UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MARCELO FAVARETO CORREA

Reação de plantas transgênicas de *Passiflora alata* à infecção com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

Piracicaba
2014

MARCELO FAVARETO CORREA

Reação de plantas transgênicas de *Passiflora alata* à infecção com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz M. Januzzi Mendes

Piracicaba
2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Correa, Marcelo Favareto

Reação de plantas transgênicas de *Passiflora alata* à infecção com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* / Marcelo Favareto Correa; orientadora Beatriz Madalena Januzzi Mendes. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
72 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. ELISA 2. Genética molecular vegetal 3. Maracujá 4. Potyvirus 5 Regulação gênica 6. Resistência genética vegetal 7. Virose vegetal I. Título

CDU 602.8 : 631.52

Aos meus pais, Elaine e Reginaldo e aos avós Maria Inês e Orlando,

Agradeço

Aos meus familiares, meu irmão Adriano, amigos e incentivadores,

Dedico

E aos passicultores...

Ofereço

“Do not fear the mistakes. There are none.”

Miles Davis

AGRADECIMENTOS

Agradeço a tudo e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de realização do curso de mestrado e toda estrutura para condução do projeto, assim como a Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Ampáro a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de recursos.

A Professora Doutora Beatriz Madalena Januzzi Mendes pela oportunidade, disponibilidade, incentivo, confiança e orientação construtiva.

Ao Professor Doutor Jorge Alberto Marques Rezende pela colaboração e incentivo durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A Professora Doutora Adriana Pinheiro Martinelli por me guiar em alguns caminhos.

A Ana Paula Chiaverini Pinto e Alessandra Cristina Bofino de Almeida Hara, pela constante disponibilidade em elucidar dúvidas acerca dos experimentos de transformação genética.

Ao Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico, pela atenção e esclarecimentos.

Aos meus grandes amigos da APG, Leonardo Soriano, Sandra Santa Rosa e Sylvia Rodrigues da ‘Sylveirão’, pelos grandes momentos vividos dentro e principalmente fora do laboratório.

A amiga e técnica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal Renata Beatriz Cruz, por todo o auxílio, calma e companheirismo.

A Ana Paula de Oliveira Amaral Melo e Débora Maria Sansini Freitas, pela colaboração durante o desenvolvimento do projeto.

A Dra. Eveline Carla da Rocha Tavano e Dra. Fabiana Rezende Muniz, pelos ensinamentos e auxílio nas análises de RT-qPCR e convívio.

A Laura Melo de Azevedo pela amizade, compreensão, companheirismo e principalmente por me acompanhar aos finais de semana no laboratório, na hibridização e na tristeza.

A todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (Tati, Lígia, Lívia, Bianca, Isabela, Flávia), Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (Lili, Filipi), Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas (Mônica, Karina, Hilo, Camila), Melhoramento de Plantas e Virologia Vegetal, os quais tornaram esse período extremamente agradável.

Aos grandes amigos Rodrigo Rodrigues, André Casali, Rafael Casarin, Ariel Ton, Tiago Tavares, Ben Hur, Nilo Martin, Thiago Barros, Rafael Smanioto, Cláudio Formiga, André Godoy, Leonardo Rossi, Eduardo Viana e Maurício Santana.

A todos os colegas da comissão organizadora do “V Simpósio Científico dos Pós-Graduandos do CENA”.

Um agradecimento especial à técnica de laboratório Inês Possignolo por toda base, amizade, incentivo e experiência compartilhada.

A secretária do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Suzineide Manesco.

A todos os membros da Comissão de Pós-Graduação do CENA.

Ao Gera e a Silvana do setor de informática do CENA.

A bibliotecária Marília Henyei, pela revisão da dissertação.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

CORREA, M. F. **Reação de plantas transgênicas de *Passiflora alata* à infecção com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus***. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

A cultura do maracujazeiro é de grande importância econômica para o Brasil, porém problemas fitossanitários vêm limitando a sua produção. A doença do endurecimento dos frutos causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), é atualmente a principal doença que afeta a cultura do maracujazeiro, tendo ocorrência generalizada no Brasil, diminuindo a produtividade e a longevidade dos pomares. Devido à ineficiência dos métodos convencionais de controle desta doença, a biotecnologia mostra-se como uma ferramenta para auxiliar na obtenção de plantas resistentes ao patógeno com o uso de técnicas de transformação genética. Com o intuito de obter plantas resistentes ao CABMV, Pinto (2010) regenerou 48 plantas de *P. alata* em experimentos de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando uma construção gênica do tipo *hairpin*, a qual contém um fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV, baseando-se no conceito de resistência derivada do patógeno (PDR). Foram identificadas 22 plantas transgênicas por PCR utilizando primers específicos para amplificação do gene CP. A integração do transgene foi confirmada via Southern blot, com sonda para detecção do gene de seleção *npt*II. As plantas identificadas como transgênicas por PCR foram propagadas (4 plantas por linhagem), inoculadas mecanicamente com o CABMV (3x) e analisadas por teste de ELISA. As plantas infectadas foram descartadas e as remanescentes foram inoculadas por afídeos virulíferos. Após 30 dias as plantas inoculadas foram analisadas por RT-PCR e RT-qPCR para detecção do patógeno. Todas as linhagens transgênicas inoculadas indicaram a presença do vírus em pelo menos 3 dos 4 clones inoculados. Foram selecionadas 3 plantas nas quais o vírus não foi detectado após 3 inoculações mecânicas e uma via vetor, e 3 plantas que apresentaram baixa titulação viral. Estas plantas serão propagadas para plantio em campo e avaliação de resistência à infecção pelo CABMV em condições naturais de infecção.

Palavras-chave: Transformação genética. *Passiflora*. CABMV.

ABSTRACT

CORREA, M. F. **Reaction of *Passiflora alata* transgenic plants to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* infection.** 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

The passion fruit crop has an expressive economic importance in Brazil, however phytosanitary problems has been limiting its production. The passion fruit woodiness disease caused by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) it's the currently main disease, decreasing productivity and the longevity of orchards and has a widespread occurrence in Brazil. Due to the inefficiency of the conventional methods for controlling this disease, genetic transformation techniques shown as an alternative way for obtaining pathogen resistant transgenic plants. In order to obtain transgenic plants resistant to the CABMV, Pinto (2010) regenerated 48 plants from genetic transformation experiments with *P. alata* using a *hairpin* genetic construct containing a CABMV coat protein gene fragment, based on the PDR (*pathogen-derived resistance*) concept, were 22 transgenic lineages were identified by PCR for the CP gene. The transgene integration was confirmed by Southern blot with a probe for the *npt*II gene. The transgenic plants were propagated in a total of 4 plants per lineage and then inoculated mechanically for 3 times with the CABMV. The viral replication was confirmed by ELISA. The infected plants were discarded after each inoculation and the remaining were inoculated by viruliferous aphids and analyzed by RT-PCR and RT-qPCR. All inoculated transgenic lines shown the presence of the virus in at least 3 of 4 clones. After the inoculations, 3 plants showed no symptoms and 3 a very low viral titration. These plants will be propagated for field tests in natural conditions of infection by CABMV.

Keywords: Genetic transformation. *Passiflora*. CABMV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da construção gênica pCABMV-dsCP e seus sítios de restrição, utilizada nos experimentos de transformação genética de *P. alata*. LB: borda esquerda; RB: borda direita; 35S-P: promotor do *Caulliflower mosaic virus*; 35S-T: terminador do *Caulliflower mosaic virus*; NOS-T: terminador do gene nopalina sintase; *npt*II: gene da neomicina fosfotranferase II; íntron: íntron da quitinase de *Citrus clementina*.....33

Figura 2 – Análise de PCR de plantas de *P. alata* regeneradas de experimentos de transformação genética com a construção gênica pCABMV-dsCP. M: marcador de peso molecular 100 pb (PROMEGA); (+): controle positivo (plasmídeo contendo a construção pCABMV-dsCP purificado); T1 – T21: plantas analisadas; NT: planta não transgênica; (-): água (controle negativo) 40

Figura 3 – Figura 3 – Valores de identidade da sequência de nucleotídeos de fragmento amplificado na análise de PCR, com diferentes isolados do CABMV analisado pelo algoritmo BLAST/NCBI 41

Figura 4 – Figura 4 – Análise de Southern blot de plantas de *P. alata*, com sonda para detecção do gene CP, regeneradas de experimentos de transformação genética com a construção gênica pCABMV-dsCP e identificadas como transgênicas por PCR. C+: controle positivo para o gene CP (produto de PCR purificado); C-: controle negativo (planta não transgênica); C++: controle positivo (planta transgênica T16).....42

Figura 5 – Análise de Southern blot de plantas de *P. alata*, com sonda para detecção do gene *npt*II, regeneradas de experimentos de transformação genética com a construção gênica pCABMV-dsCP e identificadas como transgênicas por PCR. C+: controle positivo para o gene *npt*II (produto de PCR purificado); C-: controle negativo (planta não transgênica); C++: controle positivo (planta trasngênica T16).....42

Figura 6 – Análise de RT- PCR de plantas assintomáticas após a 4ª inoculação, com primers específicos para detecção do CABMV. M: marcador de peso molecular 50 pb; (+): planta não transgênica infectada (controle positivo); Tn(x): clones assintomáticos selecionados; NtNi: planta não transgênica não inoculada.....47

Figura 7 – Análise de RT-qPCR de plantas transgênicas de *P. alata* para detecção do gene HC-Pro do CABMV, após a 4ª inoculação com o patógeno. Tn(x): clones avaliados; NtNi: planta não transgênica não inoculada (controle negativo); C-: água (controle negativo); +: planta não transgênica infectada (controle positivo). A planta transgênica T7(II) foi selecionada como amostra de referência por demonstrar o maior valor de C_T (39.678) 48

Figura 8 – Reação de plantas transgênicas e não transgênicas ao CABMV. a: planta não transgênica não inoculada; b: planta transgênica T7(III) após 4 inoculações com o CABMV; c: planta não transgênica inoculada com o CABMV apresentando sintomas característicos a infecção com o CABMV 49

Figura 9 – Recuperação biológica do CABMV em *C. quinoa* 20 dias após a inoculação. a: planta controle com sintomas de lesão local inoculada com macerado de planta infectada com o CABMV; b:planta inoculada com o macerado do clone T7(III); c: planta inoculada com o macerado do clone T18(II); d: planta inoculada com o macerado do clone T19(II).....50

Figura 10 – Figura 10 – Recuperação biológica do CABMV em *C. amaranticolor* 15 dias após a inoculação. a: planta controle com sintomas de lesão local inoculada com macerado de planta infectada com o CABMV; b: planta inoculada com o macerado do clone T7(III); c: planta inoculada com o macerado do clone T18(II); d: planta inoculada com o macerado do clone T19(II).....51

Figura 11 – Recuperação biológica em *P. alata*10 dias após a inoculação. a: planta controle com sintomas da doença do endurecimento dos frutos, inoculada com macerado de planta infectada com o CABMV; b: planta inoculada com o macerado do clone T7(III); c: planta inoculada com o macerado do clone T18(II); d: planta inoculada com o macerado do clone T19(II). 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação de resistência ao CABMV em linhagens transgênicas de *Passiflora alata* 43

Tabela 2 – Avaliação de recuperação biológica do CABMV a partir de plantas transgênicas de *P. alata* assintomáticas após 4 inoculações com o patógeno.....50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 REVISÃO DA LITERATURA 21

2.1 A cultura do maracujazeiro 21

2.2 CABMV – *Cowpea aphid-borne mosaic virus* 23

2.3 Transformação genética de plantas para resistência a vírus 25

2.4 Transformação genética de maracujazeiro 28

3 MATERIAL E MÉTODOS 30

3.1 Material vegetal 30

3.2 Caracterização molecular das plantas matrizes 30

3.2.1 Extração de DNA 31

3.2.2 Identificação das plantas transgênicas por análise de PCR 31

3.2.3 Southern Blot 32

3.3 Avaliação de resistência ao CABMV 33

3.3.1 Propagação das plantas 33

3.3.2 Inoculação mecânica do CABMV 34

3.3.3 Inoculação pelo vetor *Myzus persicae* 35

3.3.4 Recuperação biológica do CABMV 37

4 RESULTADOS 38

4.1 Caracterização molecular das plantas matrizes 38

4.1.1 Identificação de plantas transgênicas por análise de PCR 38

4.1.2 Análise de Southern blot 39

4.2 Avaliação de resistência ao CABMV 41

4.3 Recuperação biológica do CABMV 48

5 DISCUSSÃO 52

6 CONCLUSÃO 57

REFERÊNCIAS 58

ANEXO 69

1 INTRODUÇÃO

A doença do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), é um fator limitante para produção nos pomares de maracujá no Brasil. Os primeiros registros de plantas de maracujazeiro infectadas com o CABMV ocorreram no final da década de 1970, no estado da Bahia. Atualmente o patógeno infecta maracujazeiro em todas as regiões do Brasil..O vírus é transmitido de forma não-persistente e não circulativa por várias espécies de afídeos que não colonizam as plantas de maracujazeiro. A infecção pelo CABMV provoca redução expressiva na produção e na qualidade dos frutos e diminui a longevidade dos pomares. As plantas de maracujazeiro infectadas pelo CABMV apresentam sintomas generalizados de mosaico foliar, acompanhado de manchas-anelares, bolhas, rugosidade e deformações foliares (BASHIR; AHMAD; GHAFOOR, 2002).

O controle da doença do endurecimento dos frutos do maracujazeiro nos pomares é difícil, pois todas as cultivares, tanto de maracujá amarelo quanto de maracujá doce, são suscetíveis à infecção. O controle químico do vetor é geralmente ineficiente devido à forma não persistente de transmissão. Tentativas de pré-imunização com estirpes fracas do CABMV realizadas por Novaes e Rezende (2003), não mostraram resultados promissores por não promoverem resistência contra a infecção por estirpes comuns. Atualmente, a única alternativa viável para controle da virose do endurecimento dos frutos é o uso de práticas culturais.

Devido aos limitados recursos de resistência natural ao vírus, a transformação genética pode ser uma alternativa para a obtençãode plantas resistentes a este patógeno. Dentre as diversas estratégias para desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a patógenos, a resistência derivada do patógeno (PDR), descrita por Sanford e Johnston (1985), tem sido utilizada para obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus. O conceito baseia-se na possibilidade da resistência ao patógeno ser obtida pela introdução de genes ou partes do genoma viral ao genoma do hospedeiro. O gene mais frequentemente utilizado é o da proteína capsidial (CP) do vírus, que já mostrou ser efetivo em prevenir ou reduzir a infecção causada pelo vírus homólogo. O conceito de PDR já foi aplicado com

sucesso nos patossistemas *Nicotiana tabbacum*/*Tobacco mosaic virus* (ABEL et al., 1986), *Lycopersicum esculentum*/*Tobacco mosaic virus* (NELSON et al., 1988), *Carica papaya*/*Papaya ringspot virus* (FITCH et al., 1992) e *Prunus domestica*/*Plum pox virus* (SCORZA et al., 1994).

A resistência ao patógeno pelo conceito de PDR pode ser alcançada pela expressão da proteína ou somente pela transcrição do transgene, ativando o mecanismo de silenciamento gênico, que é caracterizado pela degradação específica de ambos os mRNA, tanto do transgene quanto do RNA alvo complementar, e pode ser ativado em plantas transgênicas com o uso de construções gênicas do tipo senso, antisenso e *hairpin*.

Utilizando a estratégia de PDR, alguns trabalhos já foram desenvolvidos visando a produção de plantas transgênicas de maracujazeiro resistentes ao CABMV. Alfenas et al. (2005) selecionaram uma planta transgênica de maracujazeiro expressando um RNA não traduzível da região 3’ do gene NIb e 5’ do gene CP resistente ao isolado CABMV-MG. Trevisan et al. (2006) selecionaram uma linhagem transgênica expressando o gene CP do CABMV a qual foi resistente a inoculação com 3 diferentes isolados do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (CABMV-SP, CABMV-RJ, CABMV-CE). Monteiro-Hara (2010) obteve 11 plantas transgênicas utilizando uma construção gênica do tipo antisenso contendo o gene CP do CABMV e 2 com uma construção gênica do tipo *hairpin*.

Com o intuito de obter plantas de *Passiflora alata* resistentes ao CABMV, Pinto (2010) conduziu experimentos de transformação genética via *A. tumefaciens,* com a construção gênica pCABMV-dsCP, do tipo *hairpin*, que contém o gene CP do CABMV. O objetivo deste trabalho é a caracterização molecular destas plantas e a avaliação de resistência das plantas transgênicas selecionadas ao CABMV.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A cultura do maracujazeiro

As espécies de maracujazeiro pertencem a família *Passifloracea*, a qual compreende 12 gêneros, sendo o *Passiflora* o mais expressivo com aproximadamente 530 espécies (HANSEN et al., 2006; CUNHA; BARBOSA; FARIA, 2004). A maioria das espécies são originárias da região tropical e subtropical da América do Sul, sendo que mais de 152 espécies são procedentes da parte central e norte do Brasil (VANDERPLANK, 1996). Existem ainda outras espécies originárias da Austrália, China, Malásia e Madagascar (MANICA, 2005).

De acordo com Cunha et al. (2002), 70 espécies do gênero *Passiflora* apresentam frutos comestíveis e de importância econômica. Dentre estas se destacam três de maior importância *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo), *P. edulis* (maracujá roxo) e *P. alata* (maracujá doce). Algumas outras espécies possuem importância no mercado de ornamentais e na indústria farmacêutica e cosmética como *P. incarnata* e *P. caerulea* (PEIXOTO, 2005).

Segundo Ruggiero (1998) o cultivo do maracujá para fins comerciais se iniciou no Havaí e na Austrália, com a utilização de espécies nativas do Brasil. A exploração comercial da cultura do maracujazeiro no Brasil adquiriu maior importância a partir da segunda metade da década de 1970, quando a produção cresceu para atender a demanda interna e a exportação, em um cenário onde existiam poucos países produtores e a concorrência internacional era praticamente inexistente, o que facilitava de sobremaneira a comercialização e a expansão do cultivo (PIRES; SÃO JOSÉ, 2011).

Dentro do gênero *Passiflora*, a espécie *P. edulis* é responsável por mais de 95% da área cultivada comercialmente, apresentando importância econômica tanto pela comercialização de frutos *in natura* como pela de suco concentrado (BRAGA et al., 2005). O maracujá doce (*P. alata* Curtis) vem apresentando destaque no cenário nacional, com potencial para atender diferentes nichos de mercado como a indústria

farmacêutica, projetos paisagísticos e principalmente o mercado de frutas frescas (SILVA; RUA, 2007), ocupando aproximadamente 3% da área cultivada (MACIEL, 2009). Segundo Noriega (2011), *P. alata* apresenta em sua composição química flavonóides, alcalóides e saponinas que conferem atividade antioxidante levando a neutralização de radicais livres além de ser rico em passiflorina, um calmante natural.

A importância econômica do maracujazeiro aumentou significativamente nas últimas três décadas, refletindo em uma produção mundial de aproximadamente 805.000 t, sendo o Brasil o maior produtor, seguido por Equador, Colômbia, Peru (ITI TROPICALS, 2014; MELETTI, 2011). O Equador é, atualmente, o maior exportador, tendo os Estados Unidos como seu maior mercado-destino (PIRES et al., 2011).

A estimativa de área colhida de maracujá no Brasil é de 57.848 ha com uma produção de 776.097 t, onde as regiões Nordeste e Sudeste são as maiores produtoras, com 563.346 e 114.796 t, respectivamente, com destaque para os estados da Bahia (320.945 t), Ceará (179.243 t), Espírito Santo (35.700 t), Minas Gerais (39.373 t) e Sergipe (35.977 t) (IBGE, 2012). O Brasil também destaca-se por ser o maior consumidor mundial, sendo que mais de 60% da produção doméstica se destina ao consumo *in natura* e o restante às indústrias de processamento de polpa e suco (MENEGOTO, 2008).

Contrastando com a alta produção e demanda de maracujá no Brasil, a produtividade da cultura é baixa, em média 13 – 14 t/ha (IBGE, 2012). Considerando o potencial de cultivares melhoradas geneticamente e a aplicação de tecnologias adequadas, a produtividade poderia chegar a 50 t/ha (FALEIRO et al., 2008).

Com o surgimento de novas áreas de cultivo e a expansão da cultura, observou-se o aparecimento de diversos problemas fitossanitários, causados por fungos, bactérias e vírus. Isso acarretou a redução da vida útil dos pomares de maracujazeiro, tornando essa cultura itinerante, ou seja, a cultura passou a diminuir seu tempo de permanência numa determinada área. Inicialmente, a vida útil dos pomares era de cinco a seis anos, atualmente os pomares são renovados a cada dois anos ou mesmo anualmente (RUGGIERO, 1996; LIMA et al., 2011).

Segundo Lima et al. (2006), os cultivos de maracujá no Brasil são conduzidos, na sua maioria, com baixo nível tecnológico e, desta forma, algumas medidas devem ser adotadas para o aperfeiçoamento desse processo, destacando-se o emprego de tecnologias adequadas de manejo da cultura relacionados à correção do solo, adubações equilibradas, espaldeiramento, podas, polinização artificial e controle fitossanitário adequado.

Muitos fatores contribuem para a redução da longevidade e produtividade de pomares de maracujazeiro, sobretudo as doenças de etiologia viral, bacteriana e fúngicas, as quais o endurecimento dos frutos do maracujazeiro causada pelo CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*), a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, a podridão-do-colo causada por *Haematonectria haematococa*, a fusariose causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e a antracnose causada por *Glomerella cingulata* são as mais importantes, podendo tornar a cultura impraticável e nômade (FISCHER; REZENDE, 2008; MONTEIRO, 2005).

A doença do endurecimento dos frutos do maracujazeiro é uma das mais importantes nos pomares brasileiros, ocorrendo em várias espécies do gênero *Passiflora,* sendo limitante para produção (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).

2.2 CABMV – *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

O CABMV possui ocorrência generalizada no Brasil (KITAJIMA et al., 2008) causando a doença do endurecimento dos frutos, a mais importante entre as doenças que afetam o gênero *Passiflora* (BARROS, 2011). De acordo com Barros et al. (2007) até recentemente acreditava-se que esta virose era causada pelo *Passion fruit woodiness virus* (PWV), entretanto, estudos baseados na sequência de nucleotídeos da região codificadora da capa proteica do vírus, indicaram que a doença é causada por uma estirpe do CABMV. Tanto o CABMV quanto o PWV pertencem ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, e suas partículas são do tipo filamento flexuoso com 690-760 nm de comprimento, 11-16 nm de diâmetro e

possuem o genoma composto por uma única molécula de RNA senso positiva, com aproximadamente 10.000 nt (FAUQUET et al., 2005).

O primeiro registro de ocorrência de infecção de plantas de maracujazeiro com o CABMV se deu no estado da Bahia, em plantas de *P. alata*, no final de 1970 (YAMASHIRO; CHAGAS, 1979). De acordo com Cerqueira-Silva et al. (2008), casos de infestações pelo CABMV foram mais tarde relatados nos estados de Pernambuco, Sergipe, Ceará, São Paulo e Minas Gerais.

A doença é caracterizada pelo aparecimento dos sintomas de mosaico foliar, com intensidade variável, podendo ser acompanhado de encarquilhamento e deformidades no limbo foliar, manchas anelares e bolhas; as plantas apresentam um retardamento no crescimento e os entrenós se mostram mais curtos; no fruto nota-se um espessamento e enrijecimento do pericarpo, diminuição da cavidade da polpa, além de deformidades e redução significativa no tamanho dos frutos (NASCIMENTO et al., 2006; SÃO JOSÉ, 1994). De acordo com Ruggiero (1996) os sintomas são mais pronunciados nas épocas mais frias do ano

De acordo com Piero et al. (2006) a transmissão do vírus ocorre principalmente pelo pulgão *Aphis gossypii* no momento da picada de prova do inseto, o que caracteriza a relação vírus-vetor como sendo do tipo não-persistente e não circulativa. Costa (1998) relata que outras espécies de pulgão também podem atuar como vetor do CABMV, como *A. fabae* Scopoli, A. *nerii* Boyer de Fonscolombe, *Myzus nicotianae* Blackman e *M. persicae* (Sulz.). Apesar destes afídeos serem vetores do CABMV, a maioria dos relatos não os inclui como pragas do maracujazeiro. O vírus do endurecimento dos frutos não é transmitido por sementes, mas a sua transmissão mecânica pode ser relativamente fácil (NOVAES; REZENDE; KITAJIMA, 2000).

O controle da doença do endurecimento dos frutos do maracujá nos pomares é difícil, pois todas as cultivares, tanto do maracujá amarelo quanto do doce, são suscetíveis à infecção e o controle químico do vetor é geralmente ineficiente devido à forma não persistente de transmissão (BOCK; CONTI, 1974; TAYLOR; GREBER, 1973). Tentativas de pré-imunização do maracujazeiro com estirpes fracas do CABMV, realizadas por Novaes e Rezende (2003), não monstraram resultados promissores por não promoverem resistência contra a infecção por estirpes comuns.

Segundo Rezende (2006) novos plantios próximos a pomares abandonados ou antigos, os quais podem servir como fonte de inóculo, e a dificuldade de controle dos vetores, podem ser considerados os principais fatores para a disseminação da doença. Atualmente, no Brasil, a única maneira de controlar a doença é com práticas culturais, como usar mudas sadias para transplante, eliminar pomares antigos infectados antes da instalação dos novos, evitar o cultivo intercalado com espécies leguminosas, as quais podem ser hospedeiras do vírus, e efetuar a retirada de plantas doentes até 5 ou 6 meses após o plantio (OLIVEIRA, 2006; GIORIA et al., 2000).

2.3 Transformação genética de plantas para resistência a vírus

As viroses são ameaças significativas para as culturas agrícolas por todo mundo e os recursos limitados de resistência natural demandam a busca por novas fontes de resistência (PRINS, 2003). A transformação genética de plantas utilizando genes derivados do patógeno é um procedimento já bem estabelecido, conhecido como '*pathogen-derived resistance'* (PDR) descrito por Sanford e Johnston (1985).

O conceito de PDR tem sido utilizado principalmente para a obtenção de plantas resistentes a vírus, com a produção de plantas transgênicas contendo genes ou parte do genoma viral (WATERHOUSE; SMITH; WANG, 1999; SASAYA et al., 2014). O gene mais comumente utilizado é o da proteína capsidial, porém, genes expressando proteínas de movimento e genes associados com a replicação do vírus, como o da replicase (NIb), também estão sendo utilizados em diversos trabalhos (ARAGÃO et al., 2001; ZHANDONG; SHUANGYI; QIEWI, 2006).

O primeiro trabalho a relatar a funcionalidade do conceito de PDR foi desenvolvido por Abel et al. (1986), o qual demonstrou que plantas de tabaco transgênico, contendo o gene da proteína capsidial (CP) do *Tobacco mosaic virus* (TMV), ao serem desafiadas pelo vírus apresentavam retardo ou ausência de sintomas.

Utilizando o conceito de PDR, a primeira cultura melhorada via transformação genética avaliada em testes de campo foi o tomateiro, expressando o gene CP do

TMV, onde 95% das plantas avaliadas não mostraram sintomas após os testes de inoculação e apresentaram a mesma produtividade de plantas não transgênicas (NELSON et al., 1988).

Fitch et al. (1992) obtiveram plantas transgênicas de mamoeiro contendo um cassete de expressão com o gene CP do *Papaya ringspot virus* (PRSV). Uma das linhagens se mostrou completamente resistente ao patógeno, transformando-se em uma variedade comercial, reestabelecendo a cultura do mamoeiro no Havaí. Em 2006, 90% da área plantada no Havaí, consistia de mamoeiro transgênico (SUZUKI et al., 2007). Plantas de abobrinha contendo um cassete de expressão com o gene CP do *Cucumber mosaic virus* (CMV) e/ou do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e/ou *Watermelon mosaic virus* (WMV) também foram aprovadas para comercialização nos Estados Unidos, por serem altamente resistentes aos patógenos, tanto na inoculação mecânica como na inoculação via vetor (GOTTULA; FUCHS, 2009; TRICOLI et al., 1995).

Plantas de ameixeira contendo o gene CP do *Plum pox virus* (PPV) foram obtidas por transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* por Scorza et al. (1994). As plantas foram inoculadas com o PPV mecanicamente e expostas naturalmente ao vetor, demonstrando alto nível de resistência e ausência de sintomas. Os resultados mostraram pela primeira vez que o mecanismo também funciona em plantas perenes e lenhosas (SCORZA et al., 2001).

A resistência à doença pode ser obtida pela expressão da proteína e a interferência desta em alguma etapa da infecção viral (protein-mediated resistance) ou somente pela transcrição do transgene (RNA-mediated resistance) (BAULCOMBE, 1996; SPIELMANN et al., 2000; RITZENTHALER, 2005) que pode levar a ativação do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (post-transcriptional gene silencing – PTGS). Baulcombe (2004) considera este mecanismo um componente de defesa natural das plantas a vírus, sendo responsável pela degradação do RNA viral, podendo ser acionado em plantas transgênicas com o uso de construções gênicas do tipo senso ou antisenso do transgene. De acordo com Waterhouse, Graham e Wang (1998) o mecanismo

de PTGS é caracterizado pela degradação altamente específica de ambos os mRNA, tanto o do transgene quanto o do RNA alvo que contém as mesmas sequências, ou sequências complementares de nucleotídeos.

O silenciamento gênico é definido como um processo molecular que envolve a regulação de genes específicos, assim como um sistema de defesa genético. As vias de silenciamento gênico já identificadas englobam o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), silenciamento gênico transcricional (TGS) e silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), todos mediados por sRNAs (small RNAs) (VAUCHERET; FAGARD, 2001; ROVERE; VAS; HOPP, 2002; YU; KUMAR, 2003; SOUZA et al., 2007).

Apesar de muitas classes de sRNAs terem surgido, vários aspectos como a origem, estrutura, proteínas efetoras associadas e seus papéis biológicos levaram ao reconhecimento de duas principais categorias, os *short interfering* RNA (siRNA) e os *micro*RNAs (miRNA). Os miRNAs são considerados reguladores de genes endógenos, enquanto os siRNAs como defensores da integridade do genoma em resposta a ácidos nucléicos invasivos, como vírus, transposons e transgenes (BAULCOMBE, 2004; NAHID et al., 2011).

Os sRNAs são produzidos pela clivagem de moléculas mais longas de dsRNA (*double stranded RNA*) por enzimas com domínios RNase III, caracterizadas como dsRNA-nuclease-específica chamadas comumente de DICER. O principal componente efetor da maquinaria do silenciamento gênico é uma proteína da superfamília Argonauta (AGO). Todos os fenômenos gene-regulatórios envolvendo RNAs de 21 – 24 nt requerem uma ou mais proteínas argonauta que são os componentes centrais do RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Os produtos de fita dupla gerados pela DICER entram na via de montagem do RISC que envolve a separação de uma das fitas do dsRNA culminando em uma associação estável de uma das fitas com a proteína efetora AGO podendo, desta forma, afetar a estrutura da cromatina, segregação de cromossomos, transcrição, processamento de RNA, estabilidade do RNA e tradução ao reconhecer um alvo (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; LIN et al., 2007; LEE; ROTH, 2003; WILLIANS, 2011; CHEN, 2009; BRODERSEN; VOINNET, 2006; HAMILTON; BAULCOUMBE, 1999; MATTICK; MAKUNIN, 2006).

Em contraste a resistência a doenças causadas por bactérias e fungos, plantas transgênicas resistentes a vírus estão sendo utilizadas comercialmente a mais de uma década, como os cultivares de abobrinha e mamão apresentando resistência a vírus específicos de RNA (COLLINGE et al., 2010; ISAAA, 2014a).

2.4 Transformação genética de maracujazeiro

A suscetibilidade das espécies comerciais de *Passiflora* a doenças tem limitado a expansão da cultura do maracujá no Brasil, justificando o uso de estratégias biotecnológicas nos programas de melhoramento (APEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2005). A produção de plantas geneticamente modificadas constitui alternativa de transferência de genes de resistência a doenças, principalmente aquelas causadas por vírus e bactérias (DASGUPTA; MALATHI; MUKHERJEE, 2003).

Visando obter plantas transgênicas resistentes a bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, Monteiro (2005) utilizou as linhagens de *A. tumefaciens* LBA 4404 e EHA 105, contendo o gene da atacina A (*att*A), e obteve 31 brotos transgênicos identificados por PCR (*Polymerase chain reaction*). A expressão do transgene foi confirmada por RT-PCR (*Reverse transcription - polymerase chain reaction*) e, após inoculação, 10 plantas se mostraram resistentes ao patógeno.

Plantas transgênicas de maracujazeiro expressando um RNA não traduzível correspondente à região 3’ do gene *NIb (*replicase) e 5’ do gene CP (proteína capsidial), de um isolado brasileiro do CABMV, foram obtidas por Alfenas et al. (2005). As plantas foram analisadas e apenas uma se mostrou resistente ao isolado CABMV-MG1 do CABMV, porém suscetível a CABMV-PE1. A ausência da replicação viral foi confirmada pelo teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*).

A integração do gene da proteína capsidial do CABMV foi confirmada por Southern blot em 7 linhagens regeneradas a partir de experimentos de transformação genética via *Agrobacterium* por Trevisan et al. (2006) utilizando as variedades IAC-275 e IAC-277 de maracujazeiro. As plantas foram inoculadas com

3 isolados do CABMV e foi possível verificar uma linhagem imune aos 3 isolados testados. Nesta linhagem, a partir das análises de Northern e Western blot, não foi possível detectar a presença do mRNA e da proteína, indicando a ocorrência de um evento de silenciamento gênico. Monteiro-Hara (2011) deu continuidade ao trabalho de avaliação de resistência ao CABMV identificando mais uma linhagem que não mostrou sintomas após as inoculações. As linhagens identificadas como imunes foram autofecundadas para avaliação de resistência da geração $R_{1,}$ e após inoculação, somente uma das linhagens se mostrou resistente, a qual foi novamente autofecundada tendo a geração R_2 mostrado alto nível de resistência ao patógeno.

Monteiro-Hara (2010) utilizando as construções gênicas pCABMV-asCP, contendo um fragmento do gene CP do CABMV na orientação antisenso, e a construção gênica pCABMV-dsCP, contendo fragmentos senso e antisenso do gene CP do CABMV, separados por um íntron formando uma construção gênica do tipo *hairpin,* obteve plantas transgênicas de maracujazeiro, via *A. tumefaciens*, utilizando as variedades FB-100, IAC-275 e IAC-277*.* Foram identificadas por PCR 11 plantas positivas para o fragmento antisenso da proteína capsidial do CABMV e 2 plantas transgênicas com o fragmento da construção gênica *hairpin.* A integração do transgene foi confirmada em 4 plantas por *Southern* blot para a construção gênica antisenso.

Com o intuito de obter plantas de *P. alata* resistentes ao CABMV, Pinto (2010) conduziu experimentos de transformação genética via *A. tumefaciens,* estirpe EHA 105, contendo um cassete de expressão com um fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV, numa construção tipo *hairpin* e o gene de seleção *npt*II. Foram identificadas 48 plantas transgênicas por PCR e a integração do transgene foi confirmada por *Southern* blot em 9 plantas, utilizando-se sonda para o gene *npt*II.

Além dos trabalhos visando resistência a patógenos, diversos trabalhos envolvendo técnicas de transformação genética em *Passiflora* vêm sendo relatados, os quais avaliaram o efeito de antibióticos na regeneração dos explantes, a expressão de genes marcadores, a expressão de genes para resistência a antibióticos e herbicidas, e genes visando a inibição da síntese de etileno (MANDERS et al., 1994; OTONI et al., 1995; QUOIRIN; WINKLER; AYUB, 2004; SILVA, 1998; BRAZ, 1999; MARTINEZ et al., 2005; BUENO DOS REIS et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para as análises de caracterização molecular e avaliação de resistência ao CABMV, foram utilizadas plantas de *P. alata*, aclimatizadas em casa-de-vegetação, provenientes de experimentos de transformação genética, utilizando a construção gênica pCABMV-dsCP (Figura 1) do tipo *hairpin*. Esta construção gênica constitui-se de fragmento senso e antisenso, de 208 pb do gene da proteína capsidial do CABMV contendo a sequência conservada WCIEN, separados pelo íntron do gene da quitinase de *Citrus clementina*, dirigidos pelo promotor 35S do CaMV (*Caulliflower mosaic virus*) e o terminador NOS (nopalina sintase), tendo o gene *npt*II (neomicina fosfotransferase) como gene de seleção, o qual confere resistência ao antibiótico canamicina.

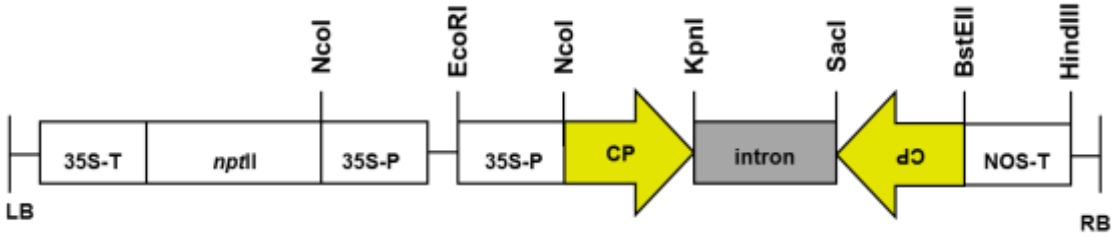

Figura 1 – Representação esquemática da construção gênica pCABMV-dsCP e seus sítios de restrição, utilizada nos experimentos de transformação genética de *P. alata*. LB: borda esquerda; RB: borda direita; 35S-P: promotor do *Caulliflower mosaic virus*; 35S-T: terminador do *Caulliflower mosaic virus*; NOS-T: terminador do gene nopalina sintase; *npt*II: gene da neomicina fosfotranferase II; íntron: íntron da quitinase de *Citrus clementina*.

3.2 Caracterização molecular das plantas matrizes

As plantas regeneradas dos experimentos de transformação genética foram analisadas por PCR e Southern blot, para identificação e confirmação da integração do transgene.

3.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada conforme descrito por Borse, Joshi e Chapalkar (2011), com algumas modificações. Com o auxílio de cadinhos e pistilos, folhas jovens (0,5 g) foram pulverizadas com nitrogênio líquido e transferidas para tubos de centrifugação (15 mL). Adicionou-se tampão de extração (7 mL; 65 ºC) composto por brometo de cetil trimetil amônio (CTAB 2%), cloreto de sódio (NaCl 1,4 M), tris-HCl (100 mM; pH 8,0), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA 20 mM), polivinilpirrolidona (PVP 1%), β-mercaptoetanol (0,2%), proteinase K (0,1 $mg.mL^{-1}$) e ácido ascórbico (100 mM). As amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas (65 ºC; 20 min) e centrifugadas (12.000 x g; 10 min; 25 ºC). O sobrenadante foi transferido para tubo novo contendo clorofórmio – álcool isoamílico (7 mL; 24:1 v/v), repetindo-se a etapa anterior. Ao sobrenadante recuperado (~5 mL) foi adicionado etanol absoluto (10 mL). As amostras foram incubadas (-20 °C; 1 h) seguindo-se por centrifugação (12.000 x g; 10 min; 4 ºC), a fase aquosa foi descartada e o *pellet* lavado por centrifugação (12.000 x g; 5 min; 4 ºC) com etanol 70% (2,5 mL). Após descarte da fase aquosa, o *pellet* foi ressuspendido em TE (1 mL; tris-HCl 10 mM; pH = 8,0; EDTA 1mM; pH 8,0), contendo RNase (10 $\mu g.mL^{-1}$). Após a extração, a qualidade das amostras de DNA foi avaliada por espectrofotometria (Nanodrop® - Thermo Scientific, San Jose, EUA) com base na relação λ260/280 (1.8±1). As amostras foram quantificadas por fluorometria (Qubit™ Fluorometer; Quant-it DNA Assay Kit – Invitrogen, Carlsbad, EUA).

3.2.2 Identificação das plantas transgênicas por análise de PCR

Foram analisadas por PCR 48 plantas de *P. alata*, regeneradas de experimentos de transformação genética com a construção gênica pCABMV-dsCP. A reação constitui-se de: 'GoTaq® Green Master Mix' (12,5 µL; PROMEGA - Madison, USA), DNA (50 ng), primers (10 pmol) 5'- AGTGTGGGTTTTGCGTTTTC -3' e 3'- GCTGGACGAAGACAAGATGG -5', água (q.s.p. 25 µL) seguindo o programa de 4 min a 94 °C, 40 ciclos de 3 min a 94 °C, 30 s a 58 °C, 30 s a 72 °C mais 1 ciclo

de 4 min a 72 °C, para amplificação de um fragmento de 162 pb, correspondente ao fragmento do gene CP, contido na construção gênica em questão. Como controle positivo foram utilizados plasmídeos purificados (5 ng) e linearizados contendo a construção gênica em questão e como controle negativo foram utilizadas plantas não transgênicas e água ultrapura. O produto das reações foi submetido a eletroforese em gel de agarose (1,5% w/v) e os fragmentos amplificados foram purificados (QIAEX II Gel Extraction Kit - QIAGEN, Hilden, Alemanha) e sequenciados (Macrogen Inc. – Seoul, Coréia).

3.2.3 Southern Blot

Para comprovação da transgenia e determinação do número de eventos de inserção do transgene, as plantas PCR positivas foram analisadas por Southern blot, utilizando-se 30 µg de DNA para a digestão com a endonuclease HINDIII (5 U/µg de DNA; 37 ºC; 16 h). Os fragmentos gerados foram precipitados, acrescentando-se acetato de amônio (10% v/v; 7,8 M; pH = 7,8) e etanol absoluto (250% v/v) e centrifugados (12.000 x g; 4 ºC; 20 min). Após a centrifugação o sobrenadante foi removido e as amostras foram lavadas com etanol 70% (500 µL) seguindo-se de nova centrifugação (12.000 x g; 4 ºC; 5 min). Após secagem, o pellet foi ressuspendido e os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose (0,8%; 40 V; 16 – 18 hs). O gel contendo os fragmentos foi lavado para despurinação (HCl 0,25 M; 15 min) e desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) seguido por duas lavagens de neutralização (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M; pH = 7,5). O conteúdo do gel foi imobilizado em membrana de Nylon (Amersham Hybond™ N^+ - GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), via transferência por capilaridade, utilizando-se uma solução SSC 20x (NaCl 3 M; citrato de sódio 0,3 M; pH = 7,0). Após a secagem da membrana (80 °C; 30 min) os fragmentos foram fixados por exposição a luz ultravioleta ($7x10^4$ $\mu J.cm^{-2}$; UVC 500 UV Crosslinker - GE Healthcare). Para hibridização, a membrana foi transferida para frasco de vidro (Hybridization bottles - Pyrex®), incubada (60 ºC; 90 min) em solução SSC 5x (50 mL) e pré-hibridizada em solução de hibridização (30 min). A sonda utilizada para detecção do fragmento do gene *npt*II foi obtida por PCR e marcada com

fosfatase alcalina, utilizando-se o kit ‘Alkphos Direct Labelling Reagents’ (GE Healthcare). A sonda foi acrescentada à solução de hibridização e o material foi incubado (60 ºC; 16 – 18 h). Após incubação, a solução de hibridização foi descartada e a membrana lavada (60 ºC; 10 min; 2x) em solução *buffer I* (uréia 2 M; Na_2PO_4 50 mM; NaCl 150 mM; $MgCl_2$ 1 mM; SDS 0,1% w/v; agente bloqueador 0,2% p/v). A membrana passou por mais duas lavagens (5 min; 25 ºC) em solução *buffer II* (NaCl 100 mM; tris-base 50 mM; $MgCl_2$ 2 mM). A detecção foi realizada com o reagente ‘CDP - Star™ Detection Reagent’ (GE Healthcare). Após secagem, a membrana foi transferida para filme plástico, e colocada em contato com uma chapa autorradiográfica ‘Hyperfilm™ MP’ (GE Healthcare) por um período de 1 – 6 h, em um cassete radiográfico ’Hypercassete™’ (Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido). Após o período de exposição, a chapa foi revelada utilizando-se solução reveladora (Revelador e Reforçador Kodak GBX - Carestream Health, Inc. Rochester, Nova Iorque; 4 min), lavada em água (1 min) e transferida para solução fixadora (Fixador e Reforçador Kodak GBX - Carestream Health; 20 min).

3.3 Avaliação de resistência ao CABMV

3.3.1 Propagação das plantas

As plantas identificadas como transgênicas por PCR foram mantidas em casa-de-vegetação e propagadas via estaquia, visando a obtenção de um total de 4 clones por linhagem transgênica. Os ramos medianos das porções maduras das plantas foram cortados, mantendo-se um entrenó e meia folha na extremidade. As estacas foram plantadas em vasos de alumínio (1,5 L), contendo substrato comercial (Plantmax Hortaliças®, Eucatex), e mantidas em casa-de-vegetação (sombrite 50%), certificada para o cultivo de plantas transgênicas. Após o início da brotação, as plantas foram transferidas para vasos plásticos (3 L), contendo o mesmo substrato, e mantidas em casa-de-vegetação.

3.3.2 Inoculação mecânica do CABMV

As inoculações foram realizadas com o isolado São Paulo do CABMV (CABMV-SP). O inóculo foi obtido pela maceração de folhas infectadas, em almofariz, na presença de tampão fosfato de potássio (0,02 M; pH = 7,0; 1:50 w/v). Foram inoculadas as folhas mais jovens de cada planta, previamente polvilhadas com carbureto de silício. O inóculo foi pipetado sobre as folhas (200 µL) e levemente friccionado com o dedo indicador. Como controle, foram utilizadas duas plantas não transgênicas sendo uma inoculada no início e outra no final das inoculações. Foram inoculados 4 clones de cada uma das 21 linhagens transgênicas, totalizando 84 plantas. A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação, determinando-se o número de plantas com sintomas e realizando-se a análise de PTA-ELISA (Plate Trapped Antigen – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para confirmação da replicação viral. As plantas sem sintomas, as quais o vírus não foi detectado pelo teste de ELISA, foram re-inoculadas mecanicamente (2x).

Para o teste de PTA-ELISA, as amostras foram coletadas e maceradas individualmente na presença de tampão carbonato (carbonato de sódio 15 mM; bicarbonato de sódio 28 mM; azída sódica 3 mM; pH = 9,6; 1:50 v/v). Foram utilizados dois poços da placa de ELISA por amostra, transferindo-se 100 uL do homogeneizado por poço. Como controle positivo foram utilizadas folhas de plantas não transgênicas infectadas com o CABMV e como controle negativo foram utilizadas plantas não transgênicas e não inoculadas com o patógeno. As placas foram incubadas (15 min; 37 ºC) e lavadas (3x) com solução PBS-T (NaCl 136 mM; KH_2PO_4 1,46 mM; Na_2PO_4 8,1 mM; KCl 2,68 mM; azída sódica 3,07 mM; TWEEN® 20 0,05% w/v). Para a reação, adicionou-se o antissoro contra o CABMV (1 mL), diluído em solução PBS-TPB (1:1000; PBST + PVP 2% + albumina de soro bovino 0,2% w/v) em cada poço incubando-se as placas a 37 ºC (2 h). Após o período de incubação, as placas foram lavadas com solução PBS-T (3x). Em seguida, adicionou-se solução de imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina (100 µL; 1:100 em PBS-TPB) seguindo-se de incubação a 37 ºC (2 h). Após o período de incubação, as placas foram lavadas com solução PBS-T (3x)

seguindo-se da adição de ρ-fosfato de nitrofenil diluído em dietanolamina (100 µL; 0,6 $mg.mL^{-1}$). As leituras das placas foram realizadas após 60 min (405 nm) em um leitor de placas de ELISA (Σ960 Microplate Reader - Metertech, Taipei, Taiwan).

3.3.3 Inoculação pelo vetor *Myzus persicae*

As plantas que não mostraram sintomas após as 3 inoculações mecânicas, foram submetidas à inoculação via afídeos infectados. Colônias de *Myzus persicae* foram estabelecidas em plantas de nabo e cultivadas em gaiolas entomológicas. As colônias foram analisadas e os pulgões foram identificados como *M. persicae* (Sulz.), sob a supervisão do Dr. Valdir Yuki, do instituto Agronômico de Campinas. Os pulgões foram removidos cuidadosamente das folhas de nabo com o auxílio de um pincel e mantidos em jejum (15 min). Após o período de jejum, os pulgões foram transferidos para uma folha de maracujazeiro inoculado com o isolado CABMV-SP, apresentando sintomas severos de infecção da virose do endurecimento dos frutos. Após o período de aquisição (10 min), 15 pulgões foram transferidos para cada planta transgênica com o auxílio de um pincel. Como controle, foram inoculadas 2 plantas não transgênicas de maracujazeiro. A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação pela visualização dos sintomas e determinação da replicação viral pela análise de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*) e RT-qPCR (*Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction)*.

Para extração de RNA total, segmentos de tecido foliar (0,02 g) das plantas inoculadas foram homogeneizados com o produto comercial 'TRIzol®' (1 mL; Invitrogen) com o auxílio de um disruptor de tecidos (TissueLyser II – Qiagen; 30 hz; 3 min) em microtubos (2 mL) contendo 2 esferas de aço inox (Stainless Steel Beads, 5 mm – Qiagen). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente (5 min), seguindo-se a adição de clorofórmio (200 µL). Os tubos foram invertidos (15x) e mantidos à temperatura ambiente (3 min) e então centrifugados (12.000 x *g*; 15 min; 4 ºC). A fase aquosa foi transferida para tubo novo e adicionou-se isopropanol (500 µL). Após esta etapa, continuou-se a extração do RNA com o kit

‘PureLink™ RNA Mini Kit’ (Life Technologies). A remoção do DNA genômico foi realizada utilizando-se o kit ‘PureLink™ DNase Set’ (Life Technologies). A concentração e a qualidade (λ260/280; 2.0 ±1) do RNA nas amostras foi determinada por espectrofotometria (NanoDrop - Thermo Scientific).

Para a síntese de cDNA, primeiramente pipetou-se o RNA (1 µg), Oligo(dT) (0,5 µg), dNTP’s (10 mM) e água (q.s.p. 12 µL). A solução foi incubada (65 ºC; 5 min) e ,em seguida, rapidamente acondicionada em gelo (3 min). Adicionou-se o tampão First-Strand (5x; 4 µL), DDT (0,1 M; 2 µL), RNase Inhibitor (15U – Life Technologies) e a reação foi incubada (37 ºC; 2 min). Adicionou-se a enzima transcriptase reversa M-MLV (200U – Life Technologies) e incubou-se a reação
(37 ºC; 50 min). Após este período a reação foi inativada por aquecimento (70 ºC; 15 min).

Os cDNA’s obtidos a partir destas reações foram submetidos à análise de PCR. A reação constitui-se de: ‘GoTaq® Green Master Mix’ (12,5 µL; PROMEGA – Madison, EUA), cDNA (100 ng), primers (5 pmol), 5’ – GACGCTCAAAGAACAACA – 3’ e 3’ – CAAGCGACAACTCCATATC – 5’ e água (q.s.p. 25 µL) seguindo o programa de 3 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C, 30 s a 72 °C mais 1 ciclo de 4 min a 72 °C, para amplificação de um fragmento de 95 pb do gene HC-Pro (*Helper Component Protein*) do CABMV, o qual não está presente no inserto da construção gênica pCABMV-dsCP, utilizada nos experimentos de transformação genética. Para o controle positivo foi utilizado uma planta não transgênica com sintomas da virose e diagnosticada com o CABMV. Como controle negativo utilizou-se uma planta não transgênica, não inoculada, e água ultrapura.

As análises de RT-qPCR foram realizadas no equipamento ‘7500 Fast™ Real-Time PCR System’ (Applied Biosystems, Foster City, EUA) em placas ‘MicroAmp ® Fast 96-Well Reaction Plate’ (0,1 mL; Applied Biosystems), programado para análise do tipo C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$) utilizando primers específicos para amplificação de um fragmento do gene HC-Pro do CABMV citado acima e como controle endógeno os primers 5’ – ATGTGGGATGTGTGGCAGT – 3’ e 3’ – GTTAAGGATTTGAAGCGTGG– 5’ amplificando um fragmento do gene EF1a2 utilizando-se 2 réplicas técnicas por amostra. Como controle positivo foi utilizado

uma planta não transgênica com sintomas da virose e diagnosticada com o CABMV. Como controle negativo utilizou-se uma planta não transgênica, não inoculada e água ultrapura.

As reações foram conduzidas utilizando-se 10 ng do cDNA diluído (10 $ng.\mu L^{-1}$), primers (1,5 pmol), Fast SYBR Green Master Mix (7,5 µL) (Applied Biosystems) e água (q.s.p. 15 µL). O programa utilizado para amplificação foi o padrão do equipamento no modo FAST, 20 s a 95 ºC, seguido de 40 ciclos de 3 s a 95 ºC e 30 s a 60 ºC. O ponto de fusão médio dos amplicons foi determinado pela análise de melting submetendo-se as amostras a 95 ºC por 15 s, aquecendo-as gradativamente (60 - 95 ºC), com taxa de aquecimento de 0,3 $ºC.s^{-1}$ e ,em seguida, mantendo-as a 60 ºC. Para as análises comparativas, a amostra com o valor de C_T mais alto para o gene HC-Pro foi selecionada como amostra de referência. Os valores de quantificação relativa (RQ) em escala Log_{10} foram utilizados para análise e geração do gráfico.

3.3.4 Recuperação biológica do CABMV

As plantas indicadoras *Chenopodium quinoa* e *C. amaranticolor*, que reagem com lesão local ao CABMV, e plantas de *P*. alata não transgênicas, foram inoculadas com macerado de folhas das plantas transgênicas assintomáticas após a quarta inoculação, para confirmação da ausência do vírus nestas plantas. O inóculo foi preparado pelo macerado de fragmentos de folhas de diferentes regiões de cada uma das plantas selecionadas em tampão fosfato de potássio (0,02 M; pH = 7,0; 1:50 w/v). As plantas foram inoculadas mecanicamente conforme descrito no item 3.3.2. Como controle positivo utilizou-se um macerado preparado a partir de folhas de uma planta infectada com o CABMV. As plantas foram mantidas em condição de casa-de-vegetação e a avaliação foi realizada 20 dias após inoculação, com base na visualização de sintomas.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização molecular das plantas matrizes

4.1.1 Identificação de plantas transgênicas por análise de PCR

Os experimentos de transformação genética de *P. alata*, com a construção gênica pCABMV-dsCP, foram realizados por Pinto (2010) tendo sido obtidas 48 plantas, as quais foram aclimatizadas para condição de casa-de-vegetação.

A análise de PCR realizada com estas plantas permitiu a identificação de 22 linhagens contendo o fragmento do gene CP do CABMV (162 pb). A Figura 2 mostra o resultado desta análise com 21 plantas as quais o fragmento do gene CP do CABMV foi detectado por PCR.

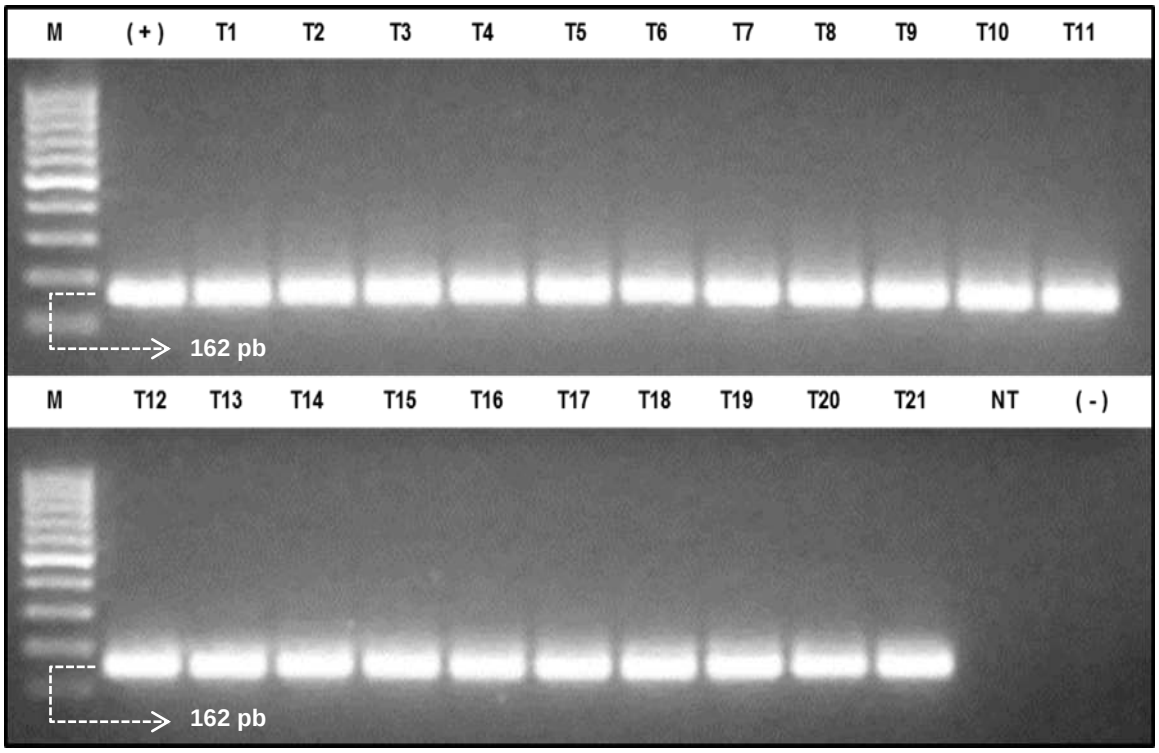

Figura 2 – Análise de PCR de plantas de *P. alata* regeneradas de experimentos de transformação genética com a construção gênica pCABMV-dsCP. M: marcador de peso molecular 100 pb (PROMEGA); (+): controle positivo (plasmídeo contendo a construção gênica pCABMV-dsCP purificado); T1 – T21: plantas analisadas; NT: planta não transgênica; (-): água (controle negativo).

Os fragmentos amplificados foram purificados e sequenciados a fim de confirmar a identidade com o transgene. A partir dos resultados obtidos, as sequências foram montadas utilizando o software DNA Baser (Heracle Biosoft – Pitesti, Romênia) e os contigs obtidos foram analisados utilizando-se algorítimo BLAST/NCBI (*Basic Local Alignment Search Tool – National Center of Biotechnology Information,* EUA - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), como mostra a Figura 3.

TGCTGGACGAAGACAAGATGGGTGTTATCATGAATGGGTTCATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACTCCACCTGATGTGAAT
GGAGTGTGGACAATGATGGATGGGGACGAGCAAGTGGAATTTCCGCTCAAGCCCATCGTGGAAAACGCAAAACCCAC

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate Alvinlandia-SP coat protein mRNA, partial cds	215	215	99%	8e-53	99%	KC777404.1
Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate Fernao-SP coat protein mRNA, partial cds	215	215	99%	8e-53	99%	KC777403.1
Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate Jacupiranga-SP coat protein mRNA, partial cds	215	215	99%	8e-53	99%	KC777402.1
Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate Adamatina-SP coat protein mRNA, partial cds	215	215	99%	8e-53	99%	KC777401.1
Cowpea aphid-borne mosaic virus strain CABMV-SP coat protein mRNA, partial cds	215	215	99%	8e-53	99%	AY433950.1
Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate SE1 polyprotein mRNA, partial cds	215	215	99%	8e-53	99%	AY253911.1
Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate GARCA-SP coat protein mRNA, partial cds	209	209	99%	4e-51	98%	KC777405.1
Cowpea aphid-borne mosaic virus strain CABMV-M3 coat protein gene, partial cds	193	193	99%	4e-46	96%	AY434454.1

Figura 3 – Valores de identidade da sequência de nucleotídeos de fragmento amplificado na análise de PCR, com diferentes isolados do CABMV analisado pelo algoritmo BLAST/NCBI.

A análise dos resultados obtidos no sequenciamento mostra que os fragmentos amplificados possuem 99% de identidade com o mRNA que codifica a proteína capsidial de diferentes isolados do CABMV, confirmando a transgenia.

4.1.2 Análise de Southern blot

As plantas identificadas como transgênicas pela análise de PCR foram analisadas por Southern blot para confirmação da integração e determinação do número de eventos de inserção do transgene.

As análises foram repetidas diversas vezes utilizando-se sonda para detecção do gene CP, variando diferentes fatores, como quantidade de DNA, endonuclease para digestão, distância de migração dos fragmentos no processo de eletroforese, método de transferência e método de extração de DNA, porém os resultados não foram satisfatórios. Embora o sequenciamento dos fragmentos amplificados na análise de PCR tenha mostrado identidade com o gene CP do CABMV, não foi possível detectar bandas de hibridização nas análises de Southern blot realizadas com sonda para detecção deste fragmento. Pela análise da Figura 4, pode-se verificar bandas de hibridização com o controle positivo (0,1 ng da sonda para o gene CP) e com a planta transgênica de maracujazeiro T16, proveniente do trabalho de Trevisan (2005), indicando que as análises foram conduzidas sem erros metodológicos.

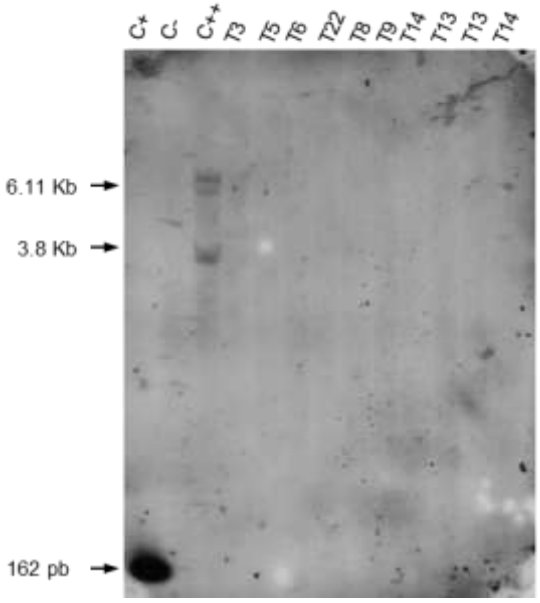

Figura 4 – Análise de Southern blot de plantas de *P. alata*, com sonda para detecção do gene CP, regeneradas de experimentos de transformação genética com a construção gênica pCABMV-dsCP e identificadas como transgênicas por PCR. C+: controle positivo para o gene CP (produto de PCR purificado); C-: controle negativo (planta não transgênica); C++: controle positivo (planta transgênica T16).

A confirmação da integração do transgene pela técnica de Southern blot foi repetida utilizando-se sonda para detecção do gene de seleção *npt*II. A análise da Figura 5, permite verificar a presença de bandas de hibridização em 11 plantas analisadas mostrando de 1-2 eventos de inserção. Pelo perfil de hibridização, pode-

se verificar que as plantas são provenientes de diferentes eventos de transformação genética.

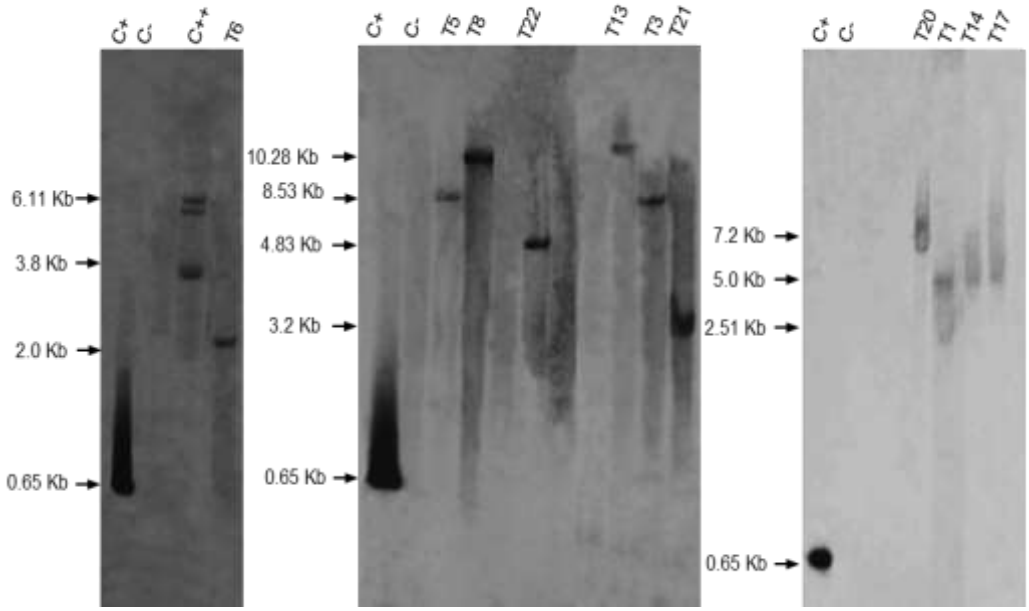

Figura 5 – Análise de Southern blot de plantas de *P. alata*, com sonda para detecção do gene *npt*II, regeneradas de experimentos de transformação genética com a construção gênica pCABMV-dsCP, e identificadas como transgênicas por PCR. C+: controle positivo para o gene *npt*II (produto de PCR purificado); C-: controle negativo (planta não transgênica); C++: controle positivo (planta trasngênica T16).

4.2 Avaliação de resistência ao CABMV

A propagação das plantas foi realizada com sucesso obtendo-se 4 clones de 21 linhagens transgênicas selecionadas. Os clones foram mantidos em casa-de-vegetação e então inoculados com o CABMV.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos na avaliação de resistência das plantas transgênicas, após 3 inoculações mecânicas e 1 inoculação via vetor.

Tabela 1 – Avaliação de resistência ao CABMV em linhagens transgênicas de *P*. alata.

(continua)

linhagem	clone	Inoculação								
		1		2		3		4		
		S[1]	E[2]	S	E	S	E	S	RT-PCR[3]	RT-qPCR[4]
T1	I	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	II	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	III	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	IV	-	-	-	-	+	+	...	...	...
T2	I	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	II	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	III	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	IV	+	+	...	...	...	...	...	...	...
T3	I	-	-	+	+	...	...	...	...	...
	II	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	III	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	IV	-	-	+	+	...	...	...	...	...
T4	I	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	II	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	III	-	-	+	+	...	...	...	...	...
	IV	-	-	+	+	...	...	...	...	...
T5	I	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	II	-	-	+	+	...	...	...	...	...
	III	+	+	...	...	...	...	...	...	...
	IV	-	-	-	-	+	+	...	...	...
T6	I	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	II	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	III	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	IV	-	-	-	-	+	+	...	...	...
T7	I	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	II	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IV	-	-	-	-	+	+	...	...	...
T8	I	-	-	+	+	...	...	...	...	...
	II	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	III	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	IV	-	-	-	-	-	-	+	...	...
T9	I	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	II	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	III	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	IV	-	-	-	-	+	+	...	...	...

Tabela 1 – Avaliação de resistência ao CABMV em linhagens transgênicas de *P.* alata

(continuação)

linhagem	clone	Inoculação								
		1		2		3		4		
		S	E	S	E	S	E	S	RT-PCR	qPCR
T10	I	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	II	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	III	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	IV	-	-	-	-	-	-	+	...	...
T11	I	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	II	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	III	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	IV	-	-	-	-	-	-	+	...	...
T12	I	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	II	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	III	-	-	-	-	-	-	+	...	...
	IV	-	-	-	-	-	-	+	...	...
T13	I	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	II	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	III	-	-	+	+	...	...	...	...	...
	IV	-	-	+	+	...	...	...	...	...
T14	I	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	II	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	III	-	-	+	+	...	...	...	...	...
	IV	-	-	-	-	+	+	...	...	...
T15	I	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	II	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	III	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	IV	-	-	-	-	+	+	...	...	...
T16	I	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	II	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	III	+	+	...	...	...	...	...	...	...
	IV	-	-	-	-	+	+	...	...	...
T17	I	-	-	+	+	...	...	...	...	...
	II	-	-	-	-	+	+	...	...	...
	III	+	+	...	...	...	...	...	...	...
	IV	-	-	-	-	+	+	...	...	...
T18	I	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	IV	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Tabela 1 – Avaliação de resistência ao CABMV em linhagens transgênicas de *P.* alata

(conclusão)

linhagem	clone	Inoculação								
		1		2		3		4		
		S	E	S	E	S	E	S	RT-PCR	qPCR
T19	I	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	IV	+	+	.....						
T20	I	-	-	-	-	-	-	+	.....	
	II	-	-	-	-	-	-	+	.....	
	III	-	-	-	-	-	-	+	.....	
	IV	-	-	-	-	-	-	+	.....	
T21	I	-	-	-	-	-	-	+	.....	
	II	-	-	-	-	+	+	.....		
	III	-	-	-	-	-	-	+	.....	
	IV	-	-	-	-	-	-	+	.....	
Cn[9]	I	-	0,186	-	0,098	-	0,125	-	.....	
Cpi[6]	I	+	0,587	+	0,243	+	0,301	+	.....	
Cpf[7]	I	+	0,569	+	0,212	+	0,286	+	.....	
Cp[8]	I	+	0,634	+	0,249	+	0,340	+	.....	

[1] **S** = Planta inoculada com presença (+) ou ausência (-) de sintomas causados pelo CABMV.
[2] **E** = Planta positiva (+) ou negativa (-) para análise de ELISA, considerada infectada quando o valor da absorbância (A_{405nm}) ≥ 2x**Cn**.
[3] **RT-PCR** = Planta positiva (+) ou negativa (-) na análise de RT-PCR para detecção do CABMV.
[4] **RT-qPCR** = Planta positiva (+) ou negativa (-) na análise de RT-qPCR para detecção do CABMV.
[5] **Cn** = Planta não transgênica, não inoculada.
[6] **Cpi** = Controle positivo inicial – planta não transgênica inoculada no início das inoculações.
[7] **Cpf** = Controle positivo final – planta não transgênica inoculada no final das inoculações.
[8] **Cp** = Controle positivo – planta não transgênica infectada com o CABMV utilizada como fonte de inóculo.

O resultado da primeira inoculação mecânica mostra que, em 16 das 21 linhagens transgênicas inoculadas, nenhum dos 4 clones apresentava sintomas causados pelo CABMV. As linhagens T2, T5, T16, T17 e T19 apresentaram 1 clone infectado cada. A análise de ELISA nas plantas inoculadas confirmou a presença do CABMV nas plantas sintomáticas, com valores de A_{405nm} variando de 0,124 a 0,627. As plantas não transgênicas inoculadas (Cpi e Cpf) apresentaram sintomas da doença, com valores de A_{405nm} variando de 0,569 a 0,587 e a planta não transgênica infectada, utilizada como fonte de inóculo (Cp), mostrou valores médios de A_{405nm} = 0,634. O controle negativo não apresentou sintomas da doença e o vírus não foi detectado pela análise de ELISA (A_{405nm} = 0,186). As leituras das amostras com valores de A_{405nm} maior ou igual a 0,372 (A_{405nm} ≥ 2xCn) foram consideradas

infectadas e descartadas. As plantas remanescentes foram podadas para o desenvolvimento de novas brotações e realização da segunda inoculação.

Após a segunda inoculação, a porcentagem de linhagens que mantiveram 4 clones não infectados caiu para 52.38%, sendo 11 linhagens (T1, T6, T7, T9, T10, T11, T12, T15, T18, T20, T21), 5 linhagens com 1 clone infectado (T2, T8, T14, T16, T19) e 5 linhagens com 2 clones infectados (T3, T4, T5, T13, T17). A confirmação da infecção pelo CABMV nas plantas inoculadas pela análise de ELISA mostrou valores de A_{405nm} entre -0,016 a 0,528. As plantas não transgênicas inoculadas apresentaram sintomas da doença e valores de A_{405nm} na análise de ELISA variando de 0,212 e 0,243 e na planta Cp, o valor médio de A_{405nm} foi de 0,249. Não foi observado sintomas do CABMV na planta Cn (controle negativo), a qual apresentou valores médios de A_{405nm} = 0,098 para análise de ELISA. As plantas que apresentaram valores de A_{405nm} maior ou igual a 0,196 foram consideradas infectadas e descartadas. As plantas remanescentes foram podadas e inoculadas novamente após o surgimento de novas brotações.

A porcentagem de linhagens com 4 clones não infectados caiu para 9,52% após a terceira inoculação. Do total geral de linhagens avaliadas, 7 linhagens ainda apresentavam somente 1 clone infectado (T6, T7, T10, T11, T12, T19, T21), 7 linhagens foram detectadas com 2 clones infectados (T1, T2, T4, T8, T9, T13, T14) e 1 linhagem com 3 clones infectados (T15). Em 4 linhagens, todos os clones foram diagnosticados como infectados (T3, T5, T16, T17) restando somente 2 linhagens com os 4 clones não infectados (T18 e T20). A detecção das partículas virais pela análise de ELISA mostrou valores de A_{405nm} variando entre 0,007 a 0,350. Para a planta Cp o valor médio de absorbância foi de A_{405nm} = 0,340. As plantas não transgênicas inoculadas mostraram sintomas característicos da infecção pelo CABMV e valores de A_{405nm} variando de 0,281 e 0,301. A planta Cn não apresentou sintomas de infecção pelo CABMV e valor de A_{405nm} = 0,125. As amostras com A_{405nm} maior ou igual 0,250 foram consideradas infectadas e descartadas. As plantas foram novamente podadas para a realização da quarta inoculação.

Nas inoculações mecânicas, , as novas brotações apresentavam o sintoma de mosaico foliar evoluindo para mosaico foliar severo, podendo ser acompanhado de encarquilhamento e bolhosidades 30 dias após a inoculação.

Após a quarta inoculação, realizada com o vetor *M. persicae*, 20 plantas inoculadas não mostraram sintomas do CABMV, sendo os clones T1(I), T4(I), T4(II), T7(I), T7(II), T7(III), T9(I), T9(II), T13(I), T13(II), T14(I), T14(II), T15(I), T18(I), T18(II), T18(III), T18(IV), T19(I), T19(II) e T19(III). A análise de RT-PCR realizada nas plantas assintomáticas, detectou a presença do vírus em 17 plantas (Figura 6).

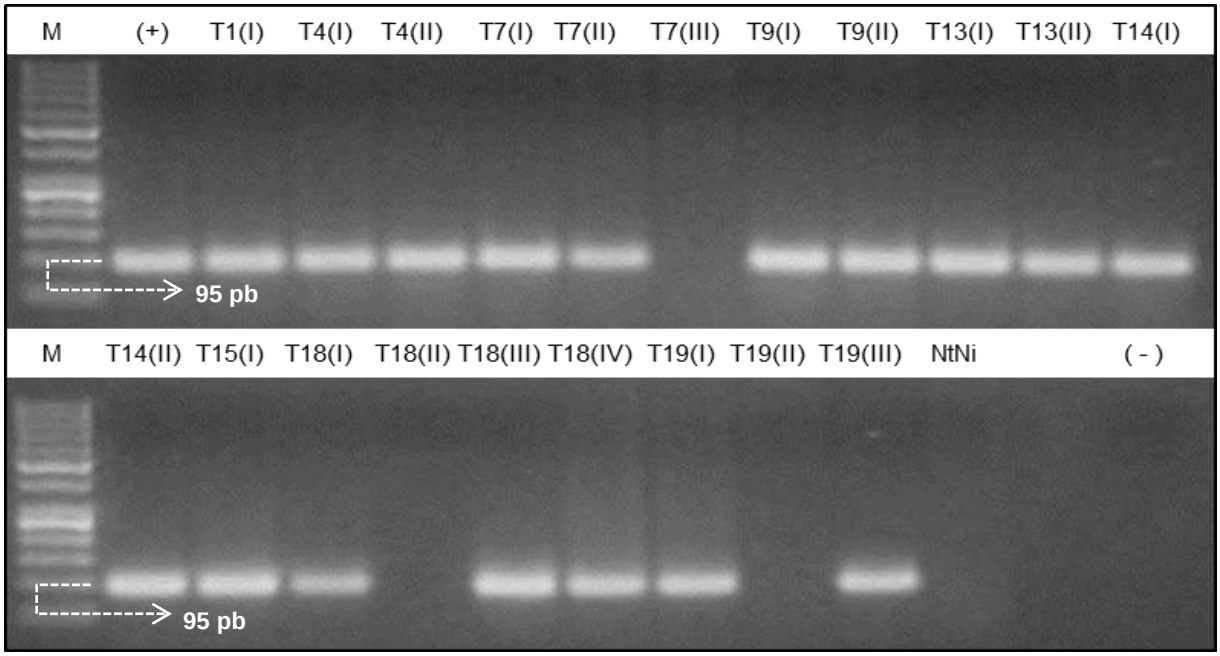

Figura 6 – Análise de RT- PCR de plantas assintomáticas após a 4ª inoculação, com primers específicos para detecção do CABMV. M: marcador de peso molecular 50 pb; (+): planta não transgênica infectada (controle positivo); Tn(x): clones assintomáticos selecionados; NtNi: planta não transgênica não inoculada.

As plantas assintomáticas foram analisadas por RT-qPCR (Figura 7) e a ausência de partículas virais foi confirmada nas plantas transgênicas T7(III), T18(II) e T19(II). O vírus foi detectado nas plantas transgênicas T7(II), T14(I) e T18(I) porem em baixa concentração, sendo que a planta T7(II) foi utilizada como amostra de referência por mostrar o maior valor de C_T.

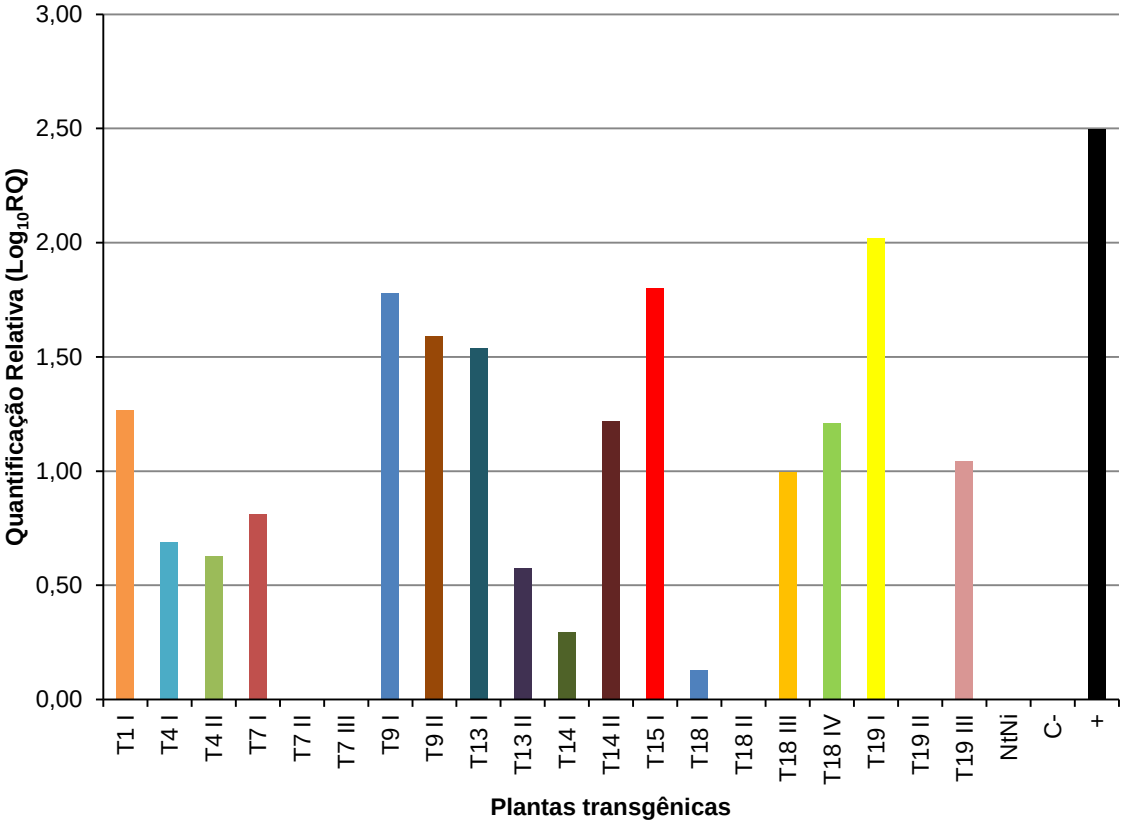

Figura 7 – Análise de RT-qPCR de plantas transgênicas de *P. alata* para detecção do gene HC-Pro do CABMV, após a 4ª inoculação com o patógeno. Tn(x): clones avaliados; NtNi: planta não transgênica não inoculada (controle negativo); C-: água (controle negativo); +: planta não transgênica infectada (controle positivo). A planta transgênica T7(II) foi selecionada como amostra de referência por demonstrar o maior valor de C_T (39.678).

Nos testes de inoculação via afídeos virulíferos, os sintomas de mosaico foliar foram observados somente 25 dias após a inoculação em 9 linhagens. As linhagens que foram classificadas como não sintomáticas para a doença do endurecimento dos frutos, mas o vírus foi detectado pelas análises de RT-PCR e RT-qPCR, mostraram sintomas 60 dias após a inoculação.

A Figura 8a mostra uma planta não transgênica e não inoculada, uma planta transgênica sem sintomas inoculada 4 vezes com o CABMV (Figura 8b, clone T7(III)) e uma planta não transgênica inoculada com o CABMV 30 dias após a inoculação (Figura 8c).

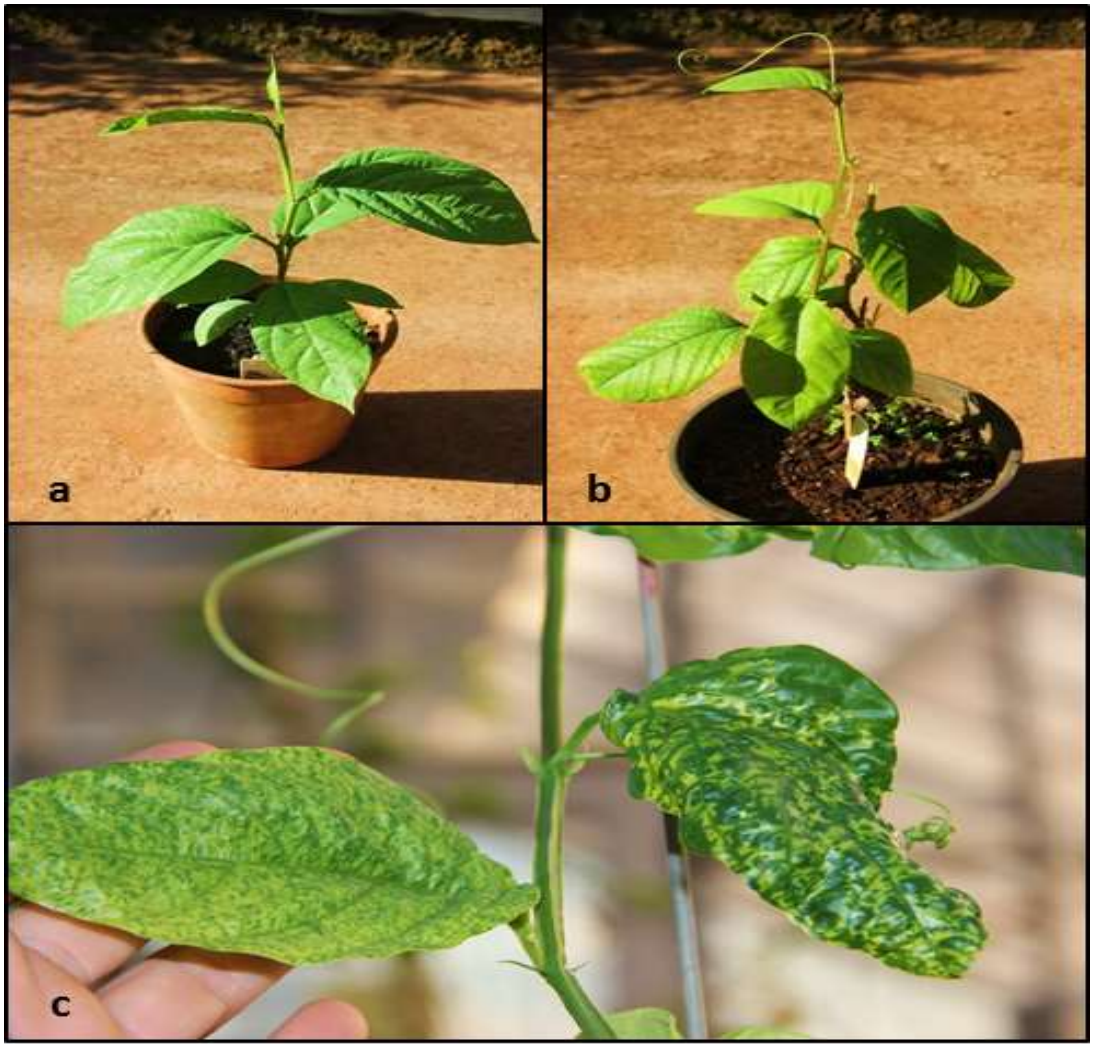

Figura 8 – Reação de plantas transgênicas e não transgênicas ao CABMV. a: planta não transgênica não inoculada; b: planta transgênica T7(III) após 4 inoculações com o CABMV; c: planta não transgênica inoculada com o CABMV apresentando sintomas característicos a infecção com o CABMV.

4.3 Recuperação biológica do CABMV

Os testes para recuperação biológica do CABMV mostraram que os macerados preparados com folhas das plantas transgênicas assintomáticas (T7(III), T8(II) e T19(II)), as quais o vírus não foi detectado pelas análises de RT-PCR e RT-qPCR, não infectaram as plantas indicadoras e as plantas de maracujazeiro inoculadas, tendo somente as plantas que foram inoculadas com o macerado da planta infectada, mostrado sintomas de infecção pelo CABMV, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Avaliação de recuperação biológica do CABMV a partir de plantas transgênicas de *P. alata* assintomáticas após 4 inoculações com o patógeno.

	linhagem			
planta Indicadora	**T7(III)**	**T8(II)**	**T19(II)**	**controle +**
C. quinoa	-	-	-	+
C. amaranticolor	-	-	-	+
P. alata	-	-	-	+

As plantas indicadoras e a planta não transgênica de *P. alata*, quando inoculadas com o macerado de folhas infectadas com o CABMV mostraram lesão local e sintomas característicos da doença do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, respectivamente. Em *C. quinoa* observou-se o aparecimento de lesões locais 20 dias após a inoculação (Figura 9a). As Figuras 9b-d mostram plantas inoculadas com os macerados das plantas transgênicas T7(III), T8(II) e T19(II), respectivamente.

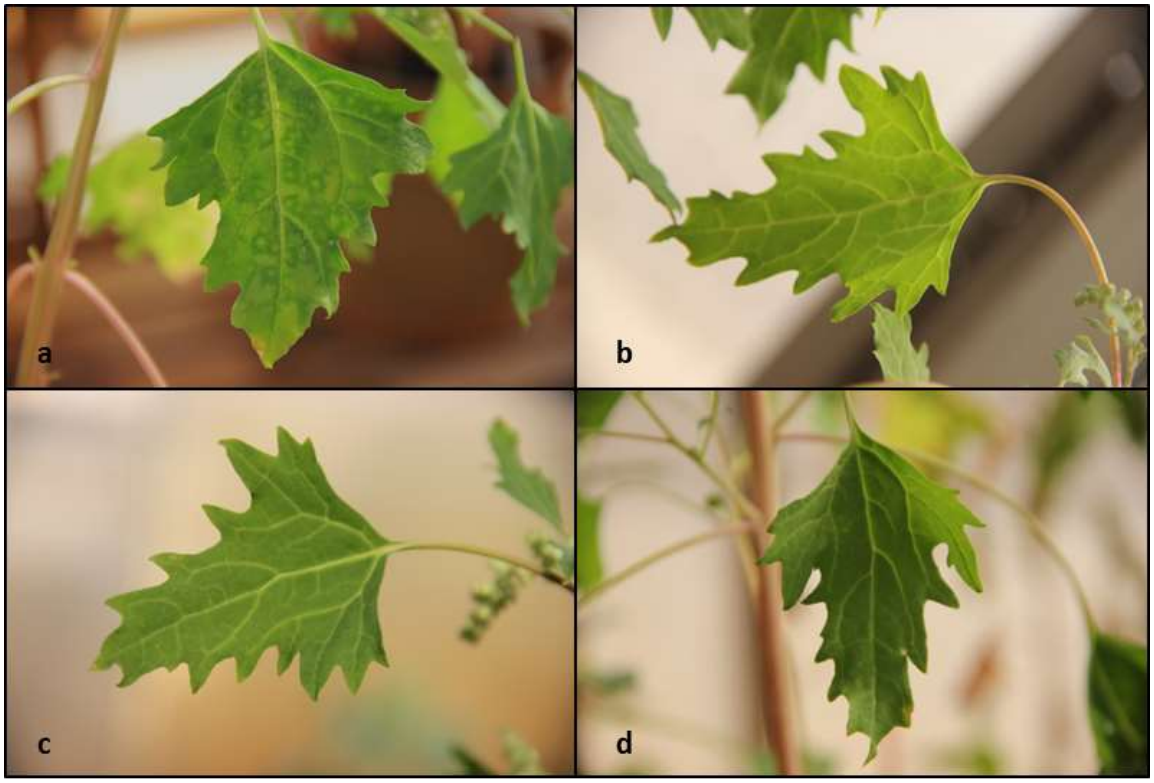

Figura 9 – Recuperação biológica do CABMV em *C. quinoa,* 20 dias após a inoculação. a: planta controle com sintomas de lesão local inoculada com macerado de planta infectada com o CABMV; b: planta inoculada com o macerado do clone T7(III); c: planta inoculada com o macerado do clone T18(II); d: planta inoculada com o macerado do clone T19(II).

Em *C. amaranticolor* as lesões locais no controle apareceram 15 dias após inoculação (Figura 10a). As Figuras 10b-d mostram plantas inoculadas com os macerados das plantas transgênicas T7(III), T8(II) e T19(II), respectivamente.

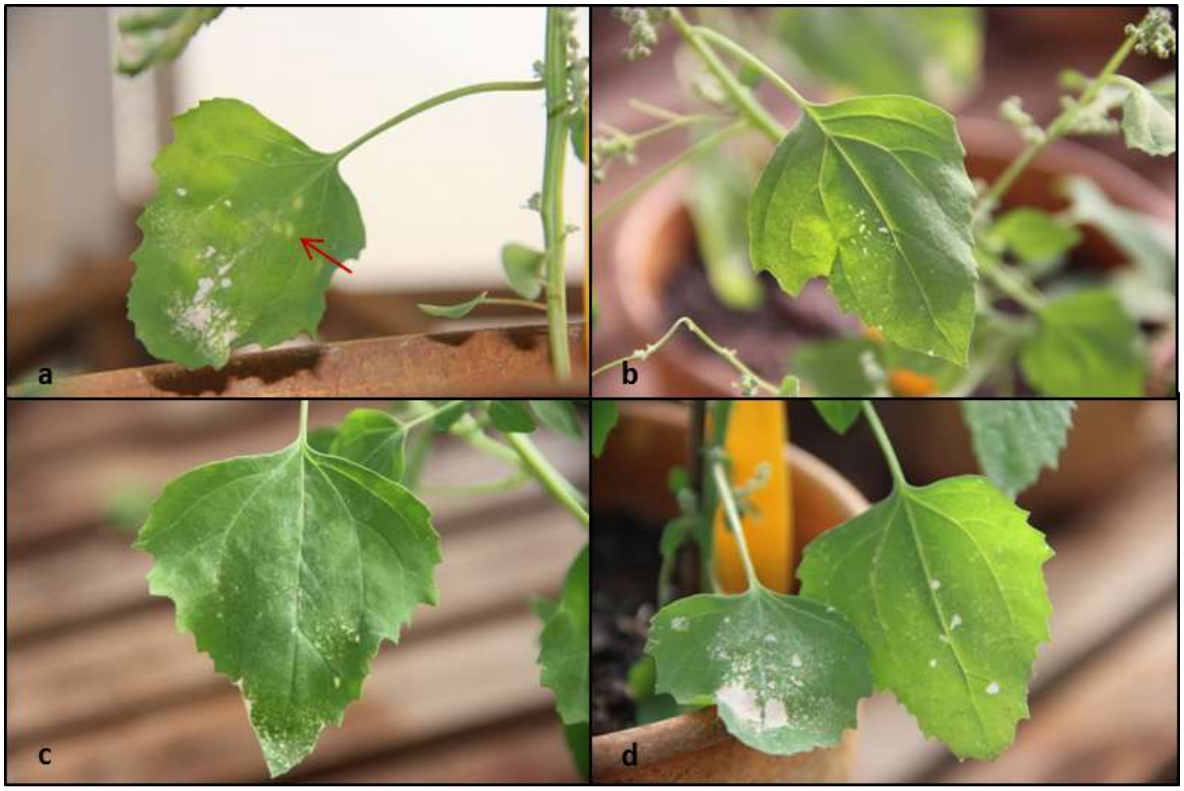

Figura 10 – Recuperação biológica do CABMV em *C. amaranticolor,* 15 dias após a inoculação. a: planta controle com sintomas de lesão local inoculada com macerado de planta infectada com o CABMV; b: planta inoculada com o macerado do clone T7(III); c: planta inoculada com o macerado do clone T18(II); d: planta inoculada com o macerado do clone T19(II).

A planta não transgênica de *P. alata* inoculada com macerado de planta infectada, mostrou sintomas característicos de infecção com o CABMV, como clareamento de nervura e mosaico, 10 dias após a inoculação (Figura 11a). As Figuras 11b-d mostram plantas inoculadas com os macerados das plantas transgênicas T7(III), T8(II) e T19(II), respectivamente.

Figura 11 – Recuperação biológica do CABMV em *P. alata,* 10 dias após a inoculação. a: planta controle com sintomas da doença do endurecimento dos frutos, inoculada com macerado de planta infectada com o CABMV; b: planta inoculada com o macerado do clone T7(III); c: planta inoculada com o macerado do clone T18(II); d: planta inoculada com o macerado do clone T19(II).

5 DISCUSSÃO

O objetivo de obter plantas transgênicas resistentes à doenças está presente já nos primeiros trabalhos realizados em engenharia genética de plantas. A transformação genética visando resistência à doenças causadas por vírus têm mostrado resultados promissores e considerando o número de estratégias que foram desenvolvidas para produção de plantas resistentes à doenças, este enfoque pode ser considerado um dos de maior sucesso na biotecnologia vegetal (PRINS et al., 2008).

Em relação às doenças de plantas causadas por fungos e bactérias, os resultados obtidos até o momento mostram sempre plantas com resistência parcial ao patógeno, que ainda não evoluíram para variedades comerciais (COLLINGE; LUND; THORDAL-CHRISTENSEN, 2008; COLLINGE et al., 2010; BOSCARIOL et al., 2006; MENDES et al., 2010). No entanto, a transformação genética visando à produção de plantas resistentes à doenças causadas por vírus, permitiu a liberação comercial de cultivares de mamoeiro resistente ao *Papaya ringspot virus*, de ameixeira resistente ao *Plum pox virus*, de batata resistente ao *Potato leaf roll virus*, de abobrinha resistente ao *Zucchini yellow mosaic virus* e ao *Cucumber mosaic virus*, outra de abobrinha resistente ao *Zucchini yellow mosaic virus*, ao *Cucumber mosaic virus* e *Watermelon mosaic virus*, de pimentão e de tomateiro resistentes ao *Cucumber mosaic virus,* e de feijoeiro resistente ao *Bean golden mosaic virus* (ISAAA, 2014b). Estes resultados estimularam e nortearam o estudo envolvendo o patossistema *Passiflora*/*Cowpea aphid-borne mosaic virus*.

Os trabalhos de transformação genética de maracujazeiro visando resistência ao CABMV iniciaram com *P. edulis* permitindo a seleção declones resistentes de 2 linhagens transgênicas R_0 (T2 e T16) resistentes ao patógeno (TREVISAN et al., 2006; MONTEIRO-HARA et al., 2011). A avaliação das gerações R_1 e R_2, da linhagem T16 confirmou a manutenção da resistência ao CABMV, após inoculações mecânicas e pelo vetor do patógeno (MONTEIRO-HARA, 2010).

A identificação de plantas transgênicas é normalmente realizada por PCR, inclusive em maracujazeiro (MONTEIRO, 2005; TREVISAN, 2006; MONTEIRO-HARA, 2010; PINTO, 2010) e a confirmação da integração e determinação do

número de eventos de inserção é feita pela análise de Southern blot. No entanto, neste trabalho as análises de PCR e Southern blot apresentaram problemas. Para certificar que o gene CP do CABMV havia sido integrado ao genoma das plantas, os fragmentos amplificados por PCR foram sequenciados e a análise de Southern blot foi realizada com sonda para o gene *npt*II. Dificuldades na amplificação do fragmento do gene de interesse por PCR e a utilização de sonda alternativa, a qual não é homóloga com o gene de interesse, porém hibridiza com outra região da construção gênica, também foram relatadas para eucalipto (GONZÁLEZ, 2002).

Dificuldades nas análises moleculares para identificação de plantas transgênicas de maracujazeiro também foram relatadas por Pinto (2010) trabalhando com *P. alata,* e por Monteiro-Hara (2010) trabalhando com *P. edulis* f. *flavicarpa* var. FB100. Estes problemas na caracterização molecular de plantas transgênicas de maracujazeiro surpreenderam os autores, já que estas dificuldades não foram relatadas em trabalhos anteriores realizados no mesmo laboratório (TREVISAN, 2005; TREVISAN et al., 2006). Cabe ressaltar que embora estes trabalhos tenham sido realizados no mesmo laboratório, as variedades de *P. edulis* utilizadas eram IAC-277 e IAC-275, as construções gênicas utilizadas foram pCABMV-sCP e pCABMV-asCP contendo o gene da proteína capsidial do CABMV, e discos foliares foram utilizados como explantes nos experimentos de transformação genética. Os trabalhos de Monteiro-Hara (2010) e Pinto (2010) foram realizados utilizando-se segmentos de hipocótilo como explantes, a construção gênica pCABMV-dsCP, que contém um fragmento do gene da proteína capsidial numa construção tipo *hairpin,* e a variedade FB100 de *P. edulis*. Estas diferenças citadas podem estar relacionadas às dificuldades na caracterização molecular das plantas.

A avaliação de plantas transgênicas R_0 visando resistência a vírus já foi relatada para diversas culturas (MONTEIRO-HARA et al., 2010; WU et al., 2009; BONFIM et al., 2007; TREVISAN et al., 2006). Os resultados geralmente mostram linhagens transgênicas com diferentes níveis de resistência ou imunidade ao vírus. Outra característica destas análises, é que de maneira geral, plantas clonadas da mesma linhagem transgênica apresentam uma resposta variável podendo ser classificadas como suscetíveis, altamente resistentes ou imunes ao patógeno (WU et al., 2009; LÓPEZ et al., 2010). Nos testes de inoculação deste trabalho, das 21 linhagens transgênicas R_0 avaliadas, apenas 3 apresentaram um clone

assintomático, nos quais a replicação viral não foi detectada após quatro inoculações com o patógeno. No caso específico de *P. edulis*, este fenômeno também foi observado (TREVISAN et al., 2006; MONTEIRO-HARA, 2011), tendo sido selecionados apenas alguns clones resistentes ao CABMV, isto é, plantas que se apresentaram assintomáticas e a replicação do vírus não foi detectada.

O silenciamento de RNA consiste na supressão da expressão gênica por interações sequência-específicas que são mediadas por pequenos RNAs interferentes (siRNAs) de 21-23 nucleotídeos derivados de um precursor maior de RNA dupla fita (dsRNA) (RUIZ; VOINNET; BAULCOMBE, 1998; ZAMORE et al., 2000; BERNSTEIN et al., 2001). O mecanismo de defesa de plantas contra vírus está associado com a produção de dsRNA e construções gênicas do tipo *hairpin* estão sendo empregadas visando favorecer a indução do silenciamento gênico em plantas transgênicas (SHIMURA; PANTALEO, 2011). No entanto, a presença de supressores do silenciamento gênico tem sido relatada para diversos vírus, os quais funcionam como um mecanismo de defesa do vírus, suprimindo os efeitos antivirais do silenciamento gênico (ROTH; PRUSS; VANCE, 2004). Este mecanismo está geralmente associado a proteínas produzidas por cada espécie de vírus (VARGASON; BURCH; WILSON, 2013).

No caso do CABMV, um potyvirus, a proteína HC-Pro foi identificada como sendo um supressor do silenciamento gênico, tanto para o silenciamento gênico induzido por vírus quanto induzido por transgenes, reduzindo a acumulação de siRNA no citoplasma (ANANDALAKSHMI et al., 2000; KASSCHAU; CARRINGTON, 1998). A redução dos siRNAs, acompanhado do simultâneo acúmulo de longos dsRNA, sugere que a HC-Pro altera a atividade da enzima que produz siRNAs a partir de longos dsRNAs (MLOTSHWA et al., 2005). Genes supressores do silenciamento do RNA já foram identificados em outros gêneros de vírus, como em Carmovirus (CP), Closterovirus (p20, p21, p22, p23, p25), Cucumovirus (2b), Geminivirus (AC2 e C2), Potexvirus (p25), Tospovirus (p25) entre outros (ROTH; PRUSS; VANCE, 2004; FLORES et al., 2013).

Folimonova et al. (2008) e Lu et al. (2004) sugerem que em plantas de citros transgênicas visando resistência ao *Citrus tristeza virus* (CTV), com construções gênicas que favorecem o silenciamento gênico, a variação do nível de resistência

entre os clones propagados a partir de uma mesma linhagem transgênica, pode ser resultado da complexa interação entre o silenciamento gênico pós-transcricional ativo nas plantas, o estado fisiológicoe a resposta ao silenciamento desempenhada pelo CTV, através de seus três genes supressores de silenciamento p20, p23 e p25. O mesmo fenômeno sugerido acima pode estar sendo desencadeado nas plantas transgênicas de *P*. *alata* inoculadas com o CABMV, porém mediado pela proteína HC-Pro, o que levaria a ocorrência da resistência parcial das linhagens.

Outro fator que pode influenciar a avaliação da resistência de plantas a doenças causadas por vírus é o método de inoculação utilizado. Inoculações mecânicas são consideradas drásticas, podendo danificar o tecido foliar devido ao uso de abrasivos, a ponto de impedir a penetração do vírus na célula reduzindo a taxa de infecção das plantas inoculadas. A inoculação pelo vetor, embora mais trabalhosa, reproduz as condições naturais de infecção. Monteiro-Hara et al. (2012) mostrou que clones da linhagem transgênica T2, selecionados como resistentes ao CABMV, após 3 inoculações mecânicas (TREVISAN et al., 2006), foram infectadas pelo vírus quando inoculadas pelo vetor. Neste trabalho, clones de *P. alata* que se mantinham assintomáticos e a replicação viral não foi detectada pelo teste de ELISA, foram infectadas pelo CABMV após uma inoculação via vetor.

O processo de produção de plantas transgênicas resistentes à doenças pode ser considerado longo, envolvendo diferentes etapas como a obtenção das plantas, a caracterização molecular das plantas regeneradas e a propagação e avaliação de resistência ao patógeno para possível seleção de clones resistentes. Este trabalho descreve atividades das etapas de caracterização molecular e avaliação de resistência de plantas de *P. alata* ao CABMV. Foram selecionados clones assintomáticos de 3 linhagens transgênicas diferentes, os quais a replicação do vírus não foi detectada pelas análises de RT-PCR, RT-qPCR. Também não foi possível recuperar o vírus inoculado nessas plantas quando seus extratos foliares foram inoculados em plantas de *C. amaranticolor*, *C. quinoa e P. alata*. Sendo o maracujazeiro uma espécie que apresenta alta taxa de auto-incompatibilidade, a disponibilidade de plantas de diferentes origens para o avanço das gerações é muito importante.

As plantas selecionadas serão propagadas, via estaquia, autofecundadas ou por fecundação cruzada, com plantas transgênicas e não transgênicas, para obtenção das progênies R_1 e R_2, as quais serão avaliadas em condições naturais de infecção.

6 CONCLUSÃO

Foram identificadas plantas transgênicas de *P. alata* contendo o fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV. A avaliação de resistência destas plantas ao CABMV, permitiu a seleção de 3 clones assintomáticos de 3 diferentes linhagens transgênicas, onde a replicação do vírus não foi detectada.

REFERÊNCIAS

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**, Washington, DC, v. 232, p. 738-743, 1986.

ALFENAS, P. F.; BRAZ, A. S. K.; TORRES, L. B.; SANTANA, E.; NASCIMENTO, V. S.; CARVALHO, M. G.; OTONI, W. C.; ZERBINI, F. M. Transgenic passion fruit expressing RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* is resistant to passion fruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 33-38, 2005.

ANANDALAKSHMI, R.; MARATHE, R.; GE, X.; HERR JUNIOR, J. M.; MAU, C.; MALLORY, A.; PRUSS, G.; BOWMAN, L.; VANCE, V. B. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, Washington, DC, v. 290, p. 142–144, 2000.

APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J. A.; MACHADO, S. R.; VIEIRA, M. L. C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F (Ed.). **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 387-407.

ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; ALBINO, M. M. C.; DIAS, B. B. A.; FARIA, F. C. Transgênico resistente a geminivirus. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento,** Brasília, DF, v. 3, p. 22-26, 2001.

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

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

BARROS, D. R.; BEZERRA, J. E. A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F. M. Complete genomic sequence of two isolates of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) obtained from different hosts. **Virus Review & Research**, Porto Alegre, v. 12, p. 238-239, 2007.

BARROS, D. R.; ALFENAS-ZERBINI, P.; BESERRA JUNIOR, J. E. A.; ANTUNES, T. F. S.; ZERBINI, F. M. Comparative analysis of the genomes of two isolates of cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) obtained from different hosts. **Archives of Virology**, Wien, v. 156, p. 1085-1091, 2011.

BASHIR, M.; AHMAD, Z.; GHAFOOR, A. Cowpea aphid-borne mosaic potyvirus: a review. **International Journal of Pest Management**, London, v. 48, n. 2, p. 155-168, 2002.

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

BOCK, K. R.; CONTI, M. Cowpea aphid-borne mosaic virus. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, Surrey, n. 134, 1974. Disponível em: http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=134.

BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; MENDES, E. A.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 20, p. 717-726, 2007.

BORSE, T.; JOSHI, P.; CHAPHALKAR, S. Biochemical role of ascorbic acid during the extraction of nucleic acids in polyphenol rich medicinal plant tissues. **Journal of Plant Molecular Biology and Biotechnology**, Zurich, v. 2, n. 2, p. 1-7, 2011.

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

BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA N. T. V.; FALEIRO F. G.; BELLON G.; JUNQUEIRA K.P. Maracujá-doce: melhoramento genético e germoplasma. In: FALEIRO, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F (Ed.). **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 601-616.

BRAZ, A. S. K. **Clonagem e sequenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um *Potyvirus* causador do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes**. 1999. 106 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

BRODERSEN, P.; VOINNET, O. The diversity of RNA silencing pathway in plants. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 22, n. 5, p. 268-280, 2006.

BUENO DOS REIS, L.; LEMES DA SILVA, M.; LIMA, A. B. P.; OLIVEIRA, M. L. P.; PINTO, D. L. P.; LANI, E. R. G.; OTONI, W. C. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and P*. edulis* f. *flavicarpa*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 738, p. 425-431, 2007.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, Cambridge, v. 136, p. 642-655, 2009.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; MOREIRA, C. N.; FIGUEIRA, A. R.; CORREA, R. X.; OLIVEIRA, A. C. Detection of a resistance gradient to *Passion fruit woodiness virus* and selection of “yellow” passion fruit plants under field conditions. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 4, p. 1209-1216, 2008.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; SOUZA, A. P.; CORRÊA, R. X. A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. **European Journal of Plant Pathology**, Heidelberg, v. 139, p. 261-270, 2014. doi: 10.1007/s10658-014-0391-z.

CHEN, X. Small RNAs and their roles in plant development. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, Palo Alto, v. 35, p. 21-44, 2009.

COLLINGE, D. B.; LUND, O. S.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. What are the prospects for genetically engineered, disease resistant plants? **European Journal of Plant Pathology**, Heidelberg, v. 121, p. 217–231, 2008.

COLLINGE, D. B.; JØRGENSEN, H. J.; LUND, O. S.; LYNGKJAER, M. F. Engineering pathogen resistance in crop plants: Current trends and future prospects. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 269–91, 2010.

COSTA, C. L. Vetores de vírus de plantas – 1. Insetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 103-171, 1998.

CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; FARIA, G. A. Botânica. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. **Maracujá:** Produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 15-35.

CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A. A. **Maracujá produção**: aspectos técnicos. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2002. p. 15-28.

DASGUPTA, I.; MALATHI, V. G.; MUKHERJEE, S. K. Genetic engineering for virus resistance. **Current Science**, Bangalore, v. 84, p. 341-354, 2003.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Pesquisa e desenvolvimento do maracujá. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, R. C.; (Ed.). **Agricultura tropical**: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 411-416.

FAUQUET, C. M.; MAYO M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus taxonomy** - Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier, 2005. 1259 p.

FISCHER, I. H.; REZENDE, J. A. M. Disease of passion flower (*Passiflora spp.*). **Pest Technology**, Ikenobe, v. 2, n. 1, p. 1-19, 2008.

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

FLORES, R.; RUIZ-RUIZ, S.; SOLER, N.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J.; FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. *Citrus tristeza vírus* p23: a unique mediating key vírus-host interactions. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 98, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00098.

FOLIMONOVA, S. Y.; FOLIMONOV, A. S.; TATINENI, S.; DAWSON, W. O. *Citrus tristeza virus*: survival at the edge of the movemente continuum. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 82, p. 6546-6556, 2008.

GIORIA, R.; BOSQUE, G. G.; REZENDE, J. A. M.; AMORIM, L.; KITAJIMA, E. W. Incidência de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista – SP e danos causados pelo Passion fruit woodiness virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, p. 182-189, 2000.

GONZÁLEZ, E. R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium***. 2002. 93 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

GOTTULA, J.; FUCHS, M. Toward a quarter century of pathogen-derived resistance and pratical approaches to plant virus disease control. In: LOEBENSTEIN, G.; CARR, J. P. (Ed.). **Advances in virus research:** natural and engineered resistance to plant viruses. Amsterdam: Elsevier, 2009. v. 75, p. 161-183.

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

HANSEN, K. A.; GILBERT, L. E.; SIMPSON, B. B.; DOWNIE, S. R.; CERVI, A. C.; JANSEN, R. K. Phylogenetic Relationships and Chromosome Number Evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**, Washington, DC, v. 31, n. 1, p. 138-150, 2006.

HEIN, I.; GILROY, E. M.; ARMSTRONG, M. R.; BIRCH, P. R. J. The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 10, p. 547–62, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2012/tabelas_pdf/tabela01.pdf . Acesso em: 27 mar. 2014.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA. **GM Approval Database**. Manila, 2014. Disponível em: http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp. Acesso em: 01 jul. 2014a.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA. **Commercial GM Trait**: Disease Resistance. Manila, 2014. Disponível em: http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/commercialtrait/default.asp?TraitTypeID=3&Trait=Disease%20Resistance. Acesso em: 02 jul. 2014b.

KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. **Cell**, Cambridge, v. 95, p. 461–470, 1998.

KITAJIMA, E. W.; ALCANTARA, B. K. de; MADUREIRA, P. M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; REZENDE, J. A. M.; ZERBINI, F. M. A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) in Brazil. **Archives of Virology**, Wien, v. 153, p. 743–747, 2008.

LEE, L. K.; ROTH, C. M. Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. **Current Opinion Biotechnology**, Philadelphia, v. 14, p. 505-511, 2003.

LIMA, A. A.; BORGES, A. L.; FANCELLI, M.; CARDOSO, C. E. L. Maracujá: sistemas de produção convencional. In: PIRES, M. M.; SÃO JOSÉ; A. R.; CONCEIÇÃO, A. O. **Maracujá:** avanços tecnológicos e sustentabilidade. Ilhéus: Editus, 2011. p. 203-237.

LIMA, A. A.; CARDOSO, C. E. L.; SOUZA, J. S.; PIRES, M de M. **Comercialização do maracujazeiro**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. (Maracujá em Foco, 29). ‘

LIN, S. S.; HENRIQUES, R.; WU, H. W.; NIU, Q. W.; YEH. S. D.; CHUA, N. H. Strategies and mechanism of plant vírus resistance. **Plant Biotechnology Report,** New York, v. 1, p. 125-134, 2007.

LÓPEZ, C.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against *Citrus tristeza virus* in transgenic Mexican lime. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 11, p. 33-41, 2010.

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

MACIEL, C. S.; NAKANO, D. H.; REZENDE, J. A. M.; VIEIRA, M. L. C. Screening of *Passiflora* especies for reaction to *Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus* reveals an immune wild especies. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 414-418, 2009.

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* Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, p. 697-702; 1994.

MANICA, I. Taxonomia – Anatomia – Morfologia. In: MANICA, I.; BRANCHER, A.; SANZONOWICKS, C.; ICUMA, I. M.; AGUIAR, J. L. P.; AZEVEDO, J. A.; VASCONCELLOS, M. A. S.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá-doce**: Tecnologia de produção, pós-colheira, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005. p. 27-33.

MARTINEZ, C. A.; SANTEN, M. V.; AYUB, R. A.; CORTEZ, M. G. Glifosato e glufosinato como agentes seletivos para transformação genética de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.). **Revista Brasileira de Herbicidas**, Passo Fundo, v. 3, p. 18-34, 2005.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 15, R17-R19, 2006. Review Issue 1.

MENDES, B. M. J.; CARDOSO, S. C.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; CRUZ, R. B.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility *to Xanthomonas axonopodis* pv. citri in transgenic citrus sinensis expressing the rice xa21 gene. **Plant Pathology**, London, v. 59, p. 68–75, 2010.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. esp. 1, p. 83-91, 2011.

MENEGOTO, J. C. **Estudo da viabilidade econômico-financeira para a implantação de maracujá azedo irrigado em sistema adensado de plantio no Distrito Federal**. Planaltina, DF: UPIS, Faculdades Integradas, Departamento de Agronomia, 2008.

MLOTSHWA, S.; SCHAUER, S. E.; SMITH, T. H.; MALLORY, A. C.; HERR JUNIOR, J. M.; ROTH, B.; MERCHANT, D. S.; RAY, A.; BOWMAN, L. H.; VANCE, V. B. Ectopic DICER-LIKE1 expression in P1/HC-Pro *Arabdopsis* rescues phenotypic anomalies but not defects in MicroRNA and silencing pathways. **Plant Cell**, Baltimore, v. 11, p 2873-2875, 2005.

MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujazeiro visando resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. 2005. 134 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. **Transformação genética de maracujazeiro azedo para resistência ao vírus do endurecimentos dos frutos (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* – CABMV)**. 2010. 76 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; JADÃO, A. S.; MENDES, B. M. J.; REZENDE, J. A. M.; TREVISAN, F.; MELLO, A. P. O. A.; VIEIRA, M. I. C.; MELETTI, I. M. M.; PIEDADE, S. M. de S. Genetic transformation of passionflower and evaluation of R_1 and R_2 generation for resistance to *Cowpea aphid borne mosaic virus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, p. 1021-1025, 2011.

NAHID, N.; AMIN, I.; BRIDDON, R. W.; MANSOOR, S. RNA interference-based against a legume mastrevirus. **Virology Journal**, London, v. 8, p. 499, 2011. doi: 10.1186/1743-422X-8-499.

NASCIMENTO, A. V. S.; SANTANA, E. N.; BRAZ, A. S. K.; ALFENAS, P. F.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; CARVALHO, M. G. de; ZERBINI, F. M. Cowpea aphid-borne mosaic vírus (CABMV) is widespread ins passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, Wien, v. 151, p. 1797-1809, 2006.

NELSON, R. S.; MCCORMICK, S. M.; DELANNAY, X.; DUBE, P.; LAYTON, J.; ANDERSON, E. J.; KANIEWSKIA, M.; PROKSCH, R. K.; HORSCH, R. B.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T.; BEACHY, R. N. Virus tolerance plant growth and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. **Nature Biotechnology**, London, v. 6, p. 403-409, 1988.

NORIEGA, P.; MAFUD, D. F.; STRASSER, M.; KATO, E. T. M.; BACCHI, E. M. *Passiflora alata* Curtis: a Brazilian medicinal plant. **Boletín Lationoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales e Aromáticas**, Santiago, Chile, v. 10, p. 398-413, 2011.

NOVAES, Q. S.; REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W. Doenças causadas por vírus e fitoplasma em maracujazeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, p. 39-40, 49-51, 2000.

NOVAES, Q. S.; REZENDE, J. A. M. Selected mild strains of *Passionfruit woodiness virus* (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brasil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, p. 699-708, 2003.

OLIVEIRA, H. J. Incidência e manejo do vírus do endurecimento dos frutos (PWV) no Estado de Minas Gerais. In SAMPAIO, A. C.; FUMIS, T. F.; ROSSI, A. G.; ALMEIDA, A. M.; GARCIA, M. J. M. (Ed.). **Manejo no controle do vírus do endurecimento dos frutos (PWV) do maracujazeiro**. Jaboticabal: Multipress, 2006. p. 37-46.

OTONI, W. C.; BLACKHALL, N. W.; D'UTRA VAZ, F.B.; CASALI, V. W.; POWER, J. B.; DAVEY M. R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener. and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 777-785, 1995.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F (Ed.). **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 457-467.

PIERO, R.M.D.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A; PASCHOLATI, S.F.; DELFINO, M.A. Transmissão do *Passion fruit wodiness virus* por *Aphis gossypii* e Colonização do Maracujazeiro pelo Vetor. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 139-140, 2006.

PINTO, A. P. C. **Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora alata* Curtis) para resistência ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)**. 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PIRES, M. M.; SÃO JOSÉ; A. R. Aspectos gerais da cultura do maracujá no Brasil. In: PIRES, M. M.; SÃO JOSÉ; A. R.; CONCEIÇÃO, A. O. **Maracujá:** avanços tecnológicos e sustentabilidade. Ilhéus: Editus, 2011. p. 13-20.

PIRES, M. M.; GOMES, A. S.; MIDLEJ, M. M. B. C.; SÃO JOSÉ, A. R.; ROSADO, P. L.; PASSOS, H. D. B. Caracterização do mercado de maracujá. In: PIRES, M. M.; SÃO JOSÉ; A. R.; CONCEIÇÃO, A. O. **Maracujá:** avanços tecnológicos e sustentabilidade. Ilhéus, Editus, 2011. p. 21-68.

PRINS, M. Broad virus resistance in transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 21, n. 9, p. 373-375, 2003.

PRINS, M.; LAIMER, M.; NORIS, E.; SCHUBERT, J.; WASSENEGGER, M.; TEPFER, M. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 73-83, 2008.

QUOIRIN, M.; WINKLER, L. M.; AYUB, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) with *Cme-Aco1* gene. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 632, p. 243-248, 2004.

REZENDE, J. A. M. Práticas culturais para prevenção e convivência com as viroses do maracujazeiro. In SAMPAIO, A. C.; FUMIS, T. F.; ROSSI, A. G.; ALMEIDA, A. M.; GARCIA, M. J. M. (Ed.). **Manejo no controle do vírus do endurecimento dos frutos (PWV) do maracujazeiro**. Jaboticabal: Multipress, 2006. p. 47-58.

RITZENTHALER, C. Resistance to plant viruses: old issue, new answers? **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 16, p. 118-122, 2005.

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

ROVERE, C.V.; VAS, M.; HOPP, H.E. RNA-mediated vírus resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 13, p. 167-172, 2002.

SILVA, M. B. **Transformação genética de marcujã amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener.) mediada por *Agrobacterium tumefasciens***. 1998. 45 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

SILVA, C. S.; RUA, P. S. Aspectos econômicos: mercado nacional e internacional. In: LEONEL, S.; SAMPAIO, A. C. **Maracujá-doce:** aspectos técnicos e econômicos. São Paulo: Ed. UNESP, 2007.

RUGGIERO, C. (Coord.). **Maracujá para exportação:** aspectos técnicos. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1996.

RUGGIERO, C. Maracujá: do plantio à colheita. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., 1998, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1998. p. 388.

RUIZ, M. T.; VOINNET, O.; BAULCOMBE, D. C. Initiation and mainteanance of virus-induces gene silencing. **Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 937-946, 1998.

SANFORD, J.C.; JHONSTON, S.A. The concept of patoghen-derived resistance. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, v. 113, p. 395-405, 1985.

SÃO JOSÉ, A. R. **Maracujá:** produção e mercado. Vitória da Conquista: Universidade Estadual da Bahia, 1994. 255 p.

SASAYA, T.; NAGAOKA-NAKAZANO, E.; SAIKA, H.; AOKI, H.; HIRAGURI, A.; NETSU, O.; ICHIKI-UEHARA, T.; ONUKI, M.; TOKI, S.; SAITO, K.; YATOU, O. Transgenic strategies to confer resistance against viruses in rice plants. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 409, 2014.

SCORZA, R.; RAVELONANDRO, M.; CALLAHAN, A. M.; CORDIS, J. M.; FUCHS, M.; DUNEZ, J.; GONSALVES, D. Transgenic plums (*Prunus domestica*) express the *plum pox virus* coat protein gene. **Plant Cell Reports**, New York, v. 14, p. 18-22, 1994.

SCORZA, R.; CALLAHAN, A.; LEVY, L.; DAMSTEEGT, V.; WEBB, K.; RAVELONANDRO, M. Post-Transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. **Transgenic Research**, Heidelberg, v. 1, p. 201-209, 2001.

SHIMURA, H.; PANTALEO, V. Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1809, p. 601-612, 2011.

SILVA, C.V.; OLIVEIRA, L.S.; LORIATO, V.A.P.; SILVA, L.C.; CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L.F.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, p. 407-416, 2011. doi: 10.1007/s11240-011-9991-x.

SPIELMANN, A.; KRASTANOVA, S.; DOUET-ORHANT, V.; GUGERLI, P. Analysis of transgenic grapevine (*Vitis rupestris)* and *Nicotiana benthamiana* plants expressing an *Arabis mosaic virus* coat protein gene. **Plant Science**, Limerick, v. 256, p. 235-244, 2000.

SOUZA, A. J.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Gene silencing: concepts, applications, and perspectives in woody plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 6, p. 645-656, 2007.

SUZUKI, J.Y.; TRIPATHI, S.; GONSALVES, D. Virus-resistant transgenic papaya: Commercial development and regulatory and environmental issues. In: PUNJA, Z.K.; DE BOER S.H.; SANFAÇON, H. **Biotechnology and plant disease management**. Wallingford: CAB International, 2007. p. 436-46.

TAYLOR, R. H.; GREBER, R. S. *Passionfruit woodiness virus*. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, Surrey, n. 122, 1973. Disponível em: http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=122.

TREVISAN, F. **Transformação genética de maracujazeiroo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para resistência ao vírus do endurecimentos dos frutos.** 2005. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J.; MACIEL, S. C.; VIEIRA, M. L. C.; MELETTI, L. M. M. M.; REZENDE, J. A. M. Resistance to *Passion fruit woodness virus* in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 1026-1030; 2006.

TRICOLI, D. M.; CARNEY, K. J.; RUSSEL, P. F.; MCMASTER, J. R.; GROFF, D. W.; HADDEN, K. C.; HIMMEL, P. T.; HABBARD, J. P.; BOESHORE, M. L.; REYNOLDS, J. F.; QUEMADA, H. D. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus. **Nature Biotechnology**, London, v. 13, p. 1458-1465, 1995.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 224 p.

VARGASON, J. M.; BURCH, C. J.; WILSON, J. W. Identification and RNA binding characterization of plant virus RNA silencing suppressor proteins. **Methods**, San Diego, v. 64, p. 88-93, 2013.

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

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 USA**, Washington, DC, v. 95, p. 1359-1364, 1998.

WATERHOUSE, P. M.; SMITH, N. A.; WANG, M. Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 1360-1385, 1999.

WILLIANS, M. E. The small RNA world. **The Plant Cell**, Baltimore, 2011. On line. Disponível em: http://www.plantcell.org/site/teachingtools/TTPB5LectureNotes.pdf. doi/10.1105/tpc.110.tt10210.

WU, H. W.; YU, T. A.; RAJA, J. A. J.; WANG, H. C.; YEH, S. D. Generation of transgenic oriental melon resistant to *Zucchini yellow mosaic virus* by an improved cotyledon-cutting method. **Plant Cell Reports**, New York, v. 28, p. 1053-1064, 2009.

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, 1979.

YU, H.; KUMAR, P. P. Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, p. 167-174, 2003.

ZAMORE, P. D.; TUSCHI, 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**, Cambridge, v. 101, p. 25-33, 2000.

ZHANDONG, Y.; SHUANGYI, Z.; QIEWI, H. High level resistance do *Turnip mosaic virus in* Chinese cabbage (*Brassica campestris spp.* Pekinensis (Lour Olsson) transformed with the antisense Nib gene using marker-free *Agrobacterium tumefaciens* infiltration. **Plant Science**, Limerick, v. 137, p. 308-322, 2006.

ANEXO

Anexo A - Valores médios de absorbância (A_{405nm}) das análises de ELISA dos clones das linhagens transgênicas inoculados mecanicamente.

(continua)

linhagem	clone	inoculação 1	inoculação 2	inoculação 3
		A_{405nm}	A_{405nm}	A_{405nm}
T1	I	0,179	0,041	0,137
	II	0,190	0,048	0,279
	III	0,167	0,039	0,059
	IV	0,182	0,043	0,333
T2	I	0,176	0,007	0,168
	II	0,170	0,008	0,194
	III	0,163	0,001	0,327
	IV	0,594	.....	.....
T3	I	0,230	0,423	.....
	II	0,176	0,003	0,334
	III	0,241	0,009	0,339
	IV	0,229	0,406	.....
T4	I	0,191	0,045	0,125
	II	0,193	0,047	0,119
	III	0,188	0,339	.....
	IV	0,181	0,347	.....
T5	I	0,189	0,044	0,295
	II	0,196	0,228	.....
	III	0,599	.....	.....
	IV	0,184	0,021	0,350
T6	I	0,237	0,011	0,121
	II	0,237	-0,006	0,157
	III	0,200	0,007	0,166
	IV	0,201	-0,004	0,302
T7	I	0,139	0,038	0,043
	II	0,144	0,024	0,016
	III	0,132	0,055	0,052
	IV	0,144	0,033	0,351
T8	I	0,160	0,224	.....
	II	0,240	0,096	0,319
	III	0,229	0,032	0,024
	IV	0,201	0,014	0,025
T9	I	0,138	0,005	0,025
	II	0,124	0,005	0,102
	III	0,142	0,039	0,352
	IV	0,130	0,029	0,331

Anexo A - Valores médios de absorbância (A_{405}) das análises de ELISA dos clones das linhagens transgênicas inoculados mecanicamente.

(continuação)

linhagem	clone	inoculação 1	inoculação 2	inoculação 3
		A_{405nm}	A_{405nm}	A_{405nm}
T10	I	0,199	0,024	0,291
	II	0,203	0,023	0,171
	III	0,204	-0,016	0,091
	IV	0,219	-0,009	0,051
T11	I	0,152	0,009	0,302
	II	0,223	0,009	0,025
	III	0,180	0,005	0,040
	IV	0,222	0,009	0,034
T12	I	0,205	0,016	0,315
	II	0,175	0,025	0,044
	III	0,168	0,024	0,058
	IV	0,204	0,053	0,044
T13	I	0,190	0,009	0,007
	II	0,184	0,081	0,027
	III	0,233	0,528	.....
	IV	0,176	0,295	.....
T14	I	0,158	0,022	0,115
	II	0,142	0,016	0,108
	III	0,142	0,521	.....
	IV	0,170	0,029	0,327
T15	I	0,149	-0,001	0,102
	II	0,156	0,001	0,332
	III	0,125	0,007	0,328
	IV	0,149	0,009	0,336
T16	I	0,214	0,003	0,324
	II	0,205	0,026	0,317
	III	0,627	.....	
	IV	0,239	0,010	0,315
T17	I	0,196	0,225	
	II	0,199	0,028	0,333
	III	0,593	.....	
	IV	0,175	0,029	0,288
T18	I	0,190	0,006	0,016
	II	0,179	0,008	0,121
	III	0,148	-0,002	0,026
	IV	0,178	-0,009	0,132

Anexo A - Valores médios de absorbância (A_{405}) das análises de ELISA dos clones das linhagens transgênicas inoculados mecanicamente.

(conclusão)

linhagem	clone	inoculação		
		1	2	3
		A_{405nm}	A_{405nm}	A_{405nm}
T19	I	0,146	0,087	0,021
	II	0,141	0,145	0,029
	III	0,134	0,031	0,015
	IV	0,593	.....	.....
T20	I	0,194	0,005	0,040
	II	0,258	0,011	0,041
	III	0,193	0,012	0,061
	IV	0,165	0,005	0,030
T21	I	0,215	0,014	0,170
	II	0,203	0,020	0,309
	III	0,201	0,019	0,072
	IV	0,212	0,016	0,077
Cn[1]	I	0,186	0,098	0,125
Cpi[2]	I	0,587	0,243	0,301
Cpf[3]	I	0,569	0,212	0,286
Cp[4]	I	0,634	0,249	0,340

1 Cn = Planta não transgênica, não inoculada.
2 Cpi = Controle positivo inicial – planta não transgênica inoculada no início das inoculações.
3 Cpf = Controle positivo final – planta não transgênica inoculada no final das inoculações.
4 Cp = Controle positivo – planta não transgênica infectada com o CABMV utilizada como fonte de inóculo.