

POLIANE FERREIRA ALFENAS

**RESISTÊNCIA DE MARACUJAZEIROS (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*
Degener) TRANSFORMADOS COM UMA CONSTRUÇÃO DERIVADA
DO GENOMA DO PWV (*Passionfruit woodiness virus*)
A DOIS ISOLADOS DO PATÓGENO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Science”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

AGRADECIMENTO

Ao meu pai, pelo apoio, estímulo aos estudos e exemplo profissional.

À minha mãe, pelo amor, carinho e dedicação.

Aos meus irmãos, Kiki, Rafa e Tatinha, pela paciência com minhas “chatices”.

Ao meu esposo Gustavo, pela dedicação, paciência e compreensão.

Aos professores Wagner e Murilo Zerbini pelos ensinamentos e receptividade.

Aos professores Sérgio e Murilo Carvalho pelas sugestões e atenção dispensada durante o curso.

À professora Elza e às suas “meninas”, Denise e Patrícia, pela preciosa ajuda com os RNAs. Sem vocês este trabalho não seria possível.

Aos colegas de trabalho Eliane, Raquel, Léo, Ana, Tutu, Adriana e Dani, pelo apoio, sugestões e ajuda.

Aos amigos Ro e Zé Scalon, Marcelinho e Márcia, Felipe e Paty, Marcelo, Léo, Tutu, Lilo, Clóvis e André, pela companhia.

Aos amigos de curso, Fábio, Fabrício, Franscimar, Marco e Dyana.

À amiga Ana Paula, por “dividir” o nosso querido orientador e pelas horas de estudo em grupo.

À grande amiga Andressa por estar presente em todos os momentos mesmo de longe.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade do curso de Graduação e Mestrado e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

BIOGRAFIA

POLIANE FERREIRA ALFENAS, filha de Acelino Couto Alfenas e Rita de Cássia Ferreira Alfenas, nasceu em Viçosa, estado de Minas Gerais, em 5 de agosto de 1977.

Em março de 1996 iniciou o curso de Biologia, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, concluindo-o em janeiro de 2000.

Em março de 2000 iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa-MG, concluindo-o em abril de 2002.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. A cultura do maracujazeiro	5
2.2. A família <i>Potyviridae</i>	6
2.3. Taxonomia do gênero <i>Potyvirus</i>	11
2.4. Resistência derivada do patógeno (RDP)	12
2.5. Silenciamento gênico pós-transcricional	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Material vegetal	24
3.2. Confirmação da presença do transgene nas plantas transformadas	25
3.3. Propagação vegetativa das plantas transgênicas.....	26
3.4. Inoculação das plantas transgênicas	26
3.5. ELISA indireto	27
3.6. Análise da expressão do transgene	27
3.6.1. Extração de RNA total	27
3.6.2. <i>Northern blotting</i>	28
4. RESULTADOS	30
4.1. Confirmação da presença do transgene nas plantas transformadas	30
4.2. Inoculação das plantas transgênicas	30
4.3. Teste das plantas assintomáticas para infecção viral	34

4.4. Análise da expressão do transgene.....	34
5. DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

ALFENAS, Poliane Ferreira, M. S. Universidade Federal de Viçosa, abril de 2002. **Resistência de maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) transformados com uma construção derivada do genoma do PWV (*Passionfruit woodiness virus*) a dois isolados do patógeno.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

O vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (PWV) é membro da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*. No Brasil a doença está presente relatada nos principais Estados produtores. Plantas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) transformadas com uma construção não traduzível correspondente a 2/3 da região 3' do gene *nib* e 1/3 da região 5' do gene *cp* de PWV-isolado Minas Gerais (PWV-MG) foram propagadas por estaquia e desafiadas por inoculação mecânica via extrato foliar tamponado com os isolados PWV-MG e PWV-isolado Pernambuco (PWV-PE). O transformante (T10) foi resistente ao PWV-MG, mas suscetível ao PWV-PE. A ausência de vírus nestes transformantes foi confirmada por ELISA indireta. As demais plantas transgênicas desenvolveram sintomas evidentes quando inoculadas com ambos os isolados. Análises de expressão gênica por hibridização demonstraram que na linhagem T10 não ocorreu acúmulo de mRNA transgênico antes da inoculação. Após a inoculação, apenas em plantas inoculadas com o isolado PWV-PE foi detectado RNA viral. Estes resultados comprovam que o transformante T10 é resistente ao isolado PWV-MG, que o mecanismo de resistência envolvido é o silenciamento gênico pós-transcricional e que este mecanismo já está ativado nas plantas transgênicas

antes da inoculação com o vírus. A linhagem T10 será propagada vegetativamente e testada para resistência ao PWV em condições naturais.

ABSTRACT

ALFENAS, Poliane Ferreira, M. S. Universidade Federal de Viçosa, April, 2002.
Resistance of passion fruit plants (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) transformed with a construction derived of the genome of PWV (*Passionfruit woodiness virus*) to two isolated of the patogen.
Advisor: Wagner Campos Otoni. Committee members: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Sérgio Hermínio Brommonschenkel

The passionfruit woodiness virus (PWV) is a member of the family Potyviridae, gender Potyvirus. In Brazil the disease is present in the principal States producers. Passionfruit yellow plants (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) were transformed with a non translatable construction corresponding to 2/3 of the area 3' of the gene *nib* and 1/3 of the 5' of the gene PWV-isolated *cp* Minas Gerais (PWV-MG). Transgenic plants were cloned by stem cuttings and challenged by sap inoculation with isolated PWV-MG and PWV-isolated Pernambuco (PWV-PE). The transgenic plant (T10) was resistant to PWV-MG, but susceptible to the PWV-PE. The virus absence in these plant was confirmed by ELISA indirect. The other transgenic plants developed evident symptoms when inoculated with both isolated ones. Northern blot analyses demonstrated that in the transgenic plant T10 did not accumulate transgenic mRNA before the inoculation. After the inoculation, viral RNA was detected just in plants inoculated with the isolated PWV-PE. These results proved that the transgenic plant T10 was resistant to isolated PWV-MG, that the resistance mechanism involved it was post-transcriptionally gene silencing and that this mechanism was already activated in the transgenic plants before virus inoculation. The

transgenic plant T10 will be vegetatively propagated and tested for resistance to PWV under natural conditions.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo do maracujá é praticado principalmente por pequenos agricultores, e os principais produtores são o Brasil, Peru, Venezuela, Equador, África do Sul, Sri Lanka e Austrália, responsáveis por cerca de 80% da produção mundial (BLISKA et al., 1994).

No final da década de 60 ocorreu grande expansão da cultura do maracujazeiro no Brasil, inicialmente nas regiões Norte e Nordeste, e em seguida na região Sudeste. Durante esse período a comercialização baseava-se no fruto *in natura*. Em 1975, Bahia e Minas Gerais eram responsáveis por 55% da produção nacional. Nos anos 80, as indústrias extratoras de suco passaram a estimular o mercado do produto industrializado. Na década de 90 a cultura apresentou sua maior expansão. Em 1993 os principais estados produtores incluíam Pará, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro e Sergipe, representando cerca de 97% da produção nacional (BLISKA et al., 1994). Com uma área plantada de 32.177 ha e produção de 84.822 toneladas em 1996, o Brasil é o primeiro produtor mundial de maracujá, posição que ocupa há mais de 10 anos (IBGE, 1996).

A expansão da área plantada foi acompanhada pelo surgimento e agravamento de um número de doenças de grande importância econômica (CHAGAS, 1991). O endurecimento dos frutos do maracujazeiro é a virose mais importante na cultura do maracujá em todo o mundo. Até pouco tempo achava-se que era causado somente pelo vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (*Passionfruit woodiness virus*, PWV), porém com o desenvolvimento de técnicas de clonagem e sequenciamento descobriu-se que

a estirpe de PWV da África do Sul consistia na verdade em uma outra espécie de potyvírus, denominada *Cowpea aphid-borne mosaic virus - Passiflora* (CABMV-Pass) (MCKERN et al., 1994). As plantas infectadas por qualquer um destes vírus apresentam mosaico e deformação foliar, e produzem frutos pequenos, deformados e com endurecimento do pericarpo, o que os torna impróprios para o consumo. Além disso, a produtividade e o ciclo da cultura são reduzidos.

No Brasil o endurecimento dos frutos do maracujazeiro foi inicialmente relatado no estado da Bahia por YAMASHIRO e CHAGAS (1979) infectando *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*. Existem também relatos em Pernambuco (LORETO e VITAL, 1983), Ceará e Sergipe (KITAJIMA e CHAGAS, 1984; LIMA et al., 1985), São Paulo, Alagoas, Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal (CHAGAS et al., 1992). Estudos recentes mostram uma incidência de 71,8% de vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro em plantas inspecionadas em pomares do estado de São Paulo (GIORIA et al., 2000).

Várias medidas já foram estudadas para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. Os primeiros estudos foram realizados por SIMMONDS (1959) na Austrália. Foram selecionados isolados fracos no campo capazes de conferir proteção cruzada contra isolados típicos do vírus. Verificou-se que estes isolados fracos mantiveram-se constantes por um período de cinco anos, mesmo com a constatação de entrelaçamento das plantas. Foram também criados híbridos de maracujá-roxo (*P. edulis*) com o maracujá-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), que apresentam tolerância ao endurecimento dos frutos. Nos últimos trinta anos, o controle do endurecimento dos frutos na Austrália tem sido feito com base nestes híbridos, enxertados em clones de maracujá-amarelo resistentes à murcha de *Fusarium*, outra doença limitante da cultura nesse país (PARES e MARTIN, 1984; FITZELL et al., 1985).

No Brasil o controle desta doença tem sido insatisfatório, principalmente, devido à natureza não-circulativa da transmissão do vírus pelos afídeos, o que torna ineficiente o controle químico do vetor como método indireto de controle da doença. Além disso, os agentes causadores do endurecimento dos frutos do maracujazeiro são comumente encontrados infectando leguminosas e espécies

silvestres de *Passiflora*, que são fontes potenciais de inóculo, tornando a erradicação do vírus inviável (COSTA, 1996).

Segundo COSTA (1996), a proteção cruzada poderia ser um método viável para o controle desta doença no Brasil. Entretanto, a proteção cruzada exige um tempo considerável para obtenção, seleção e teste de proteção e estabilidade de isolados fracos. Além disso, podem ocorrer problemas como uma possível mutação que induziria a reversão do isolado fraco para um isolado forte, a quebra de resistência induzida pelo isolado fraco e a possibilidade de efeito sinérgico do isolado fraco com outras espécies de vírus na cultura, o que poderia resultar em uma doença ainda mais grave (FULTON, 1986). De fato, plantas pré-imunizadas com estirpes fracas e desafiadas com isolados fortes apresentaram sintomas severos da doença a partir do primeiro mês após a inoculação (NOVAES e REZENDE, 2001).

Uma alternativa interessante para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro é o uso de cultivares resistentes. Entretanto, variedades resistentes não estão disponíveis. Estudos genéticos de espécies de *Passiflora* são escassos, embora *P. suberosa* tenha se comportado como resistente em estudos preliminares (COSTA, 1996). Embora o maracujazeiro seja uma planta de cultivo comercial recente que apresenta grande variabilidade genética natural (MELETTI e BRUCKNER, 2001), o desenvolvimento de variedades comerciais resistentes ao endurecimento dos frutos é difícil, pois além de se conhecerem poucas fontes de resistência, essas se encontram em espécies não comerciais (Costa, 1996).

A transferência de informação genética por técnicas de DNA recombinante tornou-se uma importante ferramenta para o melhoramento genético. Diferentes genes de interesse agrônômico, conferindo características como resistência a vírus, insetos e herbicidas, já foram identificados, clonados e introduzidos via *Agrobacterium tumefaciens* ou por transformação direta em diversas plantas cultivadas (BRASILEIRO, 1993).

Com base nestas considerações, uma alternativa para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro seria a obtenção de plantas transgênicas expressando porções do genoma viral, a chamada resistência derivada do patógeno. A transformação de plantas com porções do genoma

viral freqüentemente origina linhagens de plantas que exibem resistência ao vírus do qual a seqüência foi derivada (FITCHEN e BEACHY, 1993).

O presente trabalho teve como objetivo determinar se plantas transgênicas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) transformadas com uma construção correspondente a 2/3 do gene da replicase (*nib*) e parte do gene da proteína capsidial (*cp*) do PWV-isolado Minas Gerais, produzidas por BRAZ (1999) são resistentes a dois isolados de PWV e determinar se o mecanismo de resistência envolvido é o silenciamento gênico pós-transcricional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do maracujazeiro

O maracujá está classificado na família Passifloraceae, gênero *Passiflora*. Dentro deste gênero existem cerca de 300 a 580 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (OLIVEIRA, 1987). No Brasil já foram descritas 118 espécies (OKANO e VIEIRA, 2001).

Embora o gênero agrupe muitas espécies, poucas são de importância econômica, função da qualidade de seus frutos, do aspecto ornamental ou de propriedades farmacológicas. As espécies mais cultivadas mundialmente são *P. edulis* Sims. f. *edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg., *P. ligularis* Juss., *P. molissima* Bailey, *P. quadrangularis* L. e *P. alata* Dryand (OLIVEIRA, 1987). Dentre estas, o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) é a mais importante e a mais cultivada no mundo.

As flores de *P. edulis* f. *flavicarpa* são visitadas por abelhas e beija-flores (COBERT e WILMER, 1980; ENDREES, 1994) e seus frutos são utilizados na preparação de refrescos, sorvetes, e também consumido *in natura* (LEITÃO FILHO e ARANHA, 1974). O florescimento ocorre em dias longos. VALINI et al. (1976) verificou que o florescimento não ocorre em dias com duração inferior a onze horas.

O maracujazeiro é uma planta alógama. A estrutura floral é adaptada à polinização entomófila, e a polinização cruzada é condicionada pela auto-incompatibilidade, em que o pólen de uma planta é incapaz de fertilizar as flores da mesma planta, e diferentes plantas podem ou não ser compatíveis entre si (BRUCKNER e SILVA, 2001).

A frutificação depende da presença de diferentes genótipos, para que ocorra a fertilização. Isto normalmente não é problema nos plantios comerciais, porque o maracujazeiro é propagado por sementes, o que garante suficiente diversidade. A propagação vegetativa tem sido recomendada em diversos trabalhos, nestas circunstâncias é necessário planejar o campo com diferentes clones entre si (BRUCKNER, 1994).

O maracujazeiro é uma planta de cultivo comercial bastante recente, apresentando ainda grande variabilidade genética natural para diversas características da planta e do fruto (MELLETI e BRUCKNER, 2001). A maioria dos produtores retira sementes a partir de matrizes dos seus pomares, por falta de acesso às sementes selecionadas. Por isso, grande parte dos pomares comerciais apresenta excessiva variabilidade, com alta porcentagem de frutos de qualidade inferior (MELLETI e BRUCKNER, 2001).

Apesar de várias iniciativas, o melhoramento do maracujá no Brasil é considerado incipiente. Na maioria das vezes, encontra-se direcionado à caracterização do germoplasma. As pesquisas aplicadas são recentes e estão especialmente voltadas para a obtenção de genótipos resistentes ou tolerantes às principais doenças da cultura (MELLETI e BRUCKNER, 2001).

2.2. A família *Potyviridae*

Os vírus pertencentes à família *Potyviridae* são caracterizados pelas partículas virais alongadas e flexuosas medindo aproximadamente 715 x 13 nm e pela expressão de seu genoma via autoproteólise de uma poliproteína.

A família *Potyviridae* está organizada em seis gêneros reconhecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), distingüidos de acordo com o inseto-vetor e a organização do genoma (VAN REGENMORTEL et al., 2000). O gênero *Potyvirus* agrupa vírus cujo genoma é composto por uma única molécula de RNA fita simples sentido positivo, e transmitidos por afídeos. O gênero *Rymovirus* é constituído por vírus cujo genoma é composto de uma molécula de RNA de fita simples, e transmitido por ácaros. O gênero *Bymovirus* agrupa os vírus que são transmitidos fungos e possuem o genoma composto por duas moléculas de RNA de fita simples, sentido positivo.

Os potyvírus infectam plantas de uma grande variedade de culturas agrícolas economicamente importantes, incluindo leguminosas (*Bean common mosaic virus*, BCMV; *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV), solanáceas (*Potato virus Y*; PVY, *Tobacco etch virus*, TEV), ornamentais (*Dendrobium mosaic virus*, DeMV; *Tulip breaking virus*, TBV), gramíneas (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV; *Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) e frutíferas (*Plum pox virus*, PPV; *Passionfruit woodiness virus*, PWV; *Papaya ringspot virus*, PRSV) (revisado por ZERBINI e ZAMBOLIM, 1999).

Os vírus responsáveis pelo endurecimento dos frutos do maracujazeiro pertencem ao gênero *Potyvirus*. O RNA destes vírus é constituído de aproximadamente 10.000 nucleotídeos, com uma única seqüência aberta de leitura (ORF), que origina uma poliproteína com aproximadamente 350 kDa. Esta proteína é processada mediante enzimas (proteínases) contidas na própria poliproteína, surgindo daí as proteínas necessárias para a infecção viral (CARRINGTON et al., 1990) (Figura 1). Estas proteínas incluem replicases, proteínas de movimento célula-a-célula e a longa distância e a proteína capsidial. Uma característica importante deste mecanismo de expressão gênica é que todas as proteínas virais são produzidas na mesma quantidade. Desta forma, a proteína capsidial, que é requerida em maior quantidade, é produzida em quantidades idênticas a, por exemplo, a replicase viral. Como o vírus não necessita de grandes quantidades da replicase, esta se acumula na célula infectada, na forma de inclusões. Uma característica das proteínas produzidas pelos potyvírus é o caráter multifuncional. Praticamente todas as proteínas cujas funções já foram determinadas atuam em mais de um processo do ciclo de infecção viral (revisado por ZERBINI e ZAMBOLIM, 1999).

A região 5' não-traduzida (NTR) do RNA possui seqüências regulatórias da tradução do genoma e uma proteína de origem viral (*viral protein genome-linked*, VPg) ligada covalentemente (RIECHMANN et al., 1989). As seqüências das regiões 5' NTR de diversos potyvírus são altamente conservadas (SIMON-BUELA et al., 1997), embora variem consideravelmente em comprimento (de 85 a mais de 200 nt), sugerindo envolvimento na tradução, replicação e/ou encapsidamento do RNA viral (LAIN et al., 1989a; KASHIWASAKI et al., 1991; NICOLAS e LALIBERTE, 1992).

A ligação da VPg à região 5' NTR é irreversível. A VPg atua como iniciadora (*primer*) da síntese da fita negativa de RNA e, possivelmente também, na síntese de novas fitas positivas (PLOCHOCKA et al., 1996). A remoção da VPg mediante clivagem com proteases demonstrou que a presença desta proteína é dispensável para o início da infecção viral, indicando que o RNA dos potyvírus é reconhecido pela maquinaria de tradução independentemente da presença de uma capa no terminal 5' (CARRINGTON e FREED, 1990).

A proteína P1 é um dos três peptídeos virais que possuem atividade proteolítica, sendo responsável pela clivagem de seu terminal carboxílico, separando-se da proteína HC-Pro (VERCHOT et al., 1991). Esta proteína possui propriedades de ligação a ácidos nucleicos (BRANTLEY e HUNT, 1993; SOUMOUNOU e LALIBERTE, 1994), e constitui em um fator acessório da replicação viral (VERCHOT e CARRINGTON, 1995a, b).

A proteína HC-Pro (*Helper Component-Proteinase*) é um dos produtos gênicos mais estudados dos potyvírus, e ao qual já foi atribuído o maior número de funções. Da mesma forma que P1, HC-Pro catalisa a proteólise de seu terminal carboxílico, separando-se da proteína P3 (CARRINGTON et al., 1989). A autocatálise de HC-Pro é essencial para a replicação do vírus, o que provavelmente reflete as múltiplas funções de HC-Pro no ciclo de infecção (KASSCHAU e CARRINGTON, 1995). Além da atividade de protease, HC-Pro funciona como componente auxiliar para a transmissão por afídeos (BERGER e PIRONER, 1986; HUET et al., 1994; LÓPEZ-MOYA et al., 1995), está envolvida em processos relacionados com a replicação viral (LEGRAVE et al., 1996), com o movimento sistêmico (CRONIN et al., 1995; KASSCHAU et al., 1997; ROJAS et al., 1997), com a inibição do silenciamento gênico pós-transcricional (ANANDALAKSHMI et al., 1998; BRIGNETI et al., 1998; KASSCHAU e CARRINGTON, 1998), além de ser um fator de transmissão via semente (JOHANSEN et al., 1996a).

As proteínas CI (*Cylindrical Inclusion*) e Nib (*Nuclear Inclusion b*) são as principais responsáveis pela replicação viral. Comparações de seqüências e estudos de expressão *in vitro* de CI em *E. coli* atribuíram às regiões conservadas funções de ATPase, ligação a RNA e RNA helicase (EAGLES et al., 1994; FERNANDEZ et al., 1995; LAIN et al., 1991). Com isso, foi proposto

um papel de RNA helicase para CI, sendo essa proteína provavelmente responsável pela separação da fita dupla de RNA produzida durante a replicação do genoma. A Nlb é a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) dos potyvírus (DOMIER et al., 1987; LAIN et al., 1989b; ROBAGLIA et al., 1989).

Esta proteína contém a seqüência de aminoácidos G-D-D, conservada em todas as RNAs polimerases dependentes de RNA virais já seqüenciadas, e dois sinais de localização nuclear (HONG e HUNT, 1996). A seqüência de aminoácidos da Nlb é a mais conservada dentro da família *Potyviridae* (HANDLEY et al., 1996; SHUKLA et al., 1994), possivelmente devido à sua função, que envolve o reconhecimento de seqüências regulatórias do RNA viral e interação com fatores do hospedeiro. Apesar de possuir dois sinais de localização nuclear, e de a maior parte das moléculas de Nlb estar localizada no núcleo das células infectadas, é no citoplasma que essa proteína exerce a sua função, pois é onde ocorre a replicação do genoma.

O atual modelo de replicação dos potyvírus propõe que Nlb faz parte de um complexo de replicação envolvendo diversas proteínas virais, além de fatores do hospedeiro, como por exemplo, o eIF(iso)4E, um fator de iniciação de tradução eucariótico, que interage com a VPg. Também faz parte deste complexo de replicação a proteína 6K, que possui uma grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos, fazendo com que esta proteína fique ligada à membrana, funcionando como uma âncora para o complexo de replicação, e retardando o transporte de Nlb e Nla para o núcleo até que estas tenham completado seu papel na replicação (LI et al., 1997; WITTMANN et al., 1997).

A proteína P3 é detectada em células infectadas isoladamente (RODRIGUEZ-CEREZO e SHAW, 1991) ou em conjunto com as proteínas CI (RODRIGUEZ-CEREZO et al., 1993) ou Nlb (LANGENBERG e ZHANG, 1997). Como estas duas proteínas estão envolvidas na replicação do genoma viral, sugere-se que P3 seja um fator acessório para a replicação (SHUKLA et al., 1994). Entretanto, evidências diretas da função da proteína P3 ainda não foram obtidas.

O produto gênico mais estudado dos potyvírus tem sido a proteína capsidial (SHUKLA et al., 1994). Ela está envolvida em diversas funções,

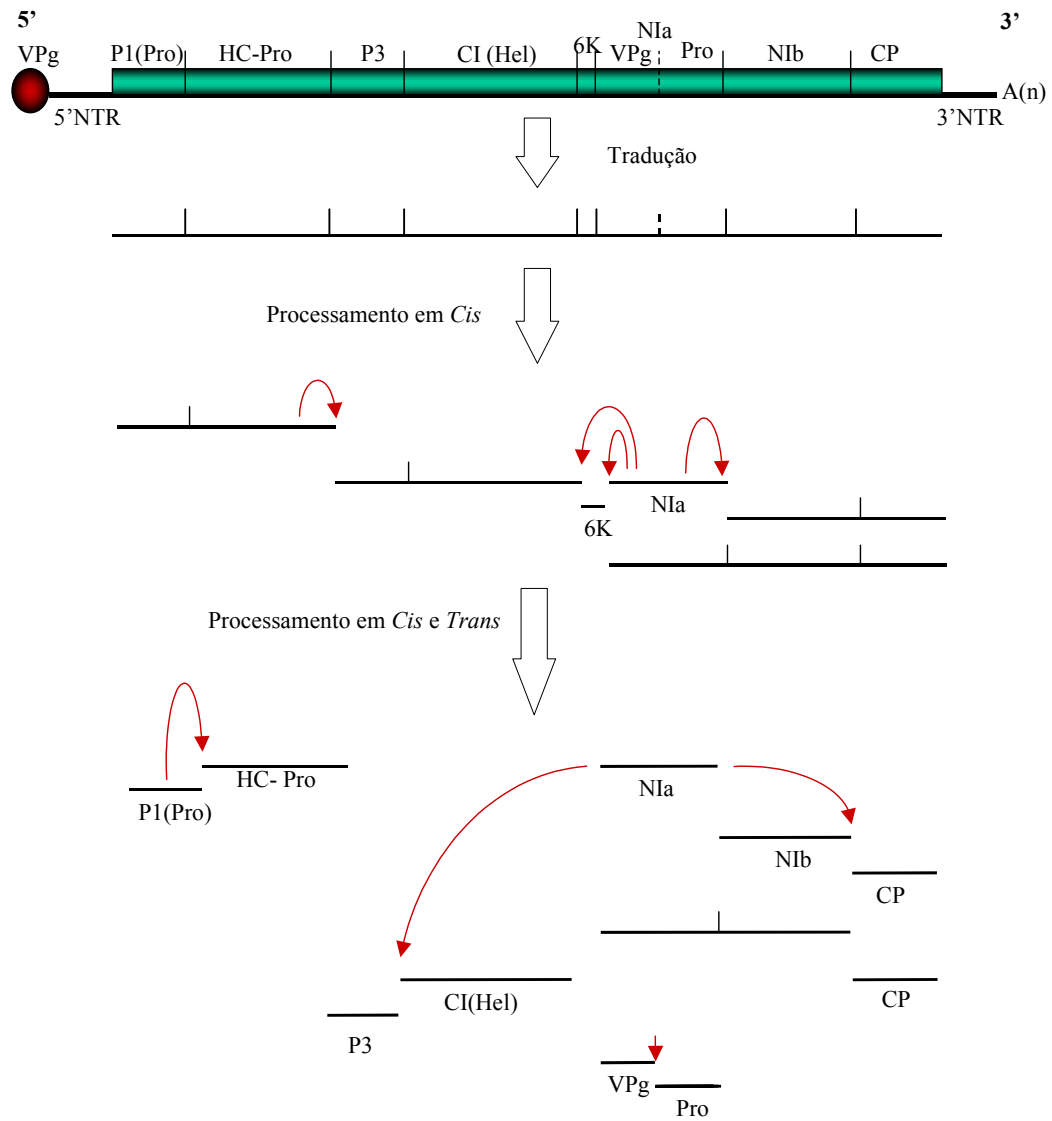


Figura 1 - Representação esquemática do genoma e do processamento da poliproteína dos *Potyvirus*. A autocatálise proteolítica ocorre simultaneamente com a tradução (adaptado de SHUKLA et al., 1994).

incluindo o encapsulamento do RNA viral, transmissão pelo vetor (ATREYA et al., 1995), movimento célula-a-célula (DOLJA et al., 1995; ROJAS et al., 1997), movimento a longa distância (DOLJA et al., 1995) e indução de sintomas (NADERI e BERGER, 1997a, b). A comparação de seqüências de aminoácidos e a análise da montagem de partículas virais indicaram a presença de três regiões distintas na proteína capsidial dos potyvírus: uma região amino-terminal, altamente variável em comprimento e seqüência, uma região central contendo cerca de 215 a 227 aminoácidos altamente conservados, e uma região carboxi-terminal de 18 a 20 aminoácidos. As regiões amino e carboxi-terminal estão voltadas para o exterior da molécula, e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da CP, e conseqüentemente da partícula viral (SHUKLA et al., 1991; SHUKLA e WARD, 1989b).

A região 3' NTR dos potyvírus apresenta uma considerável variabilidade em termos de comprimento e seqüência (variando de 163 a 475 nt) (SHUKLA et al., 1994). A extremidade 3' do genoma apresenta uma cauda poli-A, codificada pelo próprio vírus e provavelmente envolvida na proteção contra exonucleases. A seqüência da região 3' NTR é importante para o reconhecimento do RNA genômico viral pelo complexo replicativo, contendo *cis*-elementos essenciais para a replicação viral (HALDEMAN-CAHILL et al., 1998).

2.3. Taxonomia do gênero *Potyvirus*

A análise comparativa de seqüências de aminoácidos da proteína capsidial (CP) é atualmente considerado o método mais confiável para a classificação de espécies do gênero *Potyvirus* (SHUKLA e WARD, 1988, 1989a, b). SHUKLA e WARD (1991) analisaram o pareamento das seqüências de aminoácidos da CP de 56 estirpes de 25 potyvírus distintos e obtiveram uma distribuição bimodal de similaridade. Deste modo, foi estipulado que espécies distintas de potyvírus apresentam de 55 a 75% de similaridade entre as seqüências. Estirpes da mesma espécie apresentam similaridade de 90 a 99%. Similaridade de 75 a 88% reflete a existência de subgrupos de espécies.

A seqüência da região 3' NTR também pode ser utilizada na classificação, pois esta região apresenta tamanho e seqüência conservados em isolados de mesma estirpe, ao passo que isolados de espécies diferentes apresenta tamanho e seqüência variáveis. De modo geral, espécies distintas apresentam homologia de até 53%, enquanto isolados de mesma estirpe apresentam de 83 a 99% de homologia para a região 3' NTR (FRENKEL et al., 1989).

Embora este esquema de classificação tenha sido amplamente aceito e seja um dos critérios atualmente utilizados pelo ICTV para a designação de novas espécies de potyvírus, alguns autores têm questionado esta classificação, pois a proteína capsidial representa apenas 7% do genoma dos potyvírus (BOS, 1992; ZETTLER, 1992). Desta forma, critérios como gama de hospedeiros, transmissão por vetores, transmissão por sementes e efeito de proteção cruzada devem, quando possível, ser utilizados conjuntamente com as análises de similaridade de seqüência para se determinar espécies de potyvírus (VAN REGENMORTEL et al., 1997).

2.4. Resistência derivada do patógeno (RDP)

O conceito de resistência derivada do patógeno (RDP) foi proposto por SANFORD e JOHNSTON (1985). Com base neste conceito foi proposto o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a vírus, por meio da expressão de porções do genoma ou de genes derivados dos vírus (BEACHY, 1993; WILSON et al., 1993; BALUCOMBE 1994b; LOMONOSSOFF, 1995).

O primeiro relato de RDP consistiu na transferência do gene CP do *Tobacco mosaic virus* (TMV) para plantas de fumo (POWELL-ABEL et al., 1986). Plantas transgênicas expressando altos níveis de CP apresentaram-se resistentes quando inoculadas com vírions, mas suscetíveis quando inoculadas com RNA viral. Com base nesta observação foi sugerido que a proteção mediada pela CP contra o TMV foi devida à inibição do desencapsulamento do vírion nas células inicialmente infectadas (REGISTER e BEACHY, 1988). Em estudos de resistência mediada pela CP contra o *Alstroemeria mosaic virus* (AIMV), linhagens transgênicas produzindo baixos níveis de CP foram

resistentes somente à inoculação com vírions. Nas linhagens transgênicas produzindo a CP mutada ou altos níveis de CP selvagem, a resistência foi efetiva contra vírions e RNA de AIMV, sugerindo que a proteção foi devida à ligação de CP com fatores do hospedeiro envolvidos na desencapsulação. Entretanto, é também possível que o desencapsulamento tenha sido bloqueado (YUSIBOV e LOESCH, 1995). Atualmente, tem sido proposto que a CP pode conferir resistência via interação com a proteína NIb (a replicase viral), sugerindo que a CP pode conferir resistência por vários mecanismos (HONG et al., 1996).

A maioria dos casos de resistência mediada pela proteína capsial é baseada na expressão dos genes intactos. Entretanto, a resistência também pode ser obtida pela expressão de formas mutantes de genes virais. O exemplo mais comum é a resistência mediada pela proteína de movimento (BAULCOMBE, 1996).

As proteínas de movimento virais (MPs) possibilitam a movimentação do vírus entre células adjacentes (movimento célula-a-célula, via plasmodesmas) e a longa distância (movimento sistêmico, via floema). A resistência conferida pela expressão de uma forma não funcional da MP do TMV parece ser devida à competição pelos sítios de ligação aos plasmodesmas entre as MPs mutante e normal (LAPIDOT et al., 1993). Uma característica interessante atribuída à resistência mediada pela proteína de movimento é seu amplo espectro de ação. A resistência conferida pela MP mutante do TMV é eficiente para vírus classificados em diferentes gêneros (COOPER et al., 1995). Da mesma forma, expressão de MP de *Brome mosaic virus* (BMV, um bromovírus) em uma planta não hospedeira deste vírus confere resistência ao TMV (MALYSHENKO et al., 1993). Estes exemplos de amplo espectro de ação da resistência sugerem que as MPs de diferentes vírus interagem com os mesmos fatores do hospedeiro (CARRINGTON et al., 1996).

Transgenes expressando a replicase viral também podem conferir resistência. A resistência mediada pela replicase foi primeiramente descrita para TMV, em plantas transgênicas que codificavam um polipeptídeo de 54KDa correspondente à região carboxílica da replicase, ainda que este polipeptídeo não fosse detectado nas plantas (GOLEMBOSKI et al., 1990). Embora tenha sido sugerido que certos tipos de resistência mediada pela replicase são

mediados por RNA e não pela proteína (BAULCOMBE, 1996), em alguns casos a resistência é função da presença de uma seqüência aberta de leitura e, aparentemente, da produção da proteína (CARR e ZAITLIN, 1991; ZAITLIN et al., 1994). Plantas transgênicas de fumo expressando a replicase truncada de um isolado do CMV (*Cucumber mosaic virus*) pertencente ao subgrupo I foram resistentes a todas as estirpes do subgrupo I, mas não desenvolveram resistência a estirpes do subgrupo II ou a outros vírus relacionados (ZAITLIN et al., 1994). Em PVY (AUDY et al., 1994) e AIMV (BREDERODE et al., 1995), a expressão de formas mutantes da replicase conferiu resistência à infecção viral, enquanto plantas transformadas com RNAs não traduzíveis permaneceram suscetíveis. Os mecanismos envolvidos na resistência mediada pela replicase ainda não são conhecidos, embora plantas que possuem este tipo de resistência inibem fortemente a replicação viral e são normalmente resistentes a uma elevada concentração de inóculo (BEACHY, 1997). Tem sido proposto que a proteína produzida pelo transgene interfere de alguma maneira com a replicação viral, talvez pela ligação da replicase não funcional a fatores do hospedeiro ou a proteínas virais que regulam a replicação e expressão gênica do vírus (BEACHY, 1997).

Diversas estratégias de RDP envolvem a expressão de formas não traduzíveis de genes do patógeno. A expressão de seqüências de RNA anti-senso pode reduzir a replicação de vírus com genoma composto de RNA. Em alguns casos a infecção é pouco afetada (POWELL et al., 1989; HEMENWAY et al., 1988), enquanto em outros a infecção é fortemente inibida (HAMMOND e KAMO, 1995; YEPS et al., 1996). Uma outra estratégia envolve a expressão de RNAs ou DNAs interferente-defectivos (DIs) ou RNAs satélites. Em plantas transgênicas expressando RNAs satélites de CMV ou *Tobacco ringspot virus* (TRSV) ocorreu a inibição da replicação dos respectivos vírus (BAULCOMBE et al., 1986; HARRISON et al., 1987; JAQUEMOND et al., 1988; GERLACH et al., 1987). Exemplos de resistência conferida por meio da expressão de DIs incluem resistência a geminivírus (STANLEY et al., 1990) e ao *Cymbidium ringspot virus* (CRV) (KOLLÀR et al., 1993). O mecanismo de resistência conferida pela expressão de vírus satélites e DIs provavelmente está relacionado com a competição entre essas moléculas e o genoma viral, redirecionando proteínas virais ou do hospedeiro em interações que podem ser

não produtivas para a replicação e movimento do vírus em plantas infectadas (BAULCOMBE, 1996).

A estratégia de RDP que vem se mostrando mais promissora envolve a transformação de plantas com seqüências não traduzíveis derivadas do genoma do vírus, em um mecanismo conhecido como resistência dependente de homologia (*homology-dependent resistance*, HDR) (BAULCOMBE, 1996). Tem sido proposto que a HDR atua por um mecanismo similar ao silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (LINDBO et al., 1993; MULLER et al., 1995; SMITH et al., 1994).

2.5. Silenciamento gênico pós-transcricional

Modificações epigenéticas na expressão gênica são características herdáveis que não podem ser explicadas por alterações na seqüência gênica, e que podem resultar na repressão (silenciamento gênico) ou ativação (ativação gênica) da expressão do gene (VAUCHERET et al., 2001). Até o final da década de 80, somente modificações na seqüência de DNA ou na proteína eram classificadas como epigenéticas (LEWIN, 1998). Entretanto, durante a década de 1990, um grande número de fenômenos de silenciamento gênico que ocorriam em nível pós-transcricional foram descritos em plantas, fungos, animais e ciliados, introduzindo o conceito de silenciamento gênico pós-transcricional (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS) (BAULCOMBE, 2000; MATZKE et al., 2001).

O silenciamento gênico pós-transcricional resulta na degradação de uma população de RNAs homólogos de maneira altamente específica em termos de seqüência (DING, 2000). O fenômeno foi observado pela primeira vez em plantas transgênicas, quando a introdução de um transgene levou à inativação (silenciamento) do próprio transgene e do gene endógeno homólogo, e foi denominado co-supressão (NAPOLI et al., 1990; SMITH et al., 1990; VAN DER KROL et al., 1990). Fenômenos semelhantes foram relatados no fungo *Neurospora crassa*, no qual foi denominado *quelling* (ROMANO e MACINO, 1992; COGONI et al., 1996), e em animais (*Drosophila* e *Caenorhabditis*

elegans), nos quais foi denominado *RNA interference* (RNAi) (FIRE et al., 1998).

RNAi é resultado da degradação do RNA endógeno na presença de um RNA de fita dupla (dsRNA) homólogo injetado localmente ou formado por meio da expressão de transgenes contendo repetições invertidas (TAVERNARAKIS et al., 2000). Em plantas, a introdução de dsRNA e transgenes que possuem repetições invertidas que levam à produção de dsRNA também dispara o mecanismo de PTGS do transgene e do gene endógeno (CHUANG e MEYEROWITZ, 2000; SCHWEIZER et al., 2000; WATERHOUSE et al., 1998). Estas evidências sugerem que existe uma relação entre os mecanismos de PTGS em plantas, fungos e animais. A replicação de vírus de plantas também pode disparar eficientemente o mecanismo de silenciamento. A indução de PTGS por vírus foi confirmada com a observação de que genes endógenos ou transgenes eram silenciados após a infecção com vírus recombinantes contendo parte da seqüência do gene ou do transgene. O mecanismo de indução de silenciamento por meio da replicação de vírus foi denominado *virus induced gene silencing* (VIGS) (KUMAGAI et al., 1995; KJEMTRUP et al., 1998; RUIZ et al., 1998; RATCLIFF et al., 2001). Vários grupos de pesquisadores demonstraram que PTGS também pode afetar transgenes que não possuem um gene endógeno homólogo, sugerindo que o fenômeno não é apenas um mecanismo regulatório que controla a expressão de genes endógenos (DEHIO e SCHELL, 1994; INGELBRECHT, 1994; ELMAYAN e VAUCHERET, 1996).

O decréscimo nos níveis de mRNA observado após a ativação de PTGS não está relacionado com a diminuição da taxa de transcrição, mas sim com a degradação do mRNA (DE CARVALHO et al., 1995). Desta forma, o silenciamento tem sido correlacionado com um acúmulo de intermediários da degradação do mRNA (METZLAFF et al., 1997; HOLTORF et al., 1999).

Um acúmulo significativo de pequenos RNAs (20 a 25 nucleotídeos) de orientação senso e anti-senso foi observado em vários sistemas de PTGS em plantas (HAMILTON e BAULCOMBE, 1999). Esse acúmulo de pequenos RNAs em ambas as orientações sugere que a formação de dsRNA ocorre antes da degradação do mRNA. Estudos em *Drosophila* também revelaram a presença destes pequenos RNAs (ZAMORE et al., 2000), e demonstraram que estes são resultado da clivagem do dsRNA injetado na célula e podem servir como “guia”

para direcionar a degradação de mRNAs homólogos (BERNSTEIN et al., 2001). Oligonucleotídeos sintéticos de 21 a 25 nt são suficientes para induzir RNAi *in vitro* (ELBASHIR et al., 2001a) e *in vivo* (ELBASHIR et al., 2001b), na ausência de dsRNA.

Estudos de parâmetros que aumentam ou diminuem a eficiência da ativação de PTGS revelaram que existem dois tipos de *loci* transgênicos que ativam o mecanismo eficientemente. O primeiro tipo corresponde a uma cópia única do transgene transcrita em taxa elevada. Vários estudos sugerem que a eficiência de ativação de PTGS depende da capacidade do transgene em produzir um nível de mRNA acima de um nível limite. De fato, PTGS é ativado mais eficientemente quando são usados promotores fortes (QUE et al., 1997). O segundo tipo de *locus* transgênico que pode ativar PTGS eficientemente é a construção carregando duas cópias do transgene arranjadas na forma de repetições invertidas (*inverted repeats*, IR). Estas construções são geralmente transcritas a uma taxa muito baixa, o que contraria o modelo do nível limite de RNA (VAN BLOCKLAND et al., 1994). Para explicar esta eficiência de ativação, tem sido proposto que IRs produzem dsRNA diretamente, e que esse dsRNA dispara eficientemente o mecanismo de PTGS, mesmo quando presente em baixa concentração. De fato, a introdução de cópias únicas de transgenes que possuem a mesma seqüência clonadas em orientações senso e antisenso sob o controle do mesmo promotor silencia eficientemente o transgene e o gene homólogo (HAMILTON et al., 1998; WATERHOUSE et al., 1998). Além disso, RNAi em animais também é ativado eficientemente pela introdução direta de dsRNA na célula (FIRE et al., 1998), ou pela expressão de transgenes contendo a mesma seqüência nas orientações senso e antisenso sob controle do mesmo promotor (TAVERNARAKIS et al., 2000).

Uma outra característica marcante de PTGS em plantas, fungos e animais é a produção de um “sinal” sistêmico. COGONI et al. (1996) demonstraram o envolvimento de um fator difusível dominante em *N. crassa*. Heterocárions contendo núcleos apresentando genes silenciados e não silenciados exibiam o fenótipo silenciado. Em *Caenorhabditis elegans*, RNAi pode ser disparado em todo o organismo injetando-se dsRNA na cavidade bucal ou por meio da ingestão de bactérias expressando dsRNA (TIMMONS et al., 2001). Este fator é dominante pois, em cruzamentos entre indivíduos

afetados ou não por RNAi, toda a progênie é afetada (GRISHOK et al., 2000). Em plantas, PTGS foi transmitido com 100% de eficiência a partir de porta-enxertos silenciados a enxertos não silenciados contendo o transgene homólogo, mas não a enxertos que não possuíam o transgene homólogo, indicando que o sinal é específico em termos de seqüência (PALAUQUI et al., 1997).

A natureza deste sinal sistêmico ainda não é conhecida, embora seja improvável que sejam os pequenos RNAs de 21-25 nt, pois foi demonstrado que estes RNAs podem ser eliminados sem efeito na propagação sistêmica do silenciamento (MALLORY et al., 2001). Porém, devido a sua especificidade de seqüência, é provável que este fator difusível seja, pelo menos em parte, um RNA (VAUCHERET et al., 2001).

Estudos genéticos utilizando mutantes incapazes de silenciar têm identificado vários *loci* envolvidos na via de silenciamento. O gene *SDE1* (ou *SGS2*) de *Arabidopsis* codifica uma proteína que possui alta homologia com uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) de tomateiro (DALMAY et al., 2000; MOURRAIN et al., 2000). *SDE1/SGS2* é similar a QDE-1, uma proteína requerida para o mecanismo de *quelling* em *Neurospora* (COGONI e MACINO, 1999), e a EGO-1, requerida para RNAi em *C. elegans* (SMARDON et al., 2000). O gene *SGS3* de *Arabidopsis* codifica uma proteína que não apresenta similaridade significativa com outras proteínas de plantas ou de outros organismos (MOURRAIN et al., 2000). Sua função ainda não foi deduzida, pois *SGS 3* não possui nenhum outro domínio conhecido além do *coiled-coil* presente no seu terminal carboxílico, que sugere a possibilidade de interações com outras proteínas. A ausência de proteínas similares em *C. elegans* e *Drosophila* (dois organismos com o genoma completamente seqüenciado) e a ausência de um mutante correspondente em *Neurospora* sugerem que a função de *SGS3* é específica a plantas (Vaucheret et al., 2001). Um terceiro gene que controla PTGS em *Arabidopsis* corresponde a um gene previamente identificado como regulador do desenvolvimento, *AGO1* (FAGARD et al., 2000). Mutantes *ago1* apresentam alterações drásticas no desenvolvimento, que alteram a arquitetura e fertilidade da planta. A proteína *AGO1* possui similaridade com várias proteínas contendo domínios de interação proteína-proteína, denominados Piwi e PAZ (Piwi/Argonaute/Zewille)

(CERUTTI et al., 2000). Os mesmos domínios foram identificados em QDE -2, requerida para *quelling* em *Neurospora* (CATALANOTO et al., 2000), e RDE-1, requerida para RNAi em *C. elegans* (TABARA et al., 1999). Foi isolado também de *Arabidopsis* o gene *SDE 3*, que codifica uma RNA helicase similar às proteínas MUT-6, requerida para PTGS em *Chlamydomonas* (WU-SCHARF et al., 2000), e SMG-2, requerida para RNAi em *C. elegans* (DOMIER et al., 2000). A identificação de um grupo de proteínas relacionadas indica que PTGS, *quelling* e RNAi são mecanismos relacionados e que, possivelmente, compartilham um ancestral comum (COGONI e MACINO, 2000). Entretanto, o processo deve apresentar particularidades nos diferentes organismos em que ocorre, conforme sugerido pela identificação do gene *SGS3* em *Arabidopsis*, sem um correspondente em fungos e animais.

Estudos *in vitro* do sistema de silenciamento em *C. elegans* e em *Drosophila* identificaram duas ribonucleases envolvidas no mecanismo e sugerem a existência de componentes adicionais na via de silenciamento em plantas. O gene *MUT-7* de *C. elegans* codifica uma proteína homóloga à RNaseD bacteriana, sugerindo que esta nuclease é requerida para a degradação do mRNA (KETTING et al., 1999), e o gene *DICER* de *Drosophila* (BERNSTEIN et al., 2001) codifica uma proteína similar à RNase III (endonuclease de afinidade por dsRNA). RNases de plantas similares a *DICER* poderiam participar da degradação do dsRNA e da formação dos pequenos RNAs. Em *Arabidopsis*, um gene denominado *CAF* (também conhecido como *SIN1* ou *SUS1*) semelhante a *DICER* foi identificado (JACOBSEN et al., 1999), porém a inativação deste gene é letal para o embrião, indicando ser indispensável para o desenvolvimento da planta (VANCE e VAUCHERET, 2001).

Estudos em *Arabidopsis* e *Neurospora* indicam que modificações no DNA genômico também são requeridas para a indução de silenciamento nesses organismos. Os mutantes de *Arabidopsis ddm1* e *met1* foram isolados a partir de uma seleção de mutações que resultavam em uma redução geral da taxa de metilação do DNA (VONGS et al., 1993). *MET1* codifica a principal metil-transferase de *Arabidopsis* (FINNEGAN et al., 1996), e *DDM1* codifica uma proteína relacionada aos fatores SNF2/SWI2 de remodelagem da cromatina (JEDDELOH et al., 1999). Os mutantes *ddm1* e *met1* possuem uma

redução da taxa de silenciamento gênico transcricional (MOREL et al., 2000; STEIMER et al., 2000) e de PTGS correlacionado com a taxa de metilação do DNA genômico (MOREL et al., 2000). Entretanto, ao contrário dos mutantes *sgs* e *ago1*, os mutantes *ddm1* e *met1* não apresentam uma redução da taxa de silenciamento gênico *pós-transcricional* em todas as plantas. Além disso, a redução na taxa de PTGS nos mutantes *ddm1* e *met1* é diferente: em mutantes *ddm1* o silenciamento é inibido em toda planta durante todo seu ciclo de vida, enquanto os mutantes *met1* possuem o silenciamento inibido progressivamente durante o desenvolvimento da planta, sugerindo que *DDM1* e *MET1* estão envolvidos na iniciação e manutenção do silenciamento, respectivamente. Estes resultados confirmam a existência de uma etapa nuclear do mecanismo e sugerem uma ligação entre as vias de silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional (VAUCHERET et al., 2001).

A identificação de vários componentes celulares envolvidos no controle de PTGS em vários organismos possibilitou a elaboração de um modelo comum para o mecanismo (Figura 2). PTGS é induzido em plantas com uma eficiência variável por transgenes que produzem transcritos senso ou antisenso. Transgenes construídos para a produção de transcritos apresentando repetições invertidas são fortes indutores de silenciamento (SMITH et al., 2000; METZLAFF et al., 1997). Neste modelo, PTGS induzido por um transgene em copia única transcrito acima do nível limite pode ser iniciado pela transcrição de RNAs aberrantes (abRNA). Embora estes RNAs aberrantes não tenham sido isolados, a sua existência é inferida pelos efeitos de alterações na estrutura da cromatina, cuja manutenção requer proteínas como DDM1 ou QDE3. Estes transcritos aberrantes formam uma estrutura “duplex” (METZLAFF et al., 1997) que é substrato para a SGS2/SDE1 (RdRp), que juntamente com SGS3 (*Coiled-coil*), SDE3 e AGO1 (PAZ/Piwi), sintetizam um dsRNA. RNases não identificadas em plantas semelhantes a DICER podem participar na clivagem do dsRNA e formação dos pequenos RNAs (BASS, 2000). Estes pequenos RNAs direcionam o complexo de degradação de RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISC) para os RNAs alvo, permitindo a sua completa degradação. Uma RNA helicase pode ser necessária para desnaturar os pequenos dsRNAs, permitindo o pareamento entre o pequeno

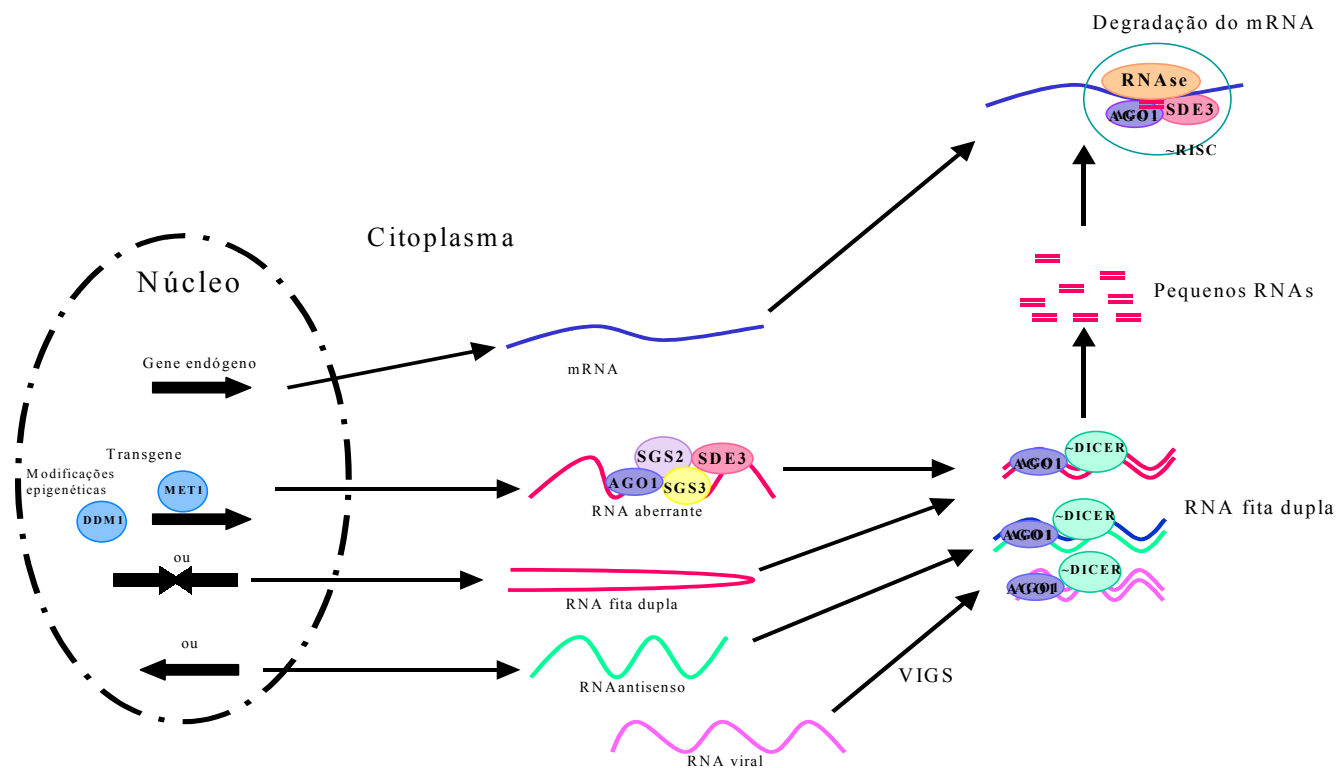


Figura 2 - Modelo proposto para PTGS em plantas. *Loci* transgênicos organizados em seqüências palindrômicas ou vírus podem produzir RNA fita dupla diretamente. *Loci* transgênicos na orientação antisense podem produzir RNA fita dupla por hibridização com o mRNA endógeno. *Loci* transgênicos altamente expresso, pode levar à produção de RNA aberrante como resultado de modificações epigenéticas mediadas por DDM1. O RNA aberrante é então substrato para a RdRP (SGS2) que sintetiza o RNA fita dupla. Este RNA fita dupla é então substrato para enzimas que clivam RNA fita dupla (semelhantes a DICER de *Drosophila*), gerando os pequenos RNAs. Estes pequenos RNAs direcionam a maquinaria de degradação (RISC em *Drosophila*).

RNA antisense e o mRNA. Proteínas adaptadoras podem ser requeridas para a transferência dos pequenos RNAs de DICER para RISC (BERNSTEIN et al., 2001). Os produtos da família gênica Argonauta podem realizar esta função. Membros desta família não possuem atividade enzimática mas são requeridos para PTGS em nematóides (RDE1), fungos (QDE2) e plantas (AGO1) (FAGARD et al., 2000). Consistente com a função adaptadora desta família gênica, uma proteína da família Argonauta em *Drosophila* (AGO2) foi co-purificada com RISC e também co-imunoprecipitada com DICER (HAMMOND et al., 2001).

A maioria dos vírus de plantas com genoma composto por RNA (de fita simples ou dupla) produzem dsRNA como intermediários da replicação do seu genoma, e vírus de ssRNA de sentido positivo são particularmente eficientes na ativação de silenciamento (CARRINGTON et al., 2001). Silenciamento induzido por vírus ocorre em mutantes de *Arabidopsis* para a RdRP (*sgs2/sde1*) e para a RNA helicase (*sde3*), sugerindo que VIGS pode ser ativado por uma via diferente da usada em silenciamento de genes nucleares.

Desde a descoberta de PTGS, várias linhas de pesquisa indicam uma relação complexa entre PTGS, infecção viral e resistência. A idéia de que PTGS é uma via de defesa contra vírus é relacionada a observações de interações vírus-planta. A introdução de transgenes expressando porções do genoma viral pode levar à resistência da planta a infecções virais. Uma vez estabelecido o PTGS, todos os RNAs com homologia ao transgene são degradados, incluindo aqueles derivados do vírus (LINDBO et al., 1993). Desta forma, vírus de plantas podem ser alvos de PTGS induzido por transgenes. As plantas podem resistir à infecção viral (fenótipo normalmente referido como imunidade) ou apresentar suscetibilidade à fase preliminar da infecção, da qual eventualmente se recuperam (fenótipo normalmente referido como recuperação) (LINDBO et al., 1993; SMITH et al., 1994). Além disso, muitos vírus codificam proteínas que suprimem PTGS, sugerindo uma co-evolução entre hospedeiro e patógeno.

Proteínas supressoras de silenciamento têm sido classificadas em três grupos de acordo com a etapa de PTGS que inibem (LI e DING, 2001). Um grupo inibe PTGS em todos os tecidos da planta, inibindo o silenciamento em áreas em que este já foi estabelecido. A supressão de silenciamento por este

grupo de proteínas, que inclui a proteína HC-Pro dos potyvírus, está associada com a inibição do acúmulo dos pequenos RNAs de 21 a 25 nt associados a PTGS, mas não possui efeito sobre a produção do sinal sistêmico (MALLORY et al., 2001). Uma proteína celular (rgs-CaM) que interage com HC-Pro também suprime PTGS (ANANDALAKSHMI et al., 2000), mas seu efeito sobre o acúmulo dos pequenos RNAs ainda não foi determinado. O segundo grupo de inibidores de PTGS, que inclui a proteína 2b do CMV, bloqueia a dispersão de PTGS para tecidos novos, mas não possui efeito sobre tecidos em que PTGS já tenha se estabelecido (BRIGETI et al., 1998). Foi demonstrado que a localização nuclear de 2b é essencial para a atividade supressora, sugerindo que esta proteína bloqueia a etapa nuclear do processo de silenciamento (LUCY et al., 2000). O terceiro grupo de proteínas supressoras inclui a proteína p25 do PVX. Experimentos iniciais não indicaram propriedade de supressão de silenciamento para essa proteína (BRIGNETI et al., 1998). Entretanto, experimentos posteriores envolvendo estaquia demonstraram que porta-enxertos silenciados expressando p25 são incapazes de induzir silenciamento ao enxerto, independente da construção do transgene (VOINNET et al., 2000). Estes resultados indicam que p25 previne a disseminação do silenciamento bloqueando a síntese do sinal sistêmico.

Ainda que nos casos descritos PTGS seja ativado por um estímulo artificial, o papel biológico deste mecanismo parece estar relacionado com prevenção à infecção viral e mobilização de transposons em *C. elegans*. Esta conclusão se baseia na observação de que transposons são mais ativos em mutantes de *C. elegans* defectivos em RNAi (KETTING et al., 1999; TABARA et al., 1999). Da mesma forma, mutantes defectivos em PTGS em plantas são mais suscetíveis à infecção viral (MOURRAIN et al., 2000), além do fato já mencionado de que vírus codificam vários fatores que suprimem silenciamento (VOINNET et al., 2000). Mutantes defectivos em PTGS como *ego1* (SMARDON et al., 2000), *ago1* (FAGARD et al., 2000) e *dicer* (KNIGHT e BASS, 2001) possuem desenvolvimento anormal, sugerindo que PTGS também possui um papel essencial no desenvolvimento. A recente descoberta de que DICER regula a maturação dos pequenos RNA temporais (stRNA) em *Drosophila* (HUTVAGNER et al., 2001) e em *C. elegans* (GRISHOK et al., 2001) apóia esta hipótese.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Foram analisadas 16 plantas transgênicas de maracujá-amarelo, transformadas por Braz (1999) com uma construção não traduzível correspondente a 2/3 do gene *nib* e a região 5' do gene *cp* derivada do PWV-isolado MG. Esta região foi clonada em pBI121 flanqueada pelo promotor 35S de CaMV, o gene *gus* e o sinal de terminação da transcrição do gene *Nos* (Figura 3).

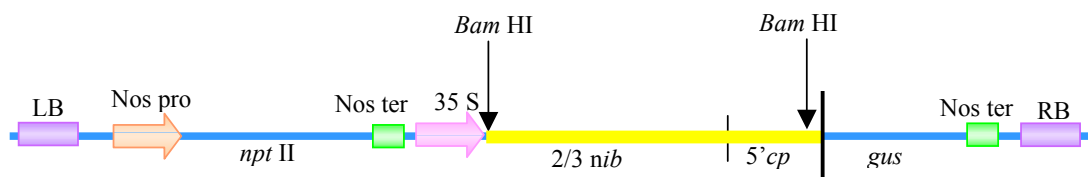


Figura 3 - Detalhe do T-DNA utilizado para a transformação de maracujá. LB: borda esquerda; RB: borda direita; Nos pro: promotor do gene *nos*, que regula a expressão do gene *nptII*; Nos ter: sinal de terminação da transcrição; 35S: promotor CaMV 35S, que regula a expressão do transgene. O fragmento viral está representado em amarelo.

3.2. Confirmação da presença do transgene nas plantas transformadas

A presença do transgene nas 16 plantas transgênicas foi confirmada via PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene *nptII* (npt 5: 5'-C C G G T C A G C C C A T T C G C C G C C - 3'; npt 3: 5'-T C A G C G C A G G G G C G C C C G G T T - 3').

Inicialmente extraiu-se DNA total a partir de folhas provenientes das linhagens transgênicas, de acordo com o protocolo descrito por BRASILEIRO et al. (1998). Três gramas de folhas jovens foram coletados e imediatamente pulverizadas em nitrogênio líquido. Em seguida foram adicionados 15 ml de tampão de extração (Tris-HCl 100mM, pH 8,0, NaCl 1,4 M, CTAB 2% (p/v), β -mercaptoetanol 0,2% (v/v) e EDTA 20mM) pré-aquecido a 65°C. O homogeneizado foi incubado por 30 minutos a 65°C, e agitado a cada dez minutos. Em seguida foi adicionado um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e os restos celulares removidos por centrifugação a 5.000g por dez minutos. A fase aquosa foi eliminada e realizou-se mais uma extração com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de 0,6 volume de isopropanol e incubação a -20°C por duas horas. Após centrifugação (10.000g por 20 minutos) o DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) e ressuspendido em TE contendo RNase (100 μ g/ml).

As condições de amplificação via PCR foram previamente otimizadas. Cada reação continha cerca de 30 a 50 ng de DNA total extraído de plantas, uma unidade de *Taq* DNA polimerase e 20 pmoles de oligonucleotídeos, em um volume final de 25 μ L. As reações foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por um minuto, seguindo-se 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 63°C por um minuto e extensão a 72°C por dois minutos, em um em termociclador MJ RESEARCH PT-100. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1% (p/v).

3.3. Propagação vegetativa das plantas transgênicas

As plantas transgênicas foram propagadas vegetativamente, removendo-se estacas de aproximadamente 20 cm a partir das plantas matrizes. Cerca de quatro cm da base de cada estaca foram imersos durante cinco minutos em AIB a 200 mg/l. Após o tratamento com AIB as estacas foram transferidas para bandejas contendo areia estéril, permanecendo cerca de 20 dias com a extremidade tratada mergulhada no leito de areia. Após esse período as mudas foram transferidas para vasos e mantidas em casa-de-vegetação.

3.4. Inoculação das plantas transgênicas

Quinze dias após o plantio as estacas foram inoculadas via extrato foliar tamponado (EFT), utilizando tampão de fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,2, contendo sulfito de sódio a 0,1% (p/v), a frio. Os dois isolados virais utilizados neste trabalho foram obtidos por Costa (1996) e provêm dos Estados de Minas Gerais (MG) e Pernambuco (PE). Os isolados encontravam-se armazenados *in vitro* a -20°C na forma de material foliar dessecado de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. 'Preto 153'), e também vinham sendo mantidos *in vivo* em plantas de maracujá-amarelo mantidas em casa-de-vegetação, por meio de inoculações periódicas via EFT conforme descrito anteriormente.

Foram inoculadas cinco plantas por transformante com o isolado MG, cinco com o isolado PE, e três com o tampão de inoculação. As plantas foram re-inoculadas três dias depois para evitar escapes, mantidas em casa de vegetação e avaliadas visualmente quanto à incidência de sintomas até 45 dias após a inoculação. O experimento foi repetido quatro vezes, utilizando-se os isolados virais mantidos *in vivo* nas duas primeiras repetições e *in vitro* nas duas últimas.

3.5. ELISA indireto

Foram coletados 0,3 g de folhas de plantas inoculadas que permaneceram assintomáticas. As folhas foram homogeneizadas em três ml de tampão de extração (VAN REGENMORTEL e BURCKARD, 1980). Foram adicionados 100 μ l do homogeneizado a cada cavidade de uma placa de poliestireno. Após incubação a 37°C por uma hora, as cavidades foram lavadas três vezes com aproximadamente 200 μ l de PBS-Tween (CLARK e ADAMS, 1977) por vez. Em seguida foi adicionado o IgG específico para PWV, diluído 1:10.000 em tampão PEP (CLARK e ADAMS, 1977), e incubado a 37°C por uma hora. As cavidades foram novamente lavadas com PBS-Tween por três vezes. Adicionou-se o conjugado cabra-anti-coelho/enzima, diluído 1:2.000 em tampão PEP, seguindo-se incubação a 37°C por três horas. Após novo ciclo de lavagens, foi adicionado *p*-nitrofenilfosfato, substrato da enzima, na concentração de 10 μ g/mL. Após cerca de 20 minutos as absorbâncias foram medidas a 405 nm em uma leitora Titertek Multiskan plus MKII. O valor de absorbância adotado para distinguir amostras infectadas das sadias consistiu no dobro da média das absorbâncias das amostras sadias (SUTULA et al., 1986).

3.6. Análise da expressão do transgene

3.6.1. Extração de RNA total

Aproximadamente 0,5 g de folhas coletadas das linhagens transgênicas T4 e T10 foram pulverizadas com nitrogênio líquido e homogeneizadas em cinco ml de tampão de extração (Tris-HCl 50mM, pH 9,0, NaCl 0,1M, SDS 2% (p/v), EDTA 10mM e β -mercaptoetanol 20mM). Em seguida foi adicionado igual volume de fenol, e em seguida igual volume de clorofórmio. A mistura foi mantida sob agitação moderada por cinco minutos. Os restos celulares foram removidos por centrifugação a 8.000g por dez minutos a 4°C. A fase aquosa foi removida e realizou-se mais uma extração com fenol e clorofórmio. À fase

aquosa adicionaram-se dois volumes de clorofórmio, e a mistura foi novamente mantida sob agitação moderada por cinco minutos. Seguiu-se centrifugação a 8.000g por dez minutos. Os ácidos nucleicos foram precipitados por meio da adição de 1/20 volumes de NaOAc 3 M, pH 7,0 e três volumes de etanol absoluto, e incubação a -70°C por duas horas. Após centrifugação a 8.000g por 20 minutos, o "pellet" foi lavado com etanol 75% (v/v) e ressuspendido em 200 μl de água tratada com dietilpirocarbonato de sódio (DEPC). Adicionaram-se PEG (PM=8.000) e NaCl para uma concentração final de 10% (p/v) e 0,5 M, respectivamente. A mistura foi homogeneizada e mantida em gelo por 30 minutos. Seguiu-se centrifugação a 12.000g por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o RNA precipitado por meio de adição de três volumes de etanol absoluto e incubação a -20°C por 16 horas. Após centrifugação por 20 minutos a 14.000g, o *pellet* foi lavado com etanol 75% e solubilizado em 20 μL de água tratada com DEPC. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm. A qualidade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1,2 % (p/v).

3.6.2. Northern blotting

Aproximadamente 20 μg de RNA total foram separados por eletroforese em gel desnaturante de agarose a 1,2% (p/v). Após a eletroforese o RNA foi transferido por capilaridade para membrana de náilon, em SSC 10x, e imobilizado por luz ultravioleta conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989).

Como sonda para o transgene foi utilizado um fragmento com 1.100 nucleotídeos (nt), amplificado via PCR com os oligonucleotídeos M13F (5' C G C C A G G G T T T T C C C A G T C A 3') e M13R (5' T C A C A C A G G A A A C A G C T A T G A C.3') a partir de 10 μg de DNA plasmidial do clone K, correspondente a um fragmento com aproximadamente 2/3 do gene *nib* e a região 5' do gene *cp* do isolado PWV-MG1 (BRAZ, 1999). O produto da amplificação foi purificado utilizando-se o kit Concert Rapid PCR Purification System (GIBCO BRL), conforme as instruções do fabricante.

Aproximadamente 50 ng do fragmento purificado foram marcados com [α ³²P]-dCTP pela técnica de oligonucleotídeos aleatórios

A membrana foi pré-hibridizada por duas horas em solução de SSC 6x, Ficoll 400 a 0,2% (p/v), polivinilpirrolidina (PVP) a 0,2%, albumina de soro bovino (BSA) a 0,2% (p/v), SDS a 0,7% (p/v), EDTA 1,3 mM e Tris-HCl 13 mM, pH 7,5, contendo 50 ng de sonda marcada com ³²P e 800 µg de DNA de esperma de salmão. Após a hibridização, a membrana foi lavada 2 vezes (30 minutos por vez) com SSC 1x e SDS 0,1% (p/v), e uma vez (30 minutos) com SSC 0,1x e SDS 0,1% (p/v). Os sinais de hibridização foram revelados por autoradiografia a -80°C utilizando-se “Lightning-Plus Intensifying Screen” (Sigma).

4. RESULTADOS

4.1. Confirmação da presença do transgene nas plantas transformadas

Para determinar se as plantas regeneradas após a transformação possuíam pelo menos uma cópia do transgene, foram realizadas reações de PCR a partir de DNA total extraído dessas plantas, utilizando oligonucleotídeos que se anelam especificamente no gene marcador *npII*.

O par de oligonucleotídeos amplificou um fragmento com aproximadamente 800 nt quando usado como molde o DNA plasmidial do vetor pBI121, que contém o gene *npII* (Figura 4, linha 1). Nas amostras de DNA total das plantas transformadas observou-se a amplificação de um fragmento com o mesmo tamanho (Figura 4, linhas. 3 a 19). Nenhuma amplificação foi observada quando se utilizou como molde DNA total de plantas não transformadas (Figura 4, linha 2), confirmando-se a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados. Também não foi observada amplificação quando se utilizou como molde DNA total da planta regenerada T2 (Figura 4, linha 4) indicando que possivelmente esta planta não está transformada, ou que não foi completa a inserção do T-DNA.

4.2. Inoculação das plantas transgênicas

A fim de determinar se as linhagens transgênicas eram resistentes à infecção pelo PWV, plantas obtidas de estacas retiradas dos transformantes

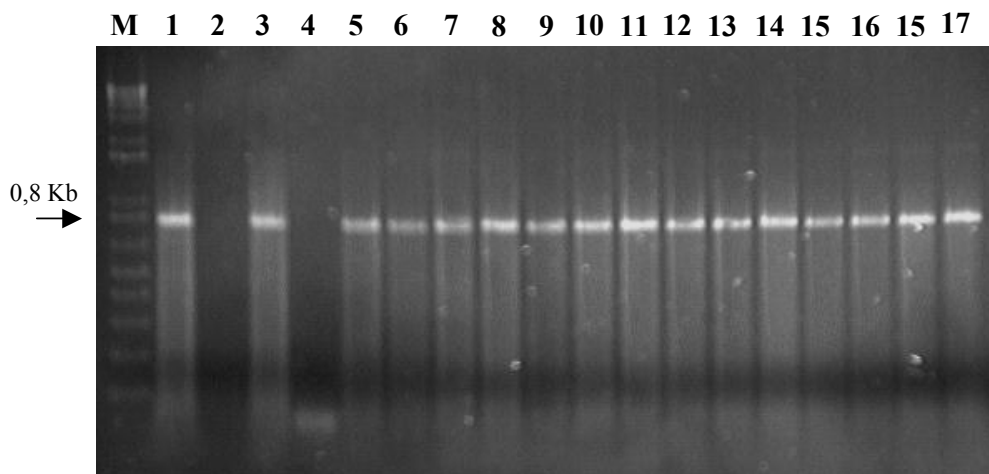


Figura 4 - Produtos da amplificação via PCR do gene *nptII*. DNA total extraído a partir de plantas transformadas (linha 3 a 17, correspondendo às plantas T1 a T16, respectivamente), planta não transformada (linha 2) e DNA plasmidial de pBI121 (linha 1). M: marcador (“1 Kb plus DNA ladder”). O fragmento amplificado está indicado pela seta.

desafiadas mediante inoculação via EFT dos PWV-isolado MG e PWV-isolado PE (Quadro 1). As plantas não transformadas desenvolveram sintomas evidentes de mosaico e deformação foliar após inoculação com ambos os isolados (Figura 5A e B). As plantas da linhagem T10 desenvolveram os mesmos sintomas após inoculação com o isolado PE1 (Figura 5C), mas permaneceram assintomáticas após inoculação com o isolado MG1 (Figura 5D). Esse resultado indica que as plantas da linhagem T10 podem ser resistentes a este isolado, o mesmo utilizado para a transformação. As plantas das demais linhagens transgênicas desenvolveram sintomas de mosaico e deformação foliar após inoculação com ambos os isolados.

Quadro 1 - Resultados da inoculação de plantas das linhagens transgênicas com os isolados PWV-MG1 e -PE1.

Linhagem	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3		Repetição 4	
	MG1	PE1	MG1	PE1	MG1	PE1	MG1	PE1
T1	5/5*	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T2	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T3	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T4	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T6	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T7	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T8	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T9	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T10	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	4/5
T11	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T12	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T13	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5
T14	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
T15	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5
T16	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
NT	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5

*plantas que desenvolveram sintomas/plantas inoculadas

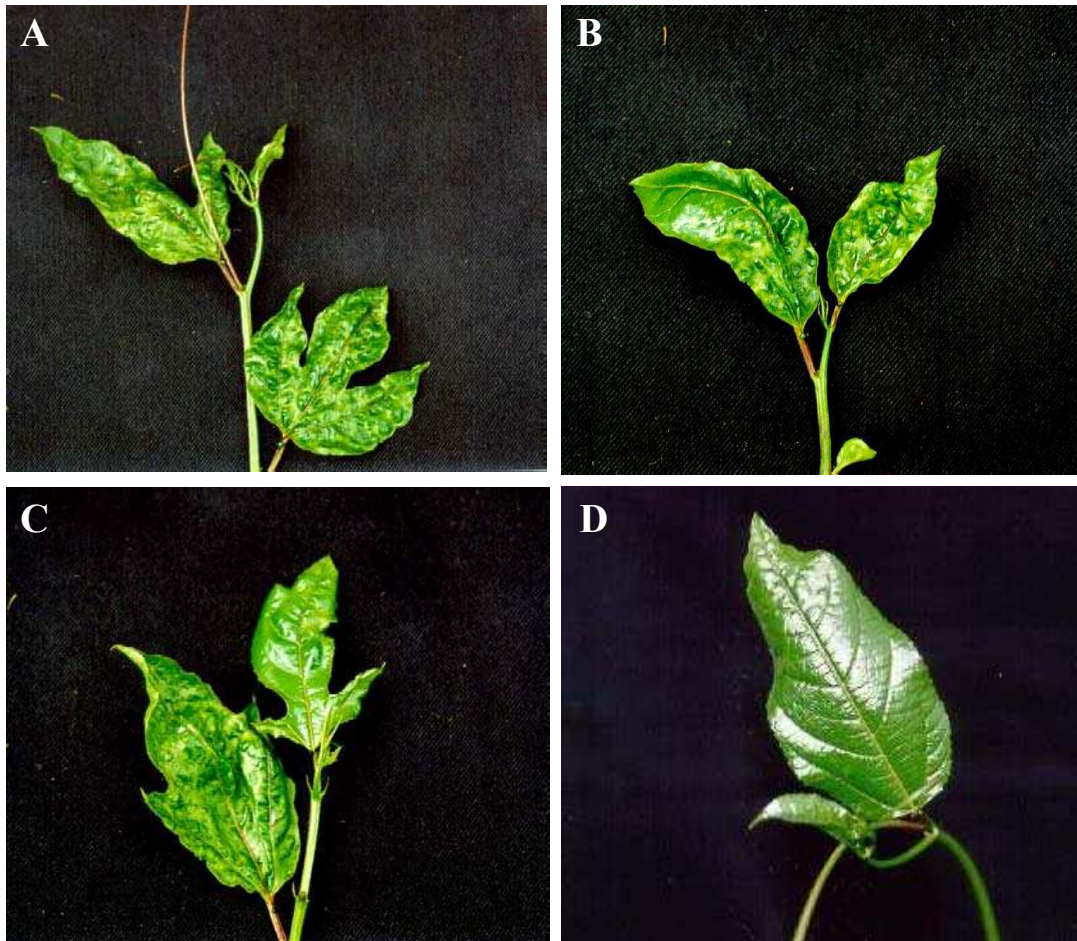


Figura 5 - Sintomas observados nas plantas inoculadas. (A, B) Folhas de maracujazeiros não transformados e inoculados com os isolados PWV-PE1 e -MG1, respectivamente, desenvolveram sintomas de mosaico, deformação foliar e subdesenvolvimento. (C) Plantas transformadas da linhagem T10 inoculadas com isolado PWV-PE desenvolveram os mesmos sintomas das não transformadas. (D) Plantas T10 inoculadas com o PWV-MG não apresentaram quaisquer sintomas.

4.3. Teste das plantas assintomáticas para infecção viral

ELISA indireto foi empregado para determinar se as plantas inoculadas que permaneceram assintomáticas apresentavam infecção latente ou se realmente eram resistentes ao vírus.

Plantas não transformadas inoculadas com os isolados MG1 e PE1, que apresentavam sintomas de infecção viral, apresentaram valores de absorvância claramente acima do valor limite (duas vezes a média da absorvância determinada para plantas sadias) (Figura 6). Plantas transgênicas da linhagem T10 inoculadas com o isolado MG1 (sem sintomas) apresentaram valores de absorvância abaixo do valor limite, em nível equivalente aos das testemunhas (Figura 6), comprovando que estas plantas estavam de fato livres de vírus. Coerentemente, as plantas da linhagem T10 inoculadas com o isolado PE1, que apresentavam sintomas de infecção viral, apresentaram valores de absorvância acima do valor limite.

4.4. Análise da expressão do transgene

Análise de *Northern blot* foi conduzida para determinar se as plantas da linhagem resistente T10 apresentavam este fenótipo devido à ativação do mecanismo de PTGS.

O RNA mensageiro transgênico foi detectado em uma planta não inoculada da linhagem transgênica suscetível T4 (Figura 7, linha 1), mas não foi detectado em plantas não inoculadas da linhagem resistente T10 (Figura 7, linha 2). Esse resultado indica que o mecanismo de PTGS já estava ativado nas plantas da linhagem T10 antes da inoculação com os isolados virais. A não detecção de mRNA transgênico em plantas não transformadas (Figura 7, linha 3) confirmou a especificidade da sonda utilizada.

Em plantas da linhagem T10 inoculadas com o isolado PE1 foi detectado acúmulo de RNA viral (Figura 7, linha 7), evidência de que o vírus foi capaz de se replicar nessa linhagem. Não foi observado acúmulo de RNA viral em plantas da linhagem T10 inoculada com o isolado MG1 (Figura 7, linha 6), comprovando que não ocorreu a replicação do vírus nestas plantas. Acúmulo

de RNA viral também foi detectado em plantas não transformadas e inoculadas com ambos os isolados (Figura 7, linhas 4 e 5), confirmando que a sonda utilizada detecta ambos os isolados.

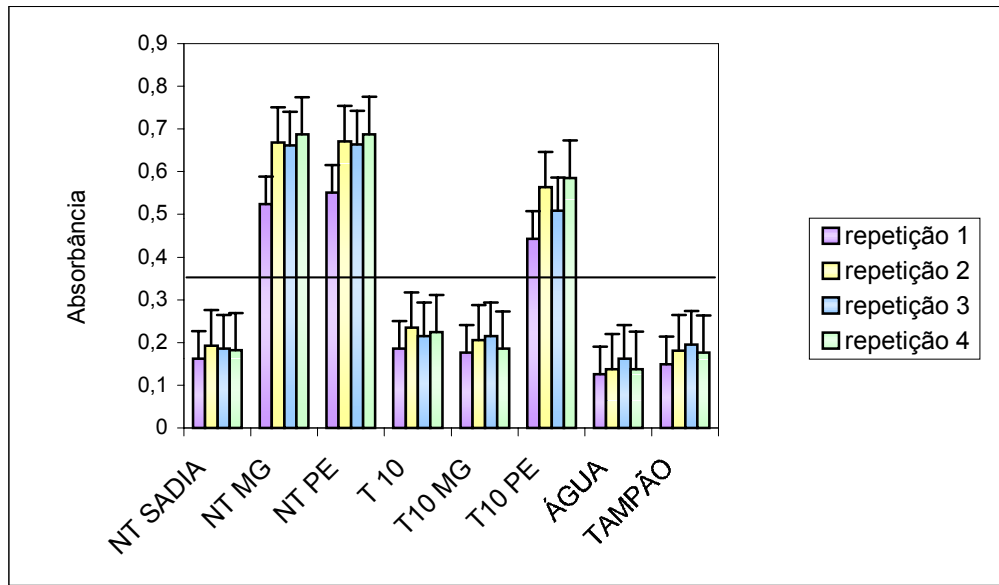


Figura 6 - Detecção viral via ELISA indireto em plantas transgênicas inoculadas com os isolados PWV-MG1 e PE-1. NT sadia: plantas não transformadas e não inoculadas; NT MG: plantas não transformadas inoculadas com PWV-MG1; NT PE: plantas não transformadas inoculadas com PWV-PE1; T10: plantas da linhagem T10 não inoculadas; T10 MG: plantas da linhagem T10 inoculadas com PWV-MG1; T10 PE: plantas da linhagem T10 inoculadas com PWV-PE1; Tampão: tampão de extração para ELISA. A barra horizontal representa o valor limite para a determinação da presença de vírus, correspondente a duas vezes a média de absorvância determinada para as plantas sadias não inoculadas.

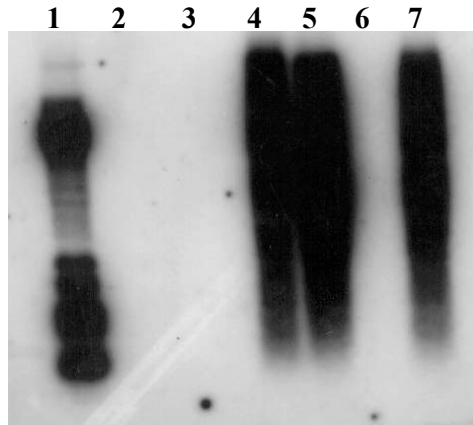


Figura 7 - Análise da expressão do transgene em linhagens transgênicas resistentes ou suscetíveis ao PWV. RNA total foi extraído de plantas inoculadas ou não inoculadas das linhagens transgênicas T4 (suscetível) e T10 (resistente) e hibridizado com sonda específica para os genes *nib* e *cp* do PWV. 1: planta T4 não inoculada; 2: planta T10 não inoculada; 3, planta não transformada e não inoculada; 4, 5, planta não transformada inoculada com PWV-MG1 e PWV-PE1, respectivamente; 6, 7, planta T10 inoculada com PWV-MG1 e PWV-PE, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a construção utilizada para transformação de maracujá-amarelo foi eficiente para conferir resistência ao isolado PWV-MG na planta transgênica T10, e que o mecanismo de resistência é o silenciamento gênico pós-transcricional.

As plantas transgênicas são produzidas por meio da transferência estável e herdável de genes de interesse para o genoma da planta-alvo. Na transformação via *Agrobacterium tumefaciens* são utilizadas estirpes desarmadas da bactéria, nas quais os oncogenes foram eliminados e substituídos por genes de seleção. Foi proposto que a transferência do T-DNA é polarizada e ocorre a partir da borda direita para a esquerda de forma independente do tamanho do fragmento interno de T-DNA (SHENG e CITOVSKY, 1996). O gene de seleção mais utilizado tem sido o gene *nptII*, que codifica a proteína neomicina fosfotransferase II e confere às plantas tolerância a dosagens tóxicas de antibióticos aminoglicosilados (como a canamicina) que são letais para plantas não transformadas.

Atualmente, a reação de polimerase em cadeia (*polymerase chain reaction*, PCR) é amplamente utilizada para a análise de plantas transgênicas, pois permite a detecção rápida de genes em pequenas quantidades de DNA genômico e permite a análise de várias amostras simultaneamente (BRASILEIRO, 1998).

Embora não tenham sido utilizados oligonucleotídeos específicos para o fragmento viral, as análises dos transformantes obtidos por BRAZ et al. (1999) via PCR, confirmou a presença do transgene (Figura 4, linhas 3 a 17), pois os oligonucleotídeos anelam-se especificamente ao gene de seleção *nptII*,

localizado na borda esquerda do T-DNA. A não amplificação do fragmento a partir do transformante T2 (Figura 4, linha 4) indica que nesta planta a transferência do T-DNA não foi completa ou que a planta não está transformada, representando um escape (falso transformante).

Apenas uma planta transgênica (T10) dentre as 16 que foram regeneradas não desenvolveu sintomas quando desafiada com o isolado PWV-MG (Quadro 1). Resultados do ELISA indireto confirmaram a ausência de vírus nestas plantas (Figura 6). A comparação das seqüências de PWV-MG e -PE demonstra que ambos os isolados pertencem à mesma espécie de potyvírus, pois apresentam homologia de 92% para a seqüência de aminoácidos da proteína capsidial e de 94% para a região 3'-não traduzível (BRAZ, 1999). Em vista desse elevado grau de homologia, seria de se esperar que uma linhagem transgênica resistente ao isolado MG também seria resistente ao isolado PE. A possibilidade de que tenha ocorrido uma mutação nos isolados que se encontravam mantidos *in vivo* foi descartada, pois o fenótipo de resistência observado somente para o isolado MG se manteve quando as inoculações foram realizadas com inóculo viral preservado *in vitro*.

BRAZ (1999) encontrou diferenças no padrão de amplificação dos dois isolados quando se utilizou o oligonucleotídeo poty-4, que se anela na extremidade 3' do gene *nib*. Juntos, os resultados de Braz e os resultados aqui obtidos indicam que, apesar do elevado grau de homologia, podem existir diferenças estruturais na região do gene *nib* entre os dois isolados que impossibilita que o mecanismo de resistência seja eficiente contra ambos. Contudo, os experimentos aqui conduzidos não permitem determinar quais seriam essas diferenças.

De acordo com os dados apresentados, construções baseadas na proteína capsidial devem ser mais eficientes para o controle desta virose no Brasil, conferindo um espectro mais amplo de resistência. Além disso, estudos mais detalhados sobre o relacionamento taxonômico de diferentes isolados do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro vêm sendo conduzidos com o objetivo de determinar quais as espécies predominantes no Brasil (SANTANA, 2000), e assim possibilitar o desenvolvimento de construções que sejam mais eficientes para o controle.

O fato de apenas uma planta transgênica ter desenvolvido resistência pode ser explicada pelo fato de a transformação genética de plantas ser um processo aleatório. Ambos os métodos de transformação, via *Agrobacterium* ou biobalística, resultam na incorporação de um número variável de cópias do transgene e a inserção em diferentes locais do genoma da planta. Desta forma, a obtenção de diversas linhagens transformantes independentes torna-se necessária, pois, por probabilidade, os efeitos de números de cópias do transgene e posição de inserção são eliminados.

Para explicar a observação freqüente de que algumas linhagens transgênicas contendo a mesma construção exibem resistência via PTGS e outras não, BAULCOMBE (1996) propõe que existe um fator quantitativo, em que um nível limite da expressão do transgene é determinante para a ativação do mecanismo, ou qualitativo, onde ocorre a produção de um RNA aberrante que leva à ativação do mecanismo. Desta forma, análises de *Southern blot* devem ser conduzidas para determinar se existem diferenças no número de cópias do transgene inserido em linhagens resistentes e suscetíveis, e se esta diferença está ou não associada à ativação do mecanismo de resistência.

Os resultados de *Northern blot* confirmaram que o mecanismo de resistência envolvido é o silenciamento gênico pós-transcricional, e que este já se encontra ativado antes da inoculação. Na maioria dos exemplos de resistência via silenciamento gênico pós-transcricional, a resistência é uma característica constitutiva e as plantas transgênicas são resistentes em todos os estágios do desenvolvimento, mesmo antes a inoculação viral (BAULCOMBE, 1996). Entretanto, existem exemplos em que o mecanismo é ativado após a inoculação e o fenótipo é denominado recuperação (LINDBO et al., 1993).

Até o momento, o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Brasil vem sendo realizado em caráter preventivo, e uma vez se instalando a doença em um campo de produção nada pode ser feito para combatê-la (MELETTI e BRUCKNER, 2001). O presente trabalho, comprova que a resistência derivada do patógeno é uma alternativa viável para o controle dessa doença, que associada aos métodos de melhoramento convencional pode representar um grande avanço para o desenvolvimento de variedades comerciais resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, D. GOODMAN, R. M., GUTRELLA, M. GLASCOCK, C. WEYMANN, K., FRIEDRICH, L., MADDOX, D. AHLGOY, P., LUNTZ, T., WARD, E. RYALES, J. Increased tolerance to 2 omycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. **Proceeding National Academic Science USA**, v.909, p. 7327-7331, 1993.
- ANANDALAKSHMI, R., MARATHE, R., GE, X., HERR, J. M., MAU, C., MALLORY, A., PRUSS, G., BOWMAN, L., AND VANCE, V. B. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v. 290, p. 142-144, 2000.
- ATREYA, P. L., LOPEZMOYA, J. J., CHU, M. H., ATREYA, C. D., PIRONE, T. P. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amonoacids involved in potyvirus transmission by aphids. **Journal of General Virology**, v.76, p.265-270, 1995.
- AUDY, P. PALUKAITIS, P. SLACK, S. A., ZAITLIN, M. Replicase mediated resistance to potato virus Y in trasngenic plants. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 7, p. 15-22, 1994.
- BASS, B., L. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. **Cell**, v.101, p. 235-238, 2000.
- BAULCOMBE, D. C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. **The Plant Cell**, v. 8, p.1833-1844, 1996.
- BAULCOMBE, D. C., ENGLISH, J. J. Ectopic pairing of homologous and post-trasnscriptional gene silencing in transgenic plants. **Currents Opinions in Biotechnology**, v. 7, p. 173-180, 1996.
- BAULCOMBE, D. Unwinding RNA silencing. **Science**, v. 290, p. 1108-1109, 2000.

- BEACHY, R. N. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 215-220, 1997.
- BEACHY, R. N., Transgenic resistance to plant virus. **Semin. Virology**, v.4, p.327-416, 1993.
- BERGER, P. H., PIRONE, T. P. The effect of helper component on uptake and localization of potyvirus in *Myzus persicae*. **Virology**, v.153, p.256-261, 1986.
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A., HAMMOND, S., HANNON, G. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v.409, p. 295-296, 2001.
- BILLINGS, S., JELENKOVIC, G., CHIN, C. K. The effect of growth regulators and antibiotics on eggplant transformation. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 122, p.158-162, 1997.
- BLISKA, F.M., LEITE, R.S.S.F., GARCIA, A.E.B. Produção do maracujá no Brasil e sua comercialização nas principais centrais de abastecimento. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed). **Maracujá, produção e mercado**. Vitória da Conquista, BA: UESB, 1994. p. 206-222.
- BOS, L. Potyvirus, chaos or order ? **Archives of Virology** (Supplementum), v.5, p. 31-46, 1992.
- BRANTLEY, J. D., HUNT, A. G. The n-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus tobacco vein mottling virus is an RNA binding protein. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1157-1162, 1993.
- BRASILEIRO, A. C. M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCTP Notícias**, n.20, p.2-10, 1993.
- BRAZ, A. S. K. **Clonagem e sequenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um *Potyvirus* causador de endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 109p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- BREDERODE, F. T., TASCHENER, P. E. M., POSTHUMUS, E., BOL, J. F. Replicase mediated resistance to alfalfa mosaic virus. **Virology**, v.207, p.467-474, 1995.
- BRIGNETI, G., VOINNET, O., LI, W. X., JI, L. H., DING, S. W., BAULCOMBE, D. C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **EMBO Journal**, v. 17, p. 6739-6746, 1998.

- BROGLIE, K., CHET, I., HALLIDAY, M., CRESSMAN, R., BIDDLE, P., KNOWLTON, S., MAUVAIS, C.J., BROGLIE, R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. **Science**, v.245, p.1194-1197, 1991
- BRUCKNER, C. H., SILVA, M. M. Florescimento e frutificação. In: Bruckner, C. H., Picanço, M. C. (Ed.) **Maracujá tecnologia de produção, pós-colhita, agroindústria e mercado**, 2001. p. 51-68.
- CARMONA, M. J., MOLINA, A., FERNANDEZ, J. A., LOPEZ-FANDO, J. J., GARCIA-OLMEDO, F. Expression of the thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. **Plant Journal**, v. 3, p.457-462, 1993.
- CARRINGTON, J. C., FREED, D. D. Cap independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. **Journal of Virology**, v. 64, p. 1590-1597, 1990.
- CARRINGTON, J.C., FREED, D.D., OH, C.S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. **EMBO Journal**, v.9, p.1347-1353, 1990.
- CARRINGTON, J. C., FREED, D. D. SANDERS, T. C. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and *in vitro*. **Journal of Virology**, v. 63, p.4459-4463, 1989.
- CARRINGTON, J. C., KASSCHAU, K. D., MAHAJAN, S. K., SCHAAD, M. C. Cell-to-cell and long distance transport of virus in plants. **Plant Cell**, v.8 p.1669-1681, 1996.
- CARRINGTON, J. C., KRISTIN D. KASSCHAU, K. D., JOHANSEN, K. J. Activation and Supression of RNA Silencing by plant virus. **Virology**, v. 281, p.1-5, 2001.
- CARR, J. P., ZAITLIN, M. Resistance in transgenic tobacco plants expressing a nonstructural gene sequence of tobacco mosaic virus is a consequence of markedly reduced virus replication. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 4, p. 579-585, 1991.
- CATALANOTTO, C., AZZALIN, G., MACINO, G., COGONI, C: Gene silencing in worms and fungi. **Nature**, v. 404, p.245, 2000.
- CERUTTI, L., MIAN, N., BATEMAN, A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, p. 481-482, 2000.
- CHAGAS, C.M. Doenças viróticas e similares do maracujazeiro no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R., FERRREIRA, F.R., VAZ, R.L. (Coord.). **A cultura de maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 175-186.

- CHAGAS, C.M., REZENDE, J.A.M., COLARICCIO, A. Ocorrência do vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro (VEFM) no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, p.187-290, 1992.
- CHUANG, C., F., MEYEROWITZ, E., M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 97, p. 4985-4990, 2000.
- CLARK, M. F., ADAMS, A. N. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.34, p.475-483, 1977.
- COGONI, C., IRELAN, J. T., SCHUMACHER, M., SCHMIDHAUSER, T. J., SELKER, E. U., MACINO, G. Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. **EMBO Journal**, v. 15, p. 3153-3163, 1996.
- COGONI, C., MACINO, G: Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. **Nature**, v. 399, p.166-169, 1999.
- COGONI, C., MACINO, G. Post transcriptional gene silencing across kingdoms. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 10, p. 638-643, 2000.
- COOPER, B., LAPIDOT, M., HEICK, J. A., DODDS, J. A., BEACHY, R. N. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. **Virology**, v. 206, p. 307-313, 1995.
- COSTA, A.F. **Comportamento de *Passiflora* spp. diante do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e a relação entre a nutrição mineral e a interação vírus-*Passiflora edulis* f. *flavicarpa***. Viçosa, MG: UFV, 1996. 129p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- COSTA, A.F., SÃO JOSÉ, A.R., MUNIZ, M.F.S., CARVALHO, M.G. Ocorrência do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (VEFM) nos Estados de Minas Gerais e Alagoas. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.275-276, 1994.
- CRONIN, S., VERCHOT, J., HALDEMAN-CAHILL, R., SCHAAD, M. C., CARRINGTON, J. C. Long distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. **Plant Cell**, v. 7, p. 5449-559, 1995.
- DALMAY, T., HAMILTON, A., RUDD, S., ANGELL, S., BAULCOMBE, D. C. An RNA dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. **Cell**, v. 101, p. 543-553, 2000.

- DE CARVALHO NIEBEL, F., FREUDO, P., VAN MONTAGU, M., CORNELISSEN, M. Post-transcriptional cosuppression of beta-1,3-glucanase genes does not affect accumulation of transgene nuclear mRNA. **Plant Cell**, v. 7, p. 347-358, 1995.
- DEHIO, C., SCHELL, J. Identification of plant genetic loci involved in a post-transcriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 91, p. 5538-5542, 1994.
- DING, S. W. RNA silencing. **Currents Opinion in Biotechnology**, v.11, p.152-156, 2000.
- DOLJA, V.V., HALDEMAN-CAHILL, R., MONTGOMERY, A. E., VANDENBOSCH, K.A., CARRINGTON, J.C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. **Virology**, v.206, p.1007-1016, 1995.
- DOMIER, M., MORSE, D., KNIGHT, S., PORTEREIKO, M., BASS, B., MANGO, S. A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 289, p. 1928-1931, 2000.
- DOMIER, L. L., SHAW, J. G., RHODES, R. E. Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna, como, and caulomoviral proteins. **Virology**, v. 158, p. 20-27, 1997.
- EAGLES, R. M., BALMORIMELIAN, E., BECK, D. L., GARDNER, R.C., FROSTER, R. L. S. Characterization of NTPase, RNA binding and RNA helicase activities of cytoplasmic inclusion protein of tamarillo mosaic potyvirus. **European Journal of Biochemistry**, v. 224, p. 677-684, 1994.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K., TUSCHL, T. Duplex of 21 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, p. 494-498, 2001a.
- ELBASHIR, S. M., LENDECKEL, W. TUSCHEL, T. RNA interference is mediated by 21-22 nucleotide RNAs. **Genes Dev.**, v. 15, p. 188-200, 2001b.
- ELMAYAN, T., VAUCHERET, H: Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. **Plant Journal**, v. 9, p. 787-797, 1996.
- FAGARD, M., BOUTET, S., MOREL, J. B., BELLINI, C., VAUCHERET, H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. **Proceeding National Academic Science USA**, v.97, p. 11650-11654, 2000.
- FERNANDEZ, A., LAIN, S., GARCIA, J. A. RNA helicase activity of plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. **Nucleic Acid Research**, v. 23, p. 11327-1332, 1995.

- FINNEGAN, E. J., PEACOCK, W. J., DENNIS, E. S. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 93, p. 8449–8454, 1996.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E., MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.
- FITCHEN, J.H., BEACHY, R.N. Genetically engineered protection against virus in transgenic plants. **Annual Review of Microbiology**, v.47, p.739-763, 1993.
- FITZELL, R.D., PARES, R.D., MARTIN, A.B. **Woodiness and dieback diseases of passionfruit**. New South Wales, Department of Agriculture, 1985. 5p.
- FRENKEL, M.J., WARD, C.W., SHUKLA, D.D. The use of 3'-noncoding nucleotide sequence in the taxonomy of potyvirus: applications to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus. **Journal of General Virology**, v.70, p.2775-2783, 1989.
- FULTON, R.W. Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.67-81, 1986.
- GAMA, M.I.C.S. Identificação de Plantas Transgênicas por PCR. In: Brasileiro, A. C. M., Carneiro, V. T. C. (Eds.) **Manual de transformação genética de plantas**, 1998. p.179-189.
- GERLACH, W. L., LIEWELLYN, D., HASELOFF, J. Construction of a disease resistance gene using the satellite RNA of tobacco ringspot virus. **Nature**, v.328, p. 802-806, 1987.
- GIORGIA, R., BOSQUÊ, G. G., REZENDE, J. A. M., AMORIM, L., KITAJIMA, E. W. Incidência de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista – SP e danos causados pelo *Passionfruit woodiness vírus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.182-189, 2000.
- GOLEMBOSKI, D. B., LOMONOSSOFF, G. P., ZAITLIN, M. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. **Proceeding National Academic Science USA**, v.87, p.6311-6315, 1990.
- GRISHOK, A., TABARA, H., MELLO, C. C. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNA that control *C. elegans* developmental timing. **Cell**, v. 106, p. 23-24, 2001.
- GRISHOK, A., TABARA, H., MELLO, C. C. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. **Science**, v. 287, p. 2494-2497, 2000.

- HALDEMAN-CAHILL, R., DAROS, J. A., CARRINGTON, J. C. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. **Journal of Virology**, v. 72, p. 4072-4079, 1998.
- HAMILTON, A. J., BAULCOMBE, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v. 286, p. 950-952, 1999.
- HAMILTON, A. J., BROWN, S., HAN, Y. H., ISHIZUKA, M., LOWE, A., SOLIS, A. G. A., GRIERSON, D. A transgene with repeated DNA causes high frequency, post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato. **Plant Journal**, v. 15, p. 737-746, 1998.
- HAMMOND, J., KAMO, K. K. Effective resistance to potyvirus infection conferred by expression of antisense RNA in transgenic plants. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 5, p. 674-682, 1995.
- HAMMOND, S. M., BOETTCHER, S., CAUDY, A. A., KOBAYASHI, R., HANNON, G. J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. **Science**, v. 293, p. 1146-1150, 2001.
- HANDLEY, J. A., SMITH, G. R., DALE J., L., HARDING, R. M. Sequence diversity in NIb coding region of eight sugarcane mosaic potyvirus isolates infecting sugarcane in Australia. **Archives of Virology**, v.141, p.2289-2300, 1996.
- HARRISON, B. D., MAYO, M. A., BAULCOMBE, D. C. Virus resistance in transgenic plant that express cucumber mosaic virus satellite RNA. **Nature**, v. 328, p. 799-802, 1987.
- HEMENWAY, C. L., FANG, R. X., KANIEWSKI, W. K., CHUA, N. H., TUMER, N. E. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. **EMBO Journal**, v. 7, p. 1273-1280, 1988.
- HOLTORF, H., SCHOB, H., KUNZ, C., WALDVOGEL, R., MEINS, F. J. R. Stochastic and nonstochastic post-transcriptional silencing of chitinase and beta-1,3-glucanase genes involves increased RNA turnover - possible role for ribosome-independent RNA degradation. **Plant Cell**, v. 11, p. 471-484, 1999.
- HONG, Y., HUNT, A. G. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA dependent RNA polymerase. **Virology**, v. 226, p. 146-151, 1996.
- HONG, Y., SAUNDERS, K., HARTLEY, M. R., STANLEY, J. Resistance to geminivirus infection by virus induced expression of dianthin in transgenic plants. **Virology**, v. 192 ,p. 290-297, 1996.

- HUET, H., GAL-ON, A., MEIR, E., LECOQ, H., RACCAH, B. Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. **Journal of General Virology**, v.75, p. 1407-1414, 1994.
- HUTVAGNER, G. MCLACHLAN, J., PASQUINELLI, A. E., BALINT, E., TUSCHL, T., ZAMORE, P. D. A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. **Science**, v.293, p. 133-141, 2001.
- IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 1996.
- INGELBRECHT, I. L., IRVINE, J. E., MIRKOV, T. E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane: dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1187-1188, 1994.
- JACH, G., LOGEMANN, S., WOLF, G., OPPNHEIN, A., CHET, I., SCHELL, J. LOGEMANN, J. Expression of a bacterial chitinase leads to improved resistance of transgenic tobacco plants against fungal infection **Biopratic**, v.1, p.1-10, 1992.
- JACOBSEN, S., RUNNING, M., MEYEROWITZ, E. Disruption of an RNA helicase/RNaseIII gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. **Development**, v. 126, p. 5231-5243, 1999.
- JAN, F., FAGOAGA, C., PANG, S., GONSALVES, D. A minimum length of N gene sequence in transgenic plants is required for RNA mediated tospovirus resistance. **Journal of General Virology**, v.81, p.235-242, 2000
- JEDDELOH, J. A., STOKES, T. L. AND RICHARDS, E. J. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. **Nat. Genet.**, v.22, p. 94-97, 1999.
- JOHANSEN, I. E., KELLER, K. E., DOUGHERTY, W. G., HAMPTON, R. O. Biological and molecular properties of a pathotype P-1 and pathotype P-4 isolate of pea seed borne mosaic virus. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 1329-1333, 1996a.
- KASHIWASAKI, S., MINOBE, Y., HIBINO, H. Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA2. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 989-993, 1991.
- KASSCHAU, K. D., CARRINGTON, J. C. Requirement of HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. **Virology**, v. 209, p.268-273, 1998.

- KASSCHAU, K.D., CRONIN, S., CARRINGTON, J.C. Genome amplification and long distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component proteinase. **Virology**, v. 228, p.251-262, 1997.
- KETTING, R. F., HAVERKAMP, T. H., VAN LUENEN, H. G., PLASTERK, R. H. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. **Cell**, v.99, p. 133-141, 1999.
- KITAJIMA, E. W. CHAGAS, C. M. Problemas de virose ou etiologia micoplasmática na cultura do maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.393, 1984.
- KJEMTRUP, S., SAMPSON, K. S., PEELE, C. G., NGUYEN, L. V., CONKLING, M. A., THOMPSON, W. F., ROBERTSON, D. Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. **Plant Journal**, v. 14, p. 91-100, 1998.
- KNIGH, S. W., BASS, B. L. A role for RNase III enzyme DCR -1 in RNA interference and germline development in *C. elegans*. **Science**, v. 293, p.2269-2271, 2001.
- KOLLÀR, D., DALMAY, T., BURGYAN, J. Defective interfering RNA mediated resistance against cymbidium ringspot tobravirus in transgenic plants. **Virology**, v.193, p.313-318, 1993.
- KUMAGAI, M. H., DONSON, J., DELLA-CIOPPA, G., HARVEY, D., HANLEY, K., GRILLE, L. K. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 92, p.1679-1683, 1995.
- LAIN, S., MARTIN, M. T., RIECHMANN, J. L., GARCIA, J. A. Novel catalytic activity associated with positive strand RNA virus infection nucleic acid stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase like protein. **Journal of Virology**, v. 65, p. 1-6, 1991.
- LAIN, S., RIECHMANN, J. L., GARCIA, J. A. The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus. **Virus Research**, v. 13, p. 157-172, 1989a.
- LAIN, S., RIECHMANN, J. L., MARTIN, M. T., GARCIA, J. A. Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. **Gene**, v.82, p.357-362, 1989b.
- LANGENBERG, W. G., ZHANG, L. Immunocytochemistry shows the presence of tobacco etch virus P3 protein nuclear inclusions **Journal of Struct. Biol.**, v.118, p. 243-247, 1997.

- LAPIDOT, M. GAFNY, R., DING, B., WOLF, S., LUCAS, W. J. BEACHY, R. N. A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodemata and limits virus spread in transgenic plants. **Plant Journal**, v. 4, p. 959-970, 1993.
- LEGRAVE, T., MAIA, I. G., CASSE DELBART, F., BERNARDI, F., ROBAGLIA, C. Switches in the mode of transmission select for or against a poorly aphid transmissible strain of potato virus Y with reduced helper component and virus accumulation. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 1343-1347, 1996.
- LEITÃO FILHO, H.F., ARANHA, C. Botânica do maracujazeiro. In: *Simpósio da Cultura do Maracujá*, 1, 1971, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p. I-1 a I-13. (Mimeografado). 1974.
- LEWIN, B. The mystique of epigenetics. **Cell**, v. 93, p. 301-303, 1998.
- LI, W. X., DING, S. W. Viral suppressors of RNA silencing. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 12, p. 150-154, 2001.
- LI, X.H., VALDEZ, P., OLVERA, R.E., CARRINGTON, J.C. Function of the Tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase(NIa). **Journal of Virology**, v.71, p.1598-1607, 1997.
- LIMA, J. A. A., SANTOS, C. D. G., KITAJIMA, E. W. Isolamento de um potyvírus de plantas de maracujá com sintomas de mosaico. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, p.305, 1985.
- LINDBO, J. A., SILVA-ROSALES, L., PROEBSTING, W., M., DOUGHERTY, W.,G. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. **Plant Cell**, v. 5, p. 1749-1759, 1993.
- LOMONOSSOFF, G. P. Pathogen derived resistance to plant viruses. **Annual Review of Phytopatology**, v. 33, p. 323-343, 1995.
- LÓPEZ-MOYA, J. J., CANTO, T., DÍAZ-RUIZ, J. R., LÓPEZ-ABELLA D. Transmission by aphids of a naturally non-transmissible plum pox virus isolate with the aid of potato virus Y helper component. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 2293-3397, 1995.
- LORETO, T. J. G., VITAL, A. Viroses e micoplasmas do maracujá em Pernambuco. **Inf. SERDV**, v.4, p.23, 1983.
- LUCY, A. P., GUO, H. S., LI, W. X, DING, S. W. Suppression of post transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. **EMBO Journal**, v. 19, p.10437-10441, 2000.

- MALLORY, A., ELY, L., SMITH, T., MARATHE, R., ANANDALAKSHMI, R., FAGARD, M., VAUCHERET, H., PRUSS, G., BOWMAN, L., VANCE, V. HC-pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. **Plant Cell**, v. 13, p. 571-583, 2001.
- MALYSHENKO, S. I., KONDAKOVA, O. A., NAZAROVA, J. V., KAPLAN, I. B., TALIANSKY, M. E., ATABEKOV, J. G. Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non functional viral transport proteins. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1149-1156, 1993.
- MANDERS, G., OTONI, W. C., D'UTRA VAZ, F. B., BLACKHALL, N. W., POWER, J. B., DAVEY, M. R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa*) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.13, p.697-702, 1994.
- MATZKE, M., MATZKE, A., PRUSS, G., VANCE, V. RNA-based silencing strategies in plants. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.11, p.221-227, 2001.
- MCKERN, N.M., STRIKE, P.M., BARNETT, O.W., DIJKSTRA, J., SHUKLA, D.D., WARD, C.W. Cowpea aphid borne mosaic virus-Morocco and South African *Passiflora* virus are strains of the same potyvirus. **Archives of Virology**, v.136, p.207-217, 1994.
- MELETTI, L. M. M., BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético In Bruckner, C. H., Picanço, M. C. (Ed.) **Maracujá tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**, 2001. p. 345-385.
- METZLAFF, M., O'DELL, M., CLUSTER, P. D., FLAVELL, R. B. RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in *Petunia*. **Cell**, v. 88, p. 845-854, 1997.
- MOREL, J., MOURRAIN, P., BECLIN, C. VAUCHERET, H. DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. **Curr. Biol.**, v. 10, p. 1591-1594, 2000.
- MOURRAIN, P., BÉCLIN, C., ELMAYAN, T., FEUERBACH, F., GODON, C., MOREL, J. B., JOUETTE, D., LACOMBE, A. M., NIKIC, S., PICAULT, N. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. **Cell** 2000, 101:533-542. RNA encoded by transgenes. **Nat. Genet.**, v. 24, p. 180-183, 2000.
- MUELLER, E., GILBERT, J. E., DAVENPORT, G., BRIGNETI, G. BAULCOMBE, D. C. Homology dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology dependent gene silencing. **Plant Journal**, v. 7, p. 1001-1013, 1995.
- NADERI, M., BERGER, P. H. Effects of chloroplast targeted potato virus Y coat protein on transgenic plants. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v.50, p.67-83, 1997a.

- NADERI, M., BERGER, P. H. Pathogenesis related protein 1a is induced in potato virus Y infected plants as well as by coat protein targeted to chloroplasts. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 51, p. 41-44, 1997b.
- NAPOLI, C., LEMIEUX, C., JORGENSEN, R: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. **Plant Cell**, v. 2, p. 279-289, 1990.
- NICOLAS, O., LALIBERTE, J. F. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. **Journal of General Virology**, v.73, p. 2785-2793, 1992.
- NOVAES, Q. S., REZENDE, J. A. M. Problemas no controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro utilizando estirpes fracas do *Passion Fruit woodiness virus* (PWV). **Fitopatologia Brasileira**, v. 26 (suplemento), p.519, 2001.
- OKANO, R. M. C., VIEIRA, M. F., Morfologia externa e taxonomia. In: BRUCKNER, C. H., PIKANÇO, M. C. (Eds.) **Maracujá tecnologia de produção, pós-colhita, agroindústria e mercado**, 2001. p. 33-49.
- OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.) **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p.218-246.
- PALAUQUI, J. C., ELMAYAN, T., POLLIEN, J. M., VAUCHERET, H. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. **EMBO Journal**, v. 16, p. 4738-4745, 1997.
- PARES, R.D., MARTIN, A.B. Passionfruit woodiness virus in New South Wales. **Plant Disease Survey**, v.83, p.22-23, 1984.
- PLOCHOCKA, D. WELNICKI, M., ZIELENKIEWICZ, P., OSTOJA ZAGORSKI, W. Three-dimensional model of the potyviral genome-linked protein. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 93, p.121590-12154, 1996.
- POWELL, P. A., STARK, D. M., SANDERS, P. R., BEACHY, R. N. Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 86, p. 6949-952, 1989.
- POWELL-ABEL, P., NELSON, R.S., DE, B., HOFFMANN, N., ROGERS, S.G. Delay of disease development in transgenic plants expressing the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, v.232, p.738-743, 1986.

- QUE, Q., WANG, H. Y., ENGLISH, J. J., JORGENSEN, R. A. The frequency and degree of co-suppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. **Plant Cell**, v. 9, p.1357-1368, 1997.
- RATCLIFF, F., MARTIN-HERNANDEZ, A., BAULCOMBE, D. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. **Plant Journal**, v.25, p. 237-245, 2001.
- REGISTER III, J. C., BEACHY, R. N. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. **Virology**, v. 166, p.524-532, 1988.
- RIECHMANN, J. L., LAIN, S., GARCIA, J. A. Identification of the initiation codon of plum pox potyvirus genomic RNA. **Virology**, v. 185, p. 544-552, 1991.
- RIECHMANN, J. L., LAIN, S., GARCIA, J. A. The genome linked protein and 5'end RNA sequence of plum pox potyvirus. **Journal of General Virology**, v.70, p.2785-2789, 1989.
- ROBAGLIA, C. DURAND-TARDIF, M., BOUDAZIN, G. ASTIER-MANIFACIER, S., CASSE-DELBART, F. Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 935-947, 1989.
- RODRIGUEZ CEREZO, E., SHAW, J. G. Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus infected cells. **Virology**, v. 185, p. 572-579, 1991.
- RODRIGUEZ CEREZO, E., AMMAR, E. D., PIRONE, T. P., SHAW, J. G. Association of the non structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus infected cells. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1945-1949, 1993.
- ROJAS, M. R., ZERBINI, F. M., ALLISON, R. F., GILBERTSON, R. L., LUCAS, W. J. Capsid protein and helper component proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. **Virology**, v. 237, p. 283-295, 1997.
- ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: Brasileiro, A. C. M., Carneiro, V. T. C. (Eds.) **Manual de transformação genética de plantas**, 1998. p.163-177.
- ROMANO, N., MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 3343-3353, 1992.
- RUIZ, M. T., VOINNET, O., BAULCOMBE, D. C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **Plant Cell**, v. 6, p. 937-946, 1998.
- SALOMÃO, T.A., ANDRADE, V.M.M. Botânica. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p.20-39.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- SANFORD, J. C., JOHNSTON, S. A. The concept of parasite-derived resistance-Deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal Theoretical Biology**, v. 113, p. 395-405, 1985.
- SCHWEIZER, P., POKORNY, J., SCHULZE-LEFER, P., DUDLER, R. Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. **Plant Journal**, v. 24, p. 895-903, 2000.
- SHI, X. M., MILLER, H., VERCHOT, J., CARRINGTON, J. C., VANCE, V. B. Mutations in the region encoding the central domain of helper component protease (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. **Virology**, v. 231, p. 35-42, 1997.
- SHUKLA, D. D., FRENKEL, M. J., WARD, C. W. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.13, p.178-191, 1991
- SHUKLA, D.D., WARD, C.W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. **Journal of General Virology**, v.69, p.2703-2710, 1988.
- SHUKLA, D.D., WARD, C.W., BRUNT, A.A. **The Potyviridae**. CAB International Wallingford, U.K. 1994. 516 p.
- SHUKLA, D. D., WARD, C. W. Identification and Classification of potyviruses on the basis of the coat protein sequence data and serology. **Archives in Virus Research**, v.36, p.273-314, 1989a.
- SHUKLA, D. D., WARD, C. W. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. **Adv. Virus Research**, v.36, p.273-314, 1989b.
- SIJEN, T., WELLINK, J., HENDRIKS, J., VERVER, J., VAN KAMMEN, A. Replication of cowpea mosaic virus RNA1 RNA2 is specifically blocked in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing the full length replicase or movement protein genes. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 8, p.340-347, 1995.
- SIMMONDS, J. H. Mild strain as a means of reducing losses from the Queensland woodiness virus in the passion vine. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Science**, v.16, p.371-380, 1959.
- SÍMON BUELA, L., GUO, H. S., GARCIA, J. A. Cap independent leaky scanning as the mechanism of translation initiation of plant viral genomic RNA. **Journal of General Virology**, v.78, p.2691-2699, 1997a.

- SÍMON BUELA, L., GUO, H. S., GARCIA, J. A. Long sequence in the 5'noncoding region of plum pox virus is not necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. **Virology**, v.233, p.157-162, 1997b.
- SMARDON A., SPOERKE J. M., STACEY, S. C., KLEIN, M. E., MACKIN, N., MAINE, E. M. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. **Curr. Biol.**, v.10, p. 169-178, 2000.
- SMITH, C. J. S., WATSON, C. F., BIRD, C. R., RAY, J., SCHUCH, W., GRIERSON, D. Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. **Mol. Gen. Genet.**, v. 224, p. 477-481, 1990.
- SMITH, H. A., SWANEY, S. L., PARKS, T. D., WERNSMAN, E, A., DOUGHERTY, W. G. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: Expression, regulation and fate of nonessential RNAs. **Plant Cell**, v. 6, p. 1441-1453, 1994.
- SONODA, S., MORI, M., NISHIGUCHI, M., Homology-dependent virus resistance in transgenic plants with the coat protein gene of sweet potato feathery mottle potyvirus: target specificity and transgene methylation. **Phytopathology**, v. 89, p.385-391, 1999.
- SOUMOUNOU, Y., LALIBERTE, J. F. Nucleic acid binding properties of the P1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in *Escherichia coli*. **Journal of General Virology**, v.75, p.2567-2573, 1994.
- STANLEY, J., FRISCHMUTH, T., ELLWOOD, S. Defective viral DNA ameliorates symptoms of geminivirus infection in transgenic plants. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 87, p. 6291-6295, 1990.
- STEIMER, A., AMEDEO, P., AFSAR, K., FRANSZ, P., MITTELSTEN SCHEID, O., PASKOWSKI, J. Endogenous targets of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 12, p. 1165-1178, 2000.
- TABARA, H., SARKISSIAN, M., KELLY, W. G, FLEENOR, J, GRISHOK, A., TIMMONS, L., FIRE, A., MELLO, C. C: The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. **Cell**, v. 99, p.123-132, 1999.
- TAVERNARAKIS N, WANG SL, DOROVKOV M, RYAZANOV A, DRISCOLL M. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. **Nat. Genet.**, v. 24, p. 180-183, 2000.
- TIMMONS, L., COURT, D. L., FIRE, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNA can produce specific and potent genetic interference in *C. elegans* **Gene**, v. 263, p. 103-112, 2001.

- VAN BLOKLAND, R., VAN DER GEEST, N., MOL, J. N. M., KOOTER, J. M. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. **Plant Journal**, v.6, p. 861-877, 1994.
- VAN DER KROL, A. R., MUR, L.A., BELD, M., MOL, J. N. M., STUITJE, A. R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **Plant Cell**, v. 2, p.291-299, 1990.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V., BISHOP, D. H. L., FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANILOFF, J., CALISHER, C. H. Guidelines to the demarcation of virus species. **Archives of Virology**, v. 142, p. 1505-1518, 1997.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V., BURCKARD, J. Detection of a wide spectrum of tobacco mosaic virus strains by indirect Enzyme-linked immunosorbent assays. **Virology**, v.106, p.327-334, 1989.
- VANCE V., VAUCHERET, H. RNA Silencing in plants – defense and counterdefense. **Science**, v. 292, p. 2277-2280, 2001.
- VANCE, V. B., BERGER, P. H., CARRINGTON, J. C., HUNT, A. G., SHI, X. M. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergism disease in transgenic tobacco. **Virology**, v. 206, p. 583-590, 1995.
- VAUCHERET, H., BÉCLIN, C., FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, v.144, p.3083-3091, 2001.
- VERCHOT, J., KOONIN, E. V., CARRINGTON, J. C. The 35kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as the third viral-encoded proteinase. **Virology**, v. 190, p. 527-535, 1991.
- VOINNET, O., LEDERER, C., BAULCOMBE, D. C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. **Cell**, v. 103, p. 157-167, 2000.
- VONGS, A., KAKUTANI, T., MARTIENSSEN, R. A., RICHARDS, E. J. *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. **Science**, v.260, p.1926-1928, 1993.
- WATERHOUSE, P. M., GRAHAM, M. W., WANG, M. B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 95, p. 13959-13964, 1998.
- WILSON, T. M. A. Strategies to protect crop plants against virus: Pathogen-derived resistance blossoms. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 90 p. 3134-3141, 1993.

- WITTMANN, S., CHATEL, H., FORTIN, M. G., LALIBERTE, J. F. Interaction of the viral protein genome linked [proteinase] of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. **Virology**, v.234, p.84-92, 1997.
- WU-SCHARF, D., JEONG, B., ZHANG, C., CERUTTI, H. Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. **Science**, v. 290, p. 1159-1162, 2000.
- YAMASHIRO, T., CHAGAS, C.M. Ocorrência de grave moléstia virótica em maracujá-amarelo no estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p. 915-917, 1979.
- YEPES, L. M., FUCHS, M. SLIGHTOM, J. L., GONSALVES, D. Sense and antisense coat protein constructs confer high levels of resistance to tomato ringspot nepovirus in transgenic *Nicotiana* species. **Phytopathology**, v. 86, p. 417-424, 1996.
- YUSIBOV V. LOESCH-FRIES, L. S. High-affinity RNA-binding domains of alfafa mosaic virus coat protein are not requeried for coat protein-mediated resistance. **Proceeding National Academic Science USA**,. v.92 p.1-5, 1995.
- ZAITLIN, M. ANDERSON, J. M. PERRY, K. L., ZHANG, L., PALUKATIS, P. Specificity of replicase medited resistance to cucumber mosaic virus. **Virology**, v.201, p. 200-205, 1994.
- ZAMORE, P. D., TUSCHL, T., SHARP, P. A., BARTEL, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. **Cell**, v. 101, p.25-33, 2000.
- ZERBINI F. M., ZAMBOLIM E. M. A família *Potyviridae* – Parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.7, p. 1-66, 1999.
- ZETTLER, F. W. Designation of potyvirus genera - a question of perspective and timing. **Archives of Virology** (Supplementum), v.5, p.235-237, 1992.