2004.
- YORK, J.D., ODOM, A.R., MURPHY, R., IVES, E.B. & WENTE, S.R. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* 285:96-100. 1999.
- YU, H. & KUMAR, P.P. Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Reports* 22:167-174. 2003.
- ZERBINI, F.M., ALFENAS, P.F. & ANDRADE, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 13:191-246. 2005.
- ZERBINI, F.M., FERNANDES, J.J., FONTES, E.P.B., BROMMONSCHENKEL, S.H. & CARVALHO, M.G. Association of the DNA components of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) with distinct geminivirus DNA components in *Nicandra physaloides* and *Phaseolus vulgaris*. Abstracts, XII International Congress of Virology, Paris, France. 2002. pp. 147.
- ZHANG, C. & GHABRIAL, S.A. Development of *Bean pod mottle virus*-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology* 344:401-411. 2006.
- ZHANG, W., OLSON, N.H., BAKER, T.S., FAULKNER, L., AGBANDJE-MCKENNA, M., BOULTON, M.I., DAVIES, J.W. & MCKENNA, R. Structure of the *Maize streak virus* geminate particle. *Virology* 279:471-477. 2001.