

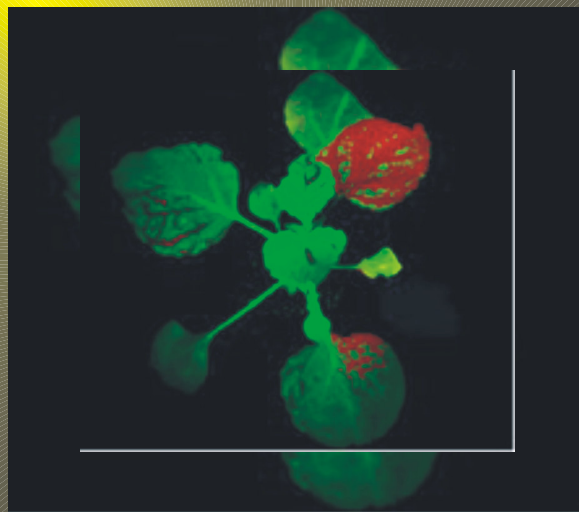
Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Documentos

ISSN 0103 - 0205
Novembro, 2003

107

**Estratégias para obtenção de resistência
a viroses vegetais**



Embrapa

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
Alexandre Kalil Pires
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena Tanajura Luz Barbosa
Diretores Executivos

Embrapa Algodão

Eleusio Curvelo Freire
Chefe Geral

Alderí Emídio de Araújo
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Gomes de Souza
Chefe Adjunto de Administração

Odilon Reny Ribeiro Ferreira da Silva
Chefe Adjunto de Comunicação, Negócio e Apoio



ISSN 0103-0205
Novembro, 2003

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos, 107

Estratégias para Obtenção de Resistência a Vírus Vegetais

Márcia Soares Vidal

**Campina Grande, PB
2003**

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 315-4300
Fax: (83) 315-4367
algodao@cnpa.embrapa.br
http://www.cnpa.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho
Secretária: Nívia Marta Soares Gomes
Membros: Demóstenes Marcos Pedrosa de Azevedo
José Wellington dos Santos
Lúcia Helena Avelino Araújo
Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega
Maria Auxiliadora Lemos Barros
Maria José da Silva e Luz
Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Rosa Maria Mendes Freire

Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes
Revisão de Texto: Márcia Soares Vidal
Tratamento das ilustrações: Maria do Socorro Alves de Sousa
Foto da capa:
Padronização Eletrônica dos Originais: Márcia Soares Vidal
Editoração Eletrônica: Maria do Socorro Alves de Sousa

1ª Edição

1ª impressão (2003) 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

EMBRAPA ALGODAO (Campina Grande, PB).

Estratégias para obtenção de resistência a viroses vegetais, por Márcia Soares Vidal.
Campina Grande, 2003.

26p. (Embrapa Algodão. Documentos, 107).

1. Agricultura - Doenças. 2. Vírus - Vegetais. I. Vidal, M.S. II. Título. III. Série.

CDD 632.3

©Embrapa 2003

Autora

Márcia Soares Vidal
Dr^a., Bióloga da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143
Centenário Caixa Postal 174 58107-720- Campina Grande, PB
Tel.: 0xx83-315-4300
e-mail mvidal@cnpa.embrapa.br

Apresentação

Os vírus são importantes patógenos de plantas, responsáveis por grandes perdas na produção das culturas. O entendimento das bases bioquímicas de sua replicação nas plantas, o sequenciamento de genomas virais e outros estudos semelhantes foram muito importantes para a obtenção de resistência de plantas a viroses. Este documento descreve alguns destes aspectos teóricos e será de utilidade para os que desejarem conhecer parte destes fundamentos.

Luiz Paulo de Carvalho
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Sumário

Estratégias para Obtenção de Resistência a Víruses	
Vegetais.....	11
1. Vírus Vegetais.....	11
2. Mecanismos de Proteção a Vírus.....	12
2.1. Proteção cruzada	12
2.2. Resistência derivada do patógeno	13
2.2.1. Resistência mediada pela replicase	14
2.2.1.1. Resistência mediada pelo RNA/silenciamento gênico	15
2.2.1.1.1. Silenciamento gênico pós-transcricional	16
3. Conclusão.....	19
4. Referências Bibliográficas.....	19

Estratégias para Obtenção de Resistência a Víruses Vegetais

Márcia Soares Vidal

1. Vírus Vegetais

As doenças vegetais são responsáveis por enormes perdas na economia mundial sendo que, de modo geral, os maiores prejuízos são provocados por fungos e vírus (MATTEWS, 1991).

Os vírus vegetais constituem um grupo complexo de fitopatógenos, normalmente nomeados de acordo com os sintomas desenvolvidos na planta hospedeira. Os vírus são divididos em dois grandes blocos, tendo em vista a composição do seu material genético: 1) os que possuem o genoma composto por moléculas de ácido ribonucléico (RNA); 2) aqueles cujo genoma é composto por moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) (MATTEWS, 1991).

Embora apresentem diferenças em seus genomas, todos os vírus vegetais precisam efetuar duas etapas fundamentais para o estabelecimento da infecção sistêmica em seus hospedeiros. A primeira etapa consiste na sua replicação dentro das células primariamente infectadas. Esta etapa pode ser efetuada de vários modos dependendo do vírus em questão, porém, na maioria dos casos, necessita de pelo menos uma proteína codificada por seu genoma, a polimerase viral, assim como de fatores do hospedeiro (WITTMAN et al., 1997; OSMAN e BUCK, 1997). Em alguns casos, outras proteínas virais são também necessárias como: proteína do capsídeo, VPg (Viral Genome-linked Protein), entre outras (HOUWING e JASPARS,

1993). A segunda etapa necessária para o estabelecimento da infecção é o movimento do vírus de célula a célula, até atingir o sistema vascular, responsável pela dispersão do vírus por toda a planta. Uma das proteínas envolvidas no movimento célula a célula é a proteína do movimento.

O entendimento de como os vírus vegetais se replicam nas plantas cresceu nos últimos anos por conta do seqüenciamento do genoma viral e da análise da seqüência de aminoácidos, deduzida a partir deste seqüenciamento. Este avanço foi crucial, pois possibilitou, com o desenvolvimento de novas tecnologias de manipulação do DNA, a clonagem dos genes virais, seu estudo em sistemas de transcrição e tradução *in vitro*, assim como a produção de transcritos infecciosos, empregados nos estudos de replicação viral *in vivo* utilizando-se protoplastos ou plantas hospedeiras. A produção de plantas transgênicas contendo seqüências virais também abriu novos caminhos para o estudo da replicação viral *in vivo*, visto que nas células dessas plantas transgênicas o produto de um gene viral estaria sendo expresso, e com isso, as etapas do ciclo replicativo poderiam ser analisadas, assim como as proteínas que estariam sendo necessárias para a replicação (MATTEWS, 1991).

2. Mecanismos de Proteção a Vírus

Doenças causadas por vírus têm enorme impacto negativo na produção agrícola de todo o mundo e, conseqüentemente, vários esforços têm sido empregados no seu controle, assim como na identificação de viroses e de seus agentes causadores. Técnicas clássicas como quarentena, erradicação, rotação de culturas e sementes/plantas certificadas livre de vírus, são ferramentas ainda muito utilizadas e que apresentam algumas desvantagens por serem dispendiosas e perderem a efetividade ao longo dos anos (SCHOLTHOF et al., 1993).

2.1. Proteção Cruzada

Em 1929, McKinney demonstrou que plantas de tabaco poderiam ser protegidas contra a infecção provocada por uma estirpe severa do *Tobacco mosaic virus* (TMV - Gênero *Tobavirus*), desde que tivessem sido previamente tratadas com uma estirpe branda do mesmo vírus. Este tipo de

proteção, conhecida como proteção cruzada, pode ser facilmente demonstrada se a estirpe protetora produzir sintomas brandos ao longo de toda a planta e, também, se a estirpe severa for virulenta e capaz de produzir lesões necróticas. Em plantas cuja proteção ao vírus brando foi observada, as lesões geradas pela infecção com a estirpe virulenta muitas vezes estão ausentes ou em menor número, e o tamanho verificado das lesões é menor, quando comparadas com as produzidas pelo vírus severo em plantas não protegidas. (VALLE et al., 1988).

A estratégia de proteção cruzada foi empregada em diversos países em culturas de importância econômica, como: tomate, cítricos, mamão e pimenta (YEH et al., 1984), além de ser usada para proteção de culturas em que nenhum outro mecanismo de resistência esteja disponível (FULTON, 1986). Esta mesma estratégia, no entanto, pode apresentar alguns inconvenientes como: o efeito sinérgico da estirpe viral branda com outros vírus não relacionados; a mudança da estirpe protetora para estirpe severa, através de mutações; além de suplantarem a proteção pela estirpe virulenta ao longo do tempo (COSTA e MULLER, 1980; FULTON, 1986; NEJIDAT et al., 1990; BUCK, 1991).

2.2. Resistência Derivada do Patógeno

Com o desenvolvimento da engenharia genética surgiram novas possibilidades para o controle da infecção viral. É o caso da produção de plantas transgênicas resistentes a vírus que mimetizam vias de resistência existentes na natureza (BUCK, 1991).

Com base nas hipóteses levantadas para explicar os resultados obtidos na proteção cruzada e nos avanços na área de biologia molecular até aquele momento, Sanford e Johnston (1985) propuseram que a expressão de certos genes de um patógeno, neste caso um vírus, em um hospedeiro levaria a uma alteração no equilíbrio entre os componentes virais, resultando numa interferência no ciclo viral. Várias seriam as vantagens do emprego desta tecnologia para obtenção de plantas resistentes a vírus, dentre as quais se destacam os fatos de que os genes virais são mais fáceis de serem isolados que os genes vegetais; a resistência pode ser

relativamente mais estável pois, ao contrário dos genes de resistência isolados de plantas, genes virais são monogenéticos e, finalmente, a expressão de tais genes provavelmente deve ter um impacto mínimo na planta (BUCK, 1991). Diversos trabalhos foram realizados tendo-se como base o conceito de resistência derivada do patógeno, onde o primeiro fragmento de genoma viral a ser empregado na obtenção de resistência derivada do patógeno foi o gene da proteína do capsídeo viral do TMV (ABEL et al., 1986).

A resistência mediada pelo patógeno (RDP) pode ser obtida por diversas estratégias e diferir consideravelmente de espectro, implicando na presença de diversos mecanismos moleculares que expliquem os vários casos de PDR. Evidências sugerem a existência de dois tipos de resistência: a que necessita da produção da proteína do transgene, que se enquadra na conhecida proteção mediada pela proteína, e a que carece somente da presença de seqüências de ácidos nucléicos virais, sendo chamada de proteção mediada pelo RNA. Ao passo que a proteção mediada pela proteína confere moderada resistência a uma série de estirpes virais, a mediada pelo RNA se mostra estirpe específica, porém o nível de resistência verificado nessas plantas é muito maior, podendo chegar à imunidade (BEACHY, 1997).

Extensos estudos sobre proteção mediada pela proteína do capsídeo foram realizados, concluindo-se que esta ocorria por meio da inibição da desencapsidação viral nas primeiras células infectadas, e que era quebrada pelo emprego de RNAs virais como fonte de inóculo (REGISTER e BEACHY, 1988; CLARK et al., 1995).

Embora existam vários dados consistentes com a hipótese da inibição da desencapsidação ser a responsável pela resistência mediada pela proteína do capsídeo (RMPC), outras publicações não descartam a possibilidade de que estágios tardios no ciclo de infecção viral, como o movimento sistêmico, também possam ser suprimidos e, assim, influenciar na CPMP (WISNIEWSKI et al., 1990; SAITO et al., 1990).

2.2.1. Resistência Mediada pela Replicase

A inibição da síntese, ou função dos genes que codificam as replicases

virais, é uma estratégia que vem sendo muito empregada e, sob determinadas circunstâncias, gera uma forte resistência a infecção por vírus de plantas homólogos ou relacionados (HULL e DAVIES, 1992; BAULCOMBE, 1994a).

A transformação de plantas com seqüências não estruturais do genoma viral, como a da replicase viral, deu origem a enorme variedade de fenótipos. Frequentemente, as plantas transgênicas apresentam-se altamente resistentes à infecção viral, porém, se pode verificar a presença de plantas não só sensíveis como, também, capazes de complementar vírus mutantes defectivos para tal gene (BAULCOMBE, 1994b; LOMONOSSOFF, 1995). Alguns trabalhos nos quais foi utilizada a replicase viral para obtenção de plantas transgênicas resistentes, relatam que a proteína em si, mutada ou não, atua diretamente na resistência, seja por competir com a replicase tipo selvagem ou por bloquear a ligação de fatores importantes para a replicação (ZAITLIN et al., 1994). Outros autores, no entanto, associam a resistência obtida pela replicase com a resistência obtida pelo RNA, uma vez que não foi possível a detecção da proteína e, normalmente, foi verificada uma razão inversa entre o nível de expressão do transgene e a resistência obtida (RUBINO e RUSSO, 1995; MUELLER et al., 1995).

2.2.1.1. Resistência Mediada pelo RNA/Silenciamento Gênico

Vários exemplos de resistência derivada do patógeno, em que a inibição direta do ciclo de infecção viral ocorre pelo transgene em si, ou pelo seu transcrito, vêm sendo descritos. Este tipo de resistência a vírus poderia ser explicado caso o mRNA transgênico atuasse como molécula chamariz, competindo de alguma forma com o RNA genômico viral, por proteínas codificadas pelo hospedeiro ou pelo próprio vírus, abolindo assim a replicação ou o espalhamento viral na planta infectada (HARRISON et al., 1987; ZACCOMER et al., 1993; BAULCOMBE, 1996a). Outros trabalhos de resistência a vírus relacionam a resistência mediada pelo transgene, também conhecida como resistência mediada pelo RNA, com o fenômeno celular conhecido como silenciamento gênico (BAULCOMBE, 1994; DOUGHERTY et al., 1994; MUELLER et al., 1995; ENGLISH et al., 1996; PRINS e GOLDBACH, 1996).

O silenciamento gênico dependente de homologia, também conhecido como co-supressão, descreve a inibição da expressão de um gene endógeno pela introdução de um transgene homólogo ao endógeno. Evidências sugerem que pelo menos dois mecanismos possam explicar este fenômeno. O primeiro seria o silenciamento atuando na transcrição, que geralmente está envolvido com a metilação da região promotora do transgene, levando a uma perda na atividade de transcrição (MATZKE e MATZKE, 1993; MEYER et al., 1993; PARK et al., 1996). No segundo, o silenciamento ocorre atuando no processo pós-transcricional (DE CARVALHO NIEBEL et al., 1995; ELMAYAN e VAUCHERT, 1996; ENGLISH et al., 1996; FAGARD et al., 2000).

2.2.1.1.1. Silenciamento Gênico Pós-Transcricional

O silenciamento gênico pós-transcricional é um termo que vem sendo usado para descrever uma série de fenômenos caracterizados por uma alta atividade de transcrição e baixos níveis do RNA mensageiro transgênico e da proteína no citoplasma, uma vez que tal fenômeno se encontra baseado na degradação específica do RNA que ocorre no citoplasma (WATERHOUSE et al., 2001a, WATERHOUSE et al., 2001b). O fenômeno de silenciamento gênico pós-transcricional foi descoberto por acidente, em organismos transgênicos em que, ao serem infectados por vírus ou mesmo quando tratados com RNA externos (exógenos), não se verificava o acúmulo do mRNA transgênico. Um dos primeiros casos de silenciamento pós-transcricional foi descrito por Van der Krol et al. (1990) e Napoli et al. (1990), na época nomeado pelos autores como co-supressão em que, por consequência da introdução de cópias adicionais do gene da chalcona sintase (*chs*), envolvido na pigmentação de flores de *Petunia hybrida*, o mecanismo de silenciamento foi desencadeado. Alguns anos mais tarde, Romano e Macino (1992) descreveram um fenômeno observado em fungos filamentosos da espécie *Neurospora crassa*, relacionado ao de co-supressão, sendo este fenômeno conhecido como "Quelling". Desde então, vários outros autores relatam casos de silenciamento gênico pós-transcricional em diversos organismos, desde fungos até animais (VAUCHERET et al., 1998; FIRE, 1999; GRANT, 1999; KOOTER et al., 1999; DING, 2000; MATZKE et al., 2001). A descoberta de que vírus podiam desencadear silenciamento gênico pós-transcricional em plantas

(VAN KAMMEN, 1997; RUIZ et al., 1998) originou a hipótese de que este mecanismo de silenciamento gênico fosse um mecanismo de defesa da planta contra a infecção por vírus. Tal hipótese foi levantada tendo por base três fatos observados: um deles foi o de que plantas transgênicas que apresentavam o fenótipo de "recovery", ou seja, num primeiro momento são plantas que apresentam os sintomas típicos de infecção viral, tanto nas folhas inoculadas quanto nas não inoculadas, mas que, no decorrer do tempo, a planta passa a não apresentar mais os sintomas virais, nem as proteínas. Deste modo, diz-se que a planta se tornou resistente ao vírus; alguns autores ainda mencionam que tal planta passa a ser resistente à infecção por outros vírus que apresentem alta homologia com o vírus que induziu a resistência (SWANEY et al., 1995; GUO et al., 1997; PALAUQUI et al., 1997). Outra evidência foi a observação de que pequenas moléculas de RNA, presentes em todos os sistemas onde o silenciamento gênico pós-transcricional está ativo, estão também presentes em plantas não transgênicas infectadas por vírus. Deste modo os vírus seriam tanto indutores quanto alvos do silenciamento, sendo tal fenômeno conhecido como silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) (RUIZ et al., 1998). Outro fato que ajudou a formulação desta hipótese foi à descoberta de que alguns vírus vegetais codificam proteínas capazes de inibir o silenciamento gênico pós-transcricional como, por exemplo: HcPro (Potivírus), 2b (Cucumovírus) e p25 (Potivírus) (BECLIN et al., 1998; BRIGNETI et al., 1998; ANANDALAKSHMI et al., 1998 e 2000; VOINET et al., 1999, 2000; MALLORY et al., 2001).

O silenciamento gênico pós-transcricional, como já relatado, é um mecanismo de degradação seqüência específica, podendo ser dividido em 3 etapas básicas: indução, dispersão e manutenção. A indução do silenciamento gênico pós-transcricional pode se dar pela presença de transgenes, vírus, pela introdução de moléculas de DNA por bombardeamento ou por agro-infiltração ou, ainda, por enxertia entre plantas silenciadas e não silenciadas (PALAUQUI et al., 1997; VAUCHERET et al., 1998; RUIZ et al., 1998; FIRE et al., 1998; NGO et al., 1998; WARGELIUS et al., 1999; MISQUITTA et al., 1999; WIANNY e ZERNICKA-GOETZ, 2000). O silenciamento gênico pós-transcricional parece ser desencadeado localmente por moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA), mas é capaz de se espalhar desses pontos até outros tecidos.

Parece que tal espalhamento não se dá por uma via metabólica e, sim, através de um sinal difusível específico de determinada seqüência gênica, que é capaz de transpor as barreiras celulares via plasmodesma, ou pelo sistema vascular (floema) (PALAUQUI et al., 1997; MONTGOMERY et al., 1998; WATERHOUSE et al., 1998; SHARP, 1999; BASS, 2000).

Diversos trabalhos realizados mostram que o silenciamento gênico é acompanhado por um acúmulo de pequenas moléculas de RNA (21 a 25 nucleotídeos), que, por muito tempo, pensou-se ser o sinal sistêmico do silenciamento gênico pós-transcricional, mas recentes estudos desqualificam esta hipótese (VOINNET et al., 2000; MALLORY et al., 2001; WATERHOUSE et al., 2001).

O silenciamento gênico pós-transcricional está, na maioria das vezes, associado à metilação de citosinas na seqüência codificante do transgene (WASSENEGGER e PÉLISSIER, 1998; KOOTER et al., 1999). A metilação poderia estar envolvida numa alteração estrutural, levando a transcrição de RNAs aberrantes, ao invés de inibir a transcrição (GRIERSON et al., 1986; INGELBRECHT et al., 1994; SMITH et al., 1994; ENGLISH et al., 1996; SIJEN et al., 1996; JONES et al., 1998). Não existe uma indicação clara, se há uma função ou se tal fato somente seja um evento casual relacionando a metilação do DNA e o silenciamento gênico pós-transcricional, uma vez que em certos organismos seu papel não é fundamental, como pode ser observado em *Drosophila*, em que não se verifica a metilação de seu DNA nos casos de silenciamento gênico (KOOTER et al., 1999). Foi proposto, no entanto, que a metilação poderia estar envolvida na amplificação e na manutenção do silenciamento gênico pós-transcricional em plantas (BAULCOMBE, 1996b; JONES et al., 1999; DALMAY et al., 2000).

Em algumas plantas, seqüências transgênicas inseridas em repetições diretas ou invertidas podem levar ao silenciamento tanto do transgene quanto do gene homólogo (MATZKE e MATZKE, 1995; STAM et al. 1997a; WANG e WATERHOUSE, 2000). Frequentemente, o fenômeno de silenciamento apresenta uma relação com o número de cópias do transgene inseridos no genoma (dosagem) cujas plantas em homozigose ou carregando múltiplas cópias do transgene, podem apresentar o fenótipo de silenciamento,

enquanto plantas heterozigotas para o transgene não se apresentam silenciadas (PALAUQUI e VAUCHERET, 1995). Além disso, o local de integração do transgene é também um fator importante para o estabelecimento do silenciamento, visto que alterações na estrutura da cromatina podem induzir a hipermetilação, e, conseqüentemente, inibir sua transcrição (MEYER et al., 1993; PARK et al., 1996; MOREL et al. 2000).

3. Conclusão

Os vegetais são organismos que não podem se mover e, deste modo, acabam por ficar à mercê de seus patógenos, sejam eles fungos, bactérias, nematódeos ou vírus. Assim, diversas estratégias foram e vêm sendo desenvolvidas para se obter resistência, dentre as quais a derivada do patógeno, muito utilizada para resistência a viroses vegetais. Esta metodologia gerou uma série de plantas resistentes e, em alguns casos, o mecanismo de resistência foi relacionado ao fenômeno de silenciamento gênico pós-transcricional. O silenciamento gênico foi, no início, encarado como um entrave à introdução de genes, via transformação genética vegetal. Atualmente, no entanto, está ficando claro que este fenômeno é um mecanismo natural desencadeado pelas plantas, numa tentativa de se adaptarem ao estresse biótico sofrido (infecção por vírus, por exemplo). Assim sendo, o entendimento do mecanismo de silenciamento gênico vai nos possibilitar o emprego racional desta metodologia para a obtenção de resistência não só em plantas tidas como modelo de estudo como, também, para espécies vegetais que apresentem interesse econômico.

4. Referências Bibliográficas

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

ANANDALAKSHMI, R.; PRUSS, G.J.; XIN, G.; MARATHE, R.; MALLORY, A.C.; SMITH, T.H.; VANCE, V.B. A viral supressor of gene silencing in

plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 13079-13084, 1998.

ANANDALAKSHMI, R.; MARATHE, R.; XIN, G.; HERR, J.M.; JR., MAU, C.; MALLORY, A.C.; PRUSS, G.; BOWMAN, L.; VANCE, V.B. A calmodulin-related protein suppresses post-transcriptional gene silencing in plants. **Science**, v. 290, p. 142-144, 2000.

BASS, B. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. **Cell**, v. 101, p. 235-238, 2000.

BAULCOMBE, D.C. Novel strategies for engineering virus resistance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, p. 117-124, 1994a.

BAULCOMBE, D.C. Replicase mediated resistance: a novel type of virus resistance in transgenic plants? **Trends in Microbiology**, v. 2, p. 60-63, 1994b.

BAULCOMBE, D.C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. **Plant Cell**, v. 8, p. 1833-1844, 1996a.

BAULCOMBE, D.C. RNA as target and na initiation of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v. 32, p. 79-88, 1996b.

BEACHY, R.N. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p. 215-220, 1997.

BECLIN, C.; BERTHOME, R.; PALAUQUI, J.-C.; TEPFER, M.; VAUCHERET, H. Infection of tobacco or *Arabidopsis* plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of non-viral (trans) genes. **Virology**, v. 252, p. 313-317, 1998.

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.

BUCK, K.W. **Virus resistance**. In: Plant genetic engineering. New York: Chapman and Hall, 1991.

CLARK, W.G.; FITCHEN, J.M.; BEACHY, R.N. Studies of coat protein-mediated resistance to TMV. **Virology**, v. 208, p.485-491, 1995.

COSTA, A.S.; MULLER, G.W. Tristeza control by croos protection: a US-Brazil cooperation sucess. **Plant Disease**, v. 64, p. 538-541, 1980.

DALMAY, T., HAMILTON, A., RUDD, S., ANGELL, S.; BAULCOMBE, D.C. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is requirede for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. **Cell**, v. 101, p. 543-553, 2000.

DING, S.W. RNA silencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 152-156, 2000.

DOUGHERTY, W.G.; LINDBO, J.A.; SMITH, H.A.; PARKS, T.D. SWANEY, S. E PROEBSTING, W.M. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: Exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, p. 544-552, 1994.

ELMAYAN, T.; VAUCHERET, H. Single copies of a 35S-driven transgene can undergo post-transcriptional gene silencing at each generation or can be transcriptionally inactivated *in trans* by a 35S silencer. **Plant Journal**, v. 9, p. 787-797, 1996.

ENGLISH, J.J.; MUELLER, E.; BAULCOMBE, D.C. Supression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. **Plant Cell**, v. 8, p. 179-188, 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 11650-11654, 2000.

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. 39, p. 806-811, 1998.

FIRE, A. RNA-triggered gene silencing. **Trends in Genetics**, v. 15, p. 358-363, 1999.

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.

GRANT, S.R. Dissecting the mechanisms of posttranscriptional gene silencing: divide and conquer. **Cell**, v. 96, p. 303-306, 1999.

GRIERSON, D.; TUCKER, G.A.; KEEN, J.; RAY, J.; BIRD, C.R.; SCHUCH, W. Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase. **Nucleic Acids Research**, v. 14, p. 8595-8603, 1986.

GUO, H.S.; GARCÍA, J.A. Delayed resistance to *Plum pox potyvirus* mediated by a mutated RNA replicase gene: Involvement of a gene-silencing mechanism. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 10, p. 160-170, 1997.

HARRISON, B.D.; MAYO, M.A.; BAULCOMBE, D.C. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic satellite RNA. **Nature**, v. 328, p. 799-802, 1987.

HOUWING, C.J.; JASPARS, E.M.J. Coat protein stimulates replication complexes of alfalfa mosaic virus to produce virion RNAs *in vitro*. **Biochimie**, v. 75, p. 617-622, 1993.

HULL, R.; DAVIES, J.W. Approaches to non conventional control of plant virus diseases. **Critical Review in Plant Science**, v. 11, p. 17-33, 1992.

INGELBRECHT, I.; VAN HOUTDT, H.; VAN MONTAGU, M.; DEPICKER, A. Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 19502-10506, 1994.

- JONES, L.; THOMAS, C.L.; MAULE, A.J. De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmic replicating plant RNA virus. **EMBO Journal**, v. 17, p. 6385-6393, 1998.
- JONES, L.; HAMILTON, A.J.; VOINNET, O., THOMAS, C.L.; MAULE, A.J.; BAULCOMBE, D.C. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. **Plant Cell**, v. 11, p. 2291-2301, 1999.
- KOOTER, J.M.; MATZKE, M.A.; MEYER, P. Listening to the silent genes: Transgene silencing, gene regulation and pathogen control. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 340-347, 1999.
- LOMONOSSOFF, G.P. Pathogen-derived resistance to plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 323-343, 1995.
- MALLORY, A.C.; ELY, L.; TRENT, H.S.; MARATHE, R.; ANANDALAKSHMI, R.; FAGARD, M.; VAUCHERET, H.; PRUSS, G.; BOWMAN, L.; VANCE, V.B. 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.
- MATTEWS, R.E.F. **Plant virology**. 3.ed. New York: Academic Press, 1991.
- MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J.M. Genomic imprinting in plants: parental effects and trans-inactivation phenomena. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 53-76, 1993.
- MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J.M. How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? **Plant Physiology**, v. 107, p. 679-685, 1995.
- MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J.; PRUSS, G.J.; VANCE, V.B. RNA-based silencing strategies in plants. **Current Opinion in Genetic Development**, v. 11, p. 221-227, 2001.
- MEYER, P.; HEIDMANN, I.; NIEDENHOF, I. Differences in DNA-methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. **Plant Journal**, v. 4, p. 86-100, 1993.

MISQUITTA, L.; PATERSON, B.M. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-I): a role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 1451-1456, 1999.

MONTGOMERY, M.K.; XU, S.; FIRE, A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 15502-15507, 1998.

MOREL, J.B.; MOURRAIN, P.; BECLIN, C.; VAUCHERET, H. DNA methylation and chromatin structure mutants affect both post-transcriptional and transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. **Current Biology**, v. 10, p.1591-1594, 2000.

MUELLER, E.; GILBERT, J.; 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.

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

NEJIDAT, A.; CLARK, W.G.; BEACHY, R.N. Engineered resistance against plant virus diseases. **Physiologia Plantarum**, v. 80, p. 662-668, 1990.

NGO, H.; TCHUDI, C.; GULL, K.; ULLU, E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 14687-14692, 1998.

NIEBEL, F. de C.; FREDO, 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.

OSMAN, T.A.M.; BUCK, K.W. The tobacco mosaic virus RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-binding subunit of

yeast eIF-3. **Journal of Virology**, v.71, p. 6075-6082, 1997.

PALAUQUI, J.C.; VAUCHERET, H. Field trial analysis of nitrate reductase co-suppression – a comparative-study of 38 combinations of transgene and loci. **Plant Molecular Biology**, v. 29, p. 149-159, 1995.

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.

PARK, Y.D.; PAPP, I.; MOSCONE, E.A.; IGLESIAS, V.A.; VAUCHERET, H.; MATZKE, A.J.M.; MATZKE, M.A. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. **Plant Journal**, v. 9, p. 183-194, 1996.

PRINS, M.; GOLDBACH, R. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants. **Archives of Virology**, v. 1, p. 2259-2276, 1996.

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.

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.

RUBINO, L.; RUSSO, M. Characterization of resistance to *Cymbidium ringspot virus* in transgenic plants expressing a full-length viral replicase gene. **Virology**, v. 212, p. 240-243, 1995.

RUIZ, M.T.; VOINNET, O.; BAULCOMBE, D.C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silence. **Plant Cell**, v. 10, p. 937-946, 1998.

SAITO, T.; YAMANAKA, K.; OKADA, Y. Long-distance movement and viral assembly to *Tobacco mosaic virus* mutants. **Virology**, v. 176, p. 329-336, 1990.

SANFORD, J.V.; JONHSTON, S.A. The concept of pathogen derived resistance: Deriving resistance genes from the parasites own genome. **Journal of Theoretical Biology**, v. 113, p. 395-405, 1985.

SCHOLTHOF, K.B.G.; SCHOLTHOF, H.B.; JACKSON, A.O. Control of plant virus disease by pathogen-derived resistance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 102, p. 7-12, 1993.

SHARP, P.A. RNAi and double-strand RNA. **Genes Development**, v. 13, p. 139-141, 1999.

SIJEN, T.; WELLINK, J.; HIRIART, J.B.; VAN KAMMEN, A. RNA-mediated virus resistance: Role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. **Plant Cell**, v. 8, p. 2277-2294, 1996.

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.

STAM, M.; DE BRUIN, R.; KENTER, S.; VAN DER HOORN, R.A.L.; VAN BOKLAND, R.; MOL, J.N.M.; KOOTER, J.M. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. **Plant Journal**, v. 12, p. 63-82, 1997a.

STAM, M.; MOL, J.N.M.; KOOTER, J.M. The silence of genes in transgenic plants. **Annual Botany**, v. 79, p. 3-12, 1997b.

SWANEY, S.; POWERS, H.; GOODWIN, J.; SILVA-ROSALES, L.; DOUGHERTY, W.G. RNA-mediated resistance with non-structural genes from the *Tobacco etch virus* genome. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 8, p. 1004-1011, 1995.

VALLE, R.P.C.; SKRZECZKOWSKI, J.; MORCH, M.D.; JOSHI, R.L.; GARGOWA, R.; DRUGEON, G.; BOYER, J.C.; CHAPEVILLE, F.; HAENNI, A.L. Plant viruses and new perspectives in cross-protection. **Biochimie**, v. 70, p. 695-703, 1988.

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 KAMMEN, A. Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 409-411, 1997.

VAUCHERET, H.; BECLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J.-B.; MOURRAIN, P.; PAULAQUI, J.-C.; VERNHETTES, S. Transgene-induced gene silencing in plants. **Plant Journal**, v. 16, p. 651-659, 1998.

VOINNET, O.; PINTO, Y.M.; BAULCOMBE, D.C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses on plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 14147-14152, 1999.

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

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

WARGELIUS, A.; ELLINGSEN, S.; FJOSE, A. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. **Biochemistry Biophysics Research Community**, v. 263, p. 156-161, 1999.

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

WATERHOUSE, P.M.; GRAHAM, M.W.; WANG, M. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense

and antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 13959-13964, 1998.

WATERHOUSE, P.M.; WANG, M.; FINNEGAN, E.J. The role of short RNAs in gene silencing. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 297-301, 2001a.

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

WIANNY, F.; ZERNICKA-GOETZ, M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. **Natural Cell Biology**, v. 2, p. 70-75, 2000.

WISNIEWSKI, L.A.; POWELL, P.A.; NELSON, R.S.; BEACHY, R.N. Local e systemic spread to *Tobacco mosaic virus* in transgenic tobacco. **Plant Cell**, v. 2, p. 559-567, 1990.

WITTMAN, S.; CHATEL, H.; FORTIN, M.G.; LALIBERTÉ, J.F. Interaction of the viral protein genome linked of *Turnip mosaic potyvirus* with the translational eukaryotic factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast Two-Hybrid System. **Virology**, v. 234, p. 84-92, 1997.

YEH, S.D.; GONSALVES, D. Evaluation of induced mutants of *Papaya ringspot virus* for control by cross protection. **Phytopathology**, v. 74, p. 1086-1090, 1994.

ZACCOMER, B.; CELLIER, F.; BOYER, J.C.; HAENNI, A.L.; TEPFER, M. Transgenic plants that express genes including the 3' untranslated region of the turnip yellow mosaic virus (TYMV) genome are partially protected against TYMV infection. **Gene**, v. 136, p. 87-94, 1993.

ZAITLIN, M.; ANDERSON, J.M.; PERRY, K.L.; ZHANG, L.; PALUKAITIS, P. Specificity of replicase-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus*. **Virology**, v. 201, p. 200-205, 1994.

Embrapa

Algodão



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

