

20

CAPÍTULO

ENFOQUE BIOTECNOLÓGICO PARA O CONTROLE DE VÍRUS DE PLANTAS

Paolla Mendes do Vale de Abreu
Aline Brito Vaz
Patricia Machado Bueno Fernandes

20.1 INTRODUÇÃO

Vírus de planta causam grandes prejuízos econômicos e ambientais. Estima-se que a perda mundial chegue a bilhões de dólares por ano. Barreiras fitossanitárias, além de serem uma questão de saúde pública, é uma estratégia de controle de mercado e estabelecimento de preços. Um dos principais fatores limitantes da produção é a suscetibilidade das plantas às viroses, o que resulta em menor rendimento e má qualidade dos produtos.

Como outros vírus, os vírus que infectam plantas são parasitas intracelulares obrigatórios e, portanto, não possuem a maquinaria molecular necessária para replicar seu genoma sem a célula hospedeira. Eles têm genoma pequeno, com um número limitado de genes que codificam para poucas proteínas virais. A grande maioria das viroses de plantas possui genoma de ácido ribonucleico (RNA) positivo*, embora também existam genomas

* RNA viral positivo: RNA na orientação 5'-3', que pode ser diretamente traduzido em proteínas virais. Nesse caso, o genoma viral pode ser considerado um RNAm viral, podendo ser imediatamente traduzido pela célula hospedeira.

de RNA negativo* e de RNA dupla fita (*double-stranded RNA* – dsRNA). Outras viroses de plantas têm ácido desoxirribonucleico (DNA) como genoma, que pode ser fita simples (*single-stranded DNA* – ssDNA) ou fita dupla (*double-stranded DNA* – dsDNA), e todos eles são envoltos por um capsídeo (capa) proteico.

Durante o processo de infecção, basicamente os vírus replicam seu genoma, formam novas partículas e, então, se movimentam de uma célula a outra e entre os tecidos da planta. Durante a replicação, os vírus precisam sintetizar proteínas virais. Essa síntese ocorre a partir do RNA mensageiro (RNAm) em sentido positivo, que é transcrito com o auxílio de uma enzima polimerase, DNA ou RNA polimerase, dependendo de qual seja o genoma viral (Figura 20.1).

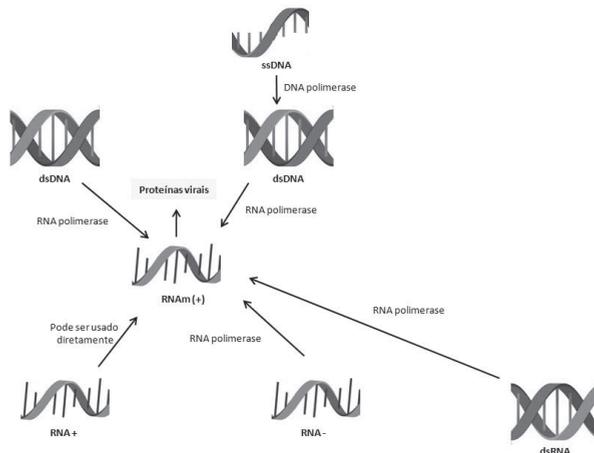


Figura 20.1 Esquema do processo de síntese de proteínas virais durante a replicação. As proteínas virais são sintetizadas a partir do RNA mensageiro sentido positivo. A enzima polimerase, DNA ou RNA polimerase, dependendo de qual seja o genoma viral, auxilia a síntese do RNAm.

O movimento célula-célula ocorre por meio dos plasmodesmos** (Figura 20.2), e o movimento entre órgãos ocorre, principalmente, por meio do

* RNA viral negativo: RNA na orientação 3'-5', sendo complementar ao RNAm viral. O RNA negativo deve ser convertido em positivo (RNAm) por uma polimerase para depois ser traduzido.

** Plasmodesmos são canais de comunicação que permitem o tráfego de macromoléculas entre células adjacentes. Eles são responsáveis pela conexão citoplasmática entre células vizinhas, possibilitando a troca de moléculas de informação, funcionais e estruturais durante o crescimento e o desenvolvimento da planta.

floema¹⁻³. Alguns vírus ainda podem se movimentar utilizando os vasos do xilema⁴.

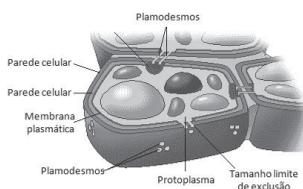


Figura 20.2 Esquema da estrutura dos plasmodesmos. Os plasmodesmos são envolvidos pela membrana plasmática contínua entre as células adjacentes. Eles se estreitam no canalículo que atravessa a parede celular de cada uma das células (tamanho limite de exclusão) e permitem a ligação entre os seus citoplasmas. Fonte: SoBiologia⁵.

O movimento célula-célula do vírus é auxiliado por proteínas de movimento viral, que são capazes de aumentar o tamanho limite de exclusão do plasmodesmo (Figura 20.2), tornando esse processo mais rápido e permitindo, em alguns casos, que o vírus alcance os vasos do floema, onde ocorre o movimento em longa distância para os diferentes órgãos da planta.

Os vírus constituem um dos principais grupos de micro-organismos que causam doenças em plantas, e seu controle nem sempre é eficaz. Por isso, o ideal é prevenir a infecção. Alguns métodos convencionais têm sido utilizados para esse propósito, como a rotatividade de culturas e, especialmente, o controle dos insetos que transmitem o vírus de uma planta a outra. Outro método muito aplicado é a detecção precoce da doença e a destruição das plantas infectadas (*roguing*). Alternativamente, estirpes virais de baixa infectividade podem ser utilizadas para aumentar a resposta de defesa da planta, agindo como uma vacina. No entanto, o uso de cultivares com elevados níveis de resistência* é a estratégia mais viável para reduzir as perdas na colheita⁶. Apesar disso, nem sempre existem cultivares resistentes disponíveis comercialmente. Através da genética clássica, o cruzamento tradicional entre cultivares selvagens permite que a resistência seja introduzida em cultivares comerciais. Entretanto, essa estratégia pode levar muitos anos até a obtenção de uma variedade viável.

* A resistência genética pode ser definida como a habilidade da planta em prevenir ou retardar o estabelecimento do patógeno em seus tecidos, num processo altamente dinâmico e coordenado.

Assim, o uso de plantas geneticamente modificadas* capazes de impedir a replicação e/ou o movimento do vírus na planta é a melhor estratégia antiviral.

No transcorrer do processo evolutivo, as plantas e os patógenos desenvolveram estratégias de sobrevivência, as plantas procurando impedir a infecção e os patógenos driblando essa resistência. Avanços no entendimento da bioquímica de infecções virais e do sistema natural de defesa das plantas têm resultado em novas tecnologias que eficientemente limitam as doenças causadas por vírus^{7,8}.

20.2 ESTRATÉGIAS PARA RESISTÊNCIA A VIROSES EM PLANTAS

A engenharia genética ofereceu novas perspectivas na resistência contra viroses. A criação de plantas geneticamente modificadas resistentes a vírus teve início em plantas de tabaco expressando o gene para a proteína da cápsula proteica de *tobacco mosaic virus* (TMV)⁹. Essa descoberta levou à produção de várias plantas geneticamente modificadas resistentes a viroses, usando diferentes tipos de genes virais⁶. Esse tipo de resistência é conhecido como resistência derivada do patógeno (do inglês *pathogen-derived resistance* – PDR). No entanto, atualmente, a resistência mediada por RNA, baseada no silenciamento pós-transcricional do gene (do inglês *post-transcriptional gene silencing* – PTGS), é a estratégia mais importante no desenvolvimento de plantas resistentes a viroses.

20.2.1 Resistência derivada do patógeno (PDR)

Essa técnica consiste em inserir um ou mais genes do patógeno na célula da planta, gerando resistência específica no hospedeiro. Dessa forma, plantas hospedeiras expressando transgênicamente genes que codificam para proteínas da cápsula viral (do inglês *coat protein* – CP), para proteína de movimento viral (do inglês *movement protein* – MP) ou para subunidades da replicase viral são resistentes a esses vírus¹⁰.

A resistência adquirida pela expressão transgênica da CP em plantas está baseada no bloqueio da remontagem do vírus invasor¹¹. A resistência mediada por CP (do inglês *coat protein mediated resistance* – CPMR) já foi,

* Organismos geneticamente modificados (OGM) são aqueles que tiveram seu genoma modificado mediante emprego de técnicas de engenharia genética. A tecnologia permite que genes individuais selecionados sejam transferidos de um organismo para outro, inclusive entre espécies não relacionadas.

por exemplo, conseguida em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*) e mamão (*Carica papaya*) expressando, respectivamente, a CP do *tobacco mosaic virus* (TMV)¹², a do *potato mosaic virus* (PVY) e a do *papaya ringspot virus* (PRV)¹³. A CPMR, no entanto, pode ser ampla ou restrita. No caso das plantas de tabaco, a resistência foi conseguida apenas contra estirpes de TMV cujas sequências genômicas eram muito similares entre si, enquanto contra estirpes com maiores diferenças no genoma a resistência foi consideravelmente menor¹². Para plantas de mamão, a resistência por CP contra o PRV funcionou apenas para uma única estirpe viral¹⁴.

A resistência mediada por replicase (do inglês *replicase mediated resistance* – Rep-MR) pode ser adquirida pela expressão de transgenes que codificam para sequências completas ou parciais da enzima polimerase do vírus. A Rep-MR contra TMV, por exemplo, ocorreu em plantas geneticamente modificadas que codificavam para um fragmento proteico de 54 KDa da replicase viral¹⁵. Os mecanismos envolvidos nessa resistência não são bem entendidos, mas acredita-se que a replicase produzida pelo transgene interfere de alguma maneira com aquela produzida pelo vírus, ligando-se a fatores do hospedeiro ou a proteínas virais envolvidas na regulação da replicação viral. Já foi relatado que plantas expressando replicase transgênica inibem a replicação do vírus invasor e, em muitos casos, a resistência ocorre mesmo quando a planta é infectada com uma alta carga viral¹⁰. Geralmente, esta é uma resistência limitada à estirpe viral da qual se obteve a replicase¹⁰.

Na resistência mediada por MP, as proteínas MP transgênica e viral, por possuírem o mesmo domínio proteico, competem para interagir com fatores celulares que promovam e interfiram no movimento do vírus na planta. Assim, o transgene interfere na interação das MP virais com fatores da célula hospedeira, dificultando o movimento célula-célula do vírus¹⁶. A infecção de TMV, por exemplo, foi controlada quando a MP de TMV foi expressa transgenicamente em plantas, mostrando que o movimento viral célula a célula foi impedido¹⁷.

20.2.2 Silenciamento pós-transcricional do gene (PTGS) por siRNAs e miRNAs

Um fenômeno conhecido como silenciamento do RNA ocorre em muitos organismos vivos. Em plantas, esse fenômeno é conhecido como silenciamento pós-transcricional do gene (PTGS) e funciona como um mecanismo natural de defesa contra vírus. Basicamente, a planta reconhece moléculas

de dupla fita de RNA (dsRNA) que são geradas durante a replicação viral e degrada moléculas específicas de RNA do vírus, impedindo a síntese de novas proteínas virais e, assim, o progresso da infecção¹⁷⁻²⁰.

A célula, ao perceber a presença do dsRNA viral, destrói moléculas de RNA cuja sequência seja idêntica à do dsRNA. Inicialmente, essas moléculas são clivadas por proteínas denominadas DICER em moléculas menores de 21 a 26 nucleotídeos (nt) (do inglês *small interfering RNA* – siRNAs). Uma das fitas do siRNA é guiada por duas proteínas que trabalham juntas, o complexo de silenciamento induzido por RNA (do inglês *RNA induced silencing complex* – RISC) e a argonauta (AGO), para degradar o RNA mensageiro (RNAm) viral que lhe seja complementar, impedindo a replicação e a propagação do vírus na planta²¹ (Figura 20.3).

Outras moléculas de pequenos RNAs são importantes na interação pató-

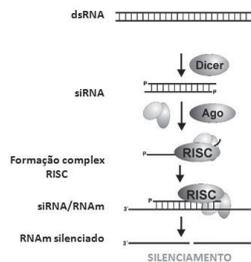


Figura 20.3 Esquema de imunidade antiviral baseada no RNA desencadeada por moléculas de dsRNA virais. No citoplasma, as moléculas de dsRNA virais são processadas pela enzima DICER em moléculas de siRNA. Uma das fitas do siRNA é guiada pelo RISC, em associação com a proteína AGO, a uma molécula de RNAm-alvo viral sequência-específica. A proteína AGO, então, cliva o RNAm, promovendo o seu silenciamento e impedindo o progresso da infecção viral. Fonte: Gene-quantification²².

geno-hospedeiro. Recentemente muitos microRNAs (miRNAs), moléculas de 21 a 24 nucleotídeos codificados por vírus, foram identificados²³, sendo responsáveis pela regulação de vários genes de replicação viral bem como de genes envolvidos na resposta de defesa do hospedeiro²³⁻²⁸. Em plantas, os miRNAs estão envolvidos na regulação de RNAs que codificam para importantes fatores regulatórios do desenvolvimento, de resposta a estresse e de defesa contra patógenos^{29,30}.

Basicamente, os miRNAs são derivados do processamento de longas moléculas de miRNA primário (*primary miRNA* – pri-miRNA), moléculas de dsRNA que formam uma estrutura em grampo³¹. Posteriormente, os

pri-miRNAs são incorporados ao RISC. miRNA-RISCs podem, então, regular RNAs-alvos, que podem ser completa ou parcialmente complementares ao miRNA. Isto resulta na destruição do RNAm ou no impedimento da tradução do RNAm em proteína^{32,33} (Figura 20.4).

Também já foi sugerido que miRNAs presentes nas plantas podem ter

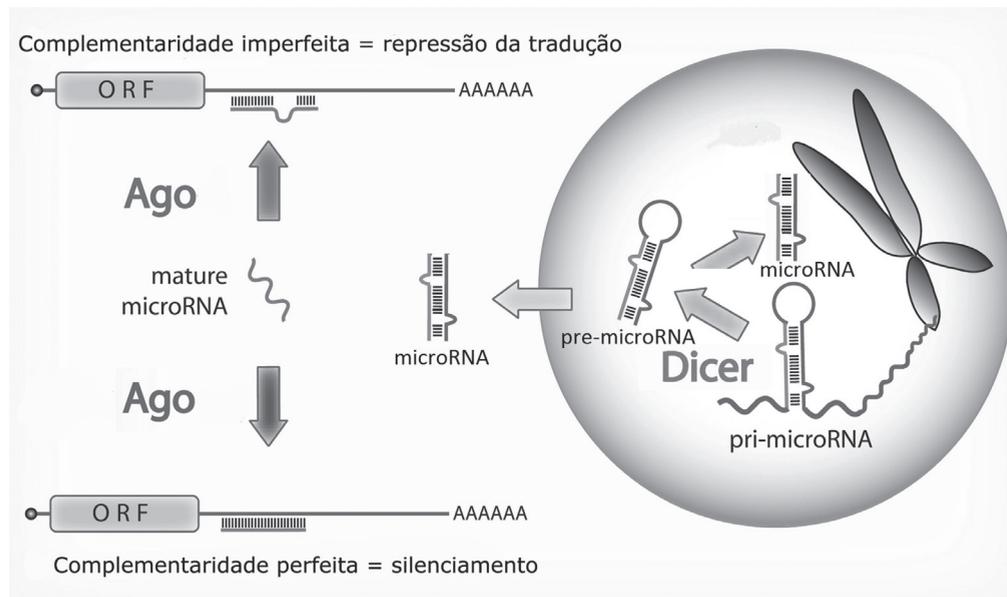


Figura 20.4 Formação de miRNAs e a regulação da expressão gênica. As moléculas de miRNA são primeiramente expressas no núcleo como moléculas primárias de miRNA (pri-microRNA), que são processadas pela enzima DROSHA em precursores de miRNA (pré-microRNA). Estes são levados ao citoplasma, com o auxílio de proteínas de exportação presentes na membrana nuclear. No citoplasma, os pré-microRNAs são processados pela DICER em moléculas maduras de miRNA, de aproximadamente 21-25 nt. O miRNA é guiado a uma molécula de RNAm-alvo complementar. Dependendo da complementaridade, pode ocorrer a repressão da tradução ou o silenciamento do RNAm-alvo.

como alvo genomas virais, funcionando, portanto, como um mecanismo de defesa antiviral. Uma análise por bioinformática mostrou que vários miRNAs têm capacidade de ter como alvo genomas de vírus invasores em plantas³⁴. Os resultados mostram que genes virais que codificam para a proteína da cápsula viral, por exemplo, são um dos alvos dos miRNAs das plantas. Isso demonstra que a via do miRNA é um suporte ao mecanismo de defesa antiviral desencadeado por siRNAs³⁴.

* Disponível em <http://www.microrna.ic.cz/obr/image023.png>.

Baseado nesses mecanismos naturais de defesa, desencadeados por siRNAs ou miRNAs, é possível promover a degradação de moléculas específicas de RNA (da planta ou viral) por meio da expressão de transgenes que possuem a mesma sequência do RNA que se pretende degradar. No caso de transgenes virais, isso resulta em plantas geneticamente modificadas resistentes a vírus.

A aplicação da tecnologia de engenharia genética é uma alternativa efetiva para controlar doenças causadas por vírus em plantas usando PTGS. Entretanto, ainda existe uma grande preocupação pública quanto à segurança do uso de plantas geneticamente modificadas na agricultura⁶. Assim, atualmente, diferentes metodologias têm sido aplicadas para que a resistência baseada no PTGS seja alcançada sem a modificação genética da planta. Esse tipo de resistência é alcançada pela expressão transiente* de genes de interesse exógenos. Isso tem sido feito pelo bombardeamento das células da planta com partículas de ouro ou de tungstênio carregando moléculas de dsRNA ou siRNA. Outro método é o uso de silenciamento do gene induzido por vírus (do inglês *virus-induced gene silencing* – VIGS). Os VIGS são vetores com a sequência completa do RNA de um determinado vírus construídos *in vitro*, em que sequências exógenas podem ser inseridas. Assim, quando esse vetor é usado para infectar plantas, a sequência inserida induz e se torna alvo do PTGS³⁵. Já foi relatado que moléculas de dsRNA de origem viral, ao serem introduzidas artificialmente nas plantas por inoculação mecânica, desencadeiam uma resposta de defesa induzida por RNA, prevenindo a infecção^{19,20}. Essa mesma resposta de defesa pode ser conseguida quando as plantas são borrifadas com uma solução contendo moléculas de dsRNA viral^{19,36}. Usando essa tecnologia, plantas de *Nicotiana benthamiana* borrifadas dias antes da inoculação viral com dsRNA de *pepper mild mottle virus* (PMMoV), preveniram a infecção por esse vírus¹⁹. Da mesma maneira, plantas de milho (*Zea mays*) preveniram a infecção por *sugarcane mosaic virus* (SCMV)³⁶.

Apesar dessa resposta da planta, baseada no silenciamento transiente de genes específicos, durar poucos dias, acredita-se que os siRNAs produzidos durante o PTGS se movimentam por meio dos plasmodesmos e/ou do floema, desencadeando um silenciamento sistêmico na planta pela degradação de RNA em células distantes.

* Expressão transiente é aquela em que um determinado gene de interesse é expresso por um curto período de tempo na célula, sem que haja a manipulação genética da planta. Dessa forma, o transgene não é integrado ao cromossomo e, portanto, não é passado para as próximas gerações como ocorre na transformação por engenharia genética.

20.3 FERRAMENTAS QUE AUXILIAM O DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE PLANTAS RESISTENTES

Algumas ferramentas usadas na biologia molecular são chaves para auxiliar o desenvolvimento tecnológico de plantas resistentes a vírus. Sabe-se que a infecção viral altera o nível e o perfil de expressão dos RNAs mensageiros e de pequenos RNAs (miRNAs e siRNAs) nas plantas. As técnicas de sequenciamento de RNA (RNAseq), o uso de marcadores moleculares e o mapeamento dos microRNAs diferencialmente expressos em plantas saudáveis e infectadas dão base para identificar RNAs (mensageiros ou pequenos) que podem ser usados na engenharia genética para desenvolver plantas resistentes ao vírus que a infecta.

20.3.1 RNAseq

Em plantas, o controle da resposta frente aos estados de estresse biótico e abiótico é mediado pela atividade transcricional de ativação e repressão de genes. A regulação da transcrição depende da ligação de ativadores ou repressores com os elementos do promotor localizados na região 5' de um gene. O conjunto de todos os transcritos derivados de genes produzidos numa célula sob uma determinada condição fisiológica é chamado transcriptoma³⁷.

Desse modo, o estudo e a análise do transcriptoma são fundamentais para compreender a função, estrutura e as interações dos genes envolvidos num determinado processo. Na década de 1990 foram desenvolvidas algumas tecnologias para o estudo de transcriptoma, como os *Northern blots*, microarranjos*, os cDNA-AFLP e a análise serial de expressão de genes (do inglês *serial analysis of gene expression* – SAGE). No entanto, essas tecnologias têm limitações, como níveis de expressão limitados ou a necessidade de conhecer previamente o genoma de estudo³⁸.

A tecnologia RNA-seq surgiu como uma das ferramentas transcriptômicas mais promissoras e fundamenta-se no sequenciamento massivo de DNA complementar (cDNA), que se apoia no desenvolvimento das plataformas de sequenciamento de nova geração (do inglês *next generation sequencing* – NGS) e que tem conseguido superar as limitações das outras tecnologias de amplo uso, como os microarranjos. O RNA-seq possui muitas vantagens, entre as quais se destaca a necessidade de pequenas quantidades de RNA e

* Microarranjo é uma técnica de biologia molecular que permite analisar a expressão gênica de vários genes simultaneamente. Ver animação em <http://www.youtube.com/watch?v=VN5ThMNjKhM>.

o fato de que ela permite encontrar a estrutura de éxons, íntrons e locais de *splicing** alternativo, além de possibilitar a identificação das extremidades 5' e 3' dos genes³⁹.

A tecnologia RNAseq encontra-se disponível comercialmente, e existem muitas plataformas disponíveis. A metodologia pode variar segundo a plataforma de sequenciamento, principalmente na construção da biblioteca de cDNA³⁹. A escolha da plataforma mais apropriada depende das particularidades de um determinado projeto; por exemplo, se existe ou não um genoma de referência e o tamanho do fragmento que se deseja obter. Nessa ordem de ideias, se for necessário fazer montagem *de novo*, isto é, sem um genoma de referência, é recomendável escolher uma plataforma que gere leituras maiores para facilitar a montagem do genoma⁴⁰.

Nessa tecnologia, um dos passos fundamentais é a obtenção de um RNA de boa qualidade. Para tanto, o ideal é utilizar reagentes para o isolamento de RNA capazes de capturar a cauda poli-A³⁸.

Os dados obtidos pelo RNA-seq têm uma precisão elevada e podem ser usados para análise de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa (do inglês *quantitative polymerase chain reaction* – qPCR)⁴¹. Como exemplo de uso dessa técnica, o trabalho de Gan e colaboradores (2011)⁴² revelou que a variação nos níveis de expressão gênica é bem mais elevada nos genes envolvidos na resposta ao estresse biótico. Além disso, os genes que codificam para proteínas relacionadas à defesa são mais variáveis do que aqueles que codificam para proteínas do metabolismo basal⁴².

O RNA-seq também foi aplicado à análise de perfis transcriptômicos em patógenos de plantas. É o caso de *Phytophthora phaseoli*, agente causal do míldio do feijão. Os resultados mostraram que genes envolvidos na virulência foram superexpressos na interação do patógeno com a planta⁴³. Dessa forma, observa-se que essa ferramenta também é apresenta grande potencial na pesquisa de transcriptomas em patógenos.

20.3.2 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são sequências de DNA que revelam polimorfismos** entre indivíduos geneticamente relacionados. Quando localizados

* *Splicing* é o processo no qual os íntrons do RNA são removidos, permanecendo apenas os éxons, que, juntos, formam o RNA mensageiro.

** Polimorfismo é a variação na sequência de DNA que pode ser utilizada para diferenciar/comparar indivíduos geneticamente relacionados.

próximo a genes de interesse (ligação gênica) a presença de tais polimorfismos pode ser utilizada para inferir a presença de determinado gene. Eles têm sido utilizados, por exemplo, para sinalizar genes de resistência a patógenos. No amendoim, o uso combinado de diferentes marcadores moleculares permitiu o mapeamento de 34 genes de resistência a patógenos⁴⁴.

Os marcadores do tipo *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *random amplified polymorphic* (RAPD) e *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) foram responsáveis pelo desenvolvimento dos primeiros mapas genéticos de muitas espécies cultivadas, além da descoberta de genes e de inúmeros estudos de diversidade genética. A vantagem desses marcadores é o grande número de fragmentos gerados e detectados em um único gel, permitindo que haja maior rapidez no mapeamento genético⁴³. De qualquer forma, cada um deles apresenta vantagens e limitações, cobrindo um amplo espectro de aplicações⁴⁵.

O marcador RFLP, por exemplo, foi usado para avaliar a presença de *citrus tristeza virus* (CTV) em plantas do gênero *Citrus*. As amostras utilizadas foram extraídas de plantas com suspeita de infecção e de plantas pré-imunizadas no campo. O marcador foi utilizado para selecionar a presença do gene que codifica para a proteína da cápsula proteica viral (CP). Em amostras em que o vírus estava presente, o perfil eletroforético apresentou três bandas, indicando dois pontos de corte da enzima de restrição. Em amostras sem vírus, apenas duas bandas estavam presentes no gel de eletroforese⁴⁶.

Os marcadores denominados sequências simples repetidas ou microssatélites (*simple sequence repeats* – SSRs) são os mais polimórficos e consistem em pequenas sequências com um a cinco pares de bases que se repetem em série, em número variável (de uma dezena a uma centena de vezes). Geralmente, os microssatélites identificam um único locus no genoma e são frequentemente multialélicos⁴⁷. O SSR apresenta vantagens sobre os demais marcadores baseados em reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction* – PCR), porque são dominantes e facilmente reprodutíveis. SSRs foram usados, por exemplo, para analisar a variação somaclonal* em porta-enxerto de videira, e diferenças genéticas sutis entre genótipos próximos foram detectadas⁴⁸.

* Variação somaclonal é o surgimento de variantes genéticos a partir da cultura de células *in vitro*. Na propagação vegetativa *in vitro* supõe-se que os descendentes sempre serão geneticamente iguais à planta mãe, mas alguns fatores como tempo de cultura, número de subcultivos (quando as plantas são passadas para um novo meio de cultura), fitorreguladores, tipo de explante, genótipo, composição do meio de cultura, nível de ploidia e mosaicismos são considerados agentes capazes de induzir variabilidade *in vitro*. Dessa forma, obtêm-se plantas que serão diferentes da planta mãe,

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis apresentam uma ampla capacidade de amostragem do genoma, sendo de grande potencial para a avaliação da diversidade genética, tanto para aplicações filogenéticas e evolutivas quanto para fins práticos em programas de melhoramento genético. Os genótipos são avaliados por meio dos marcadores; as bandas comuns a todos os indivíduos são interpretadas como semelhanças genéticas e as bandas não comuns, como diferenças. Os resultados são codificados a fim de gerar uma matriz de similaridade ou dissimilaridade⁴⁵ (Figura 20.5).

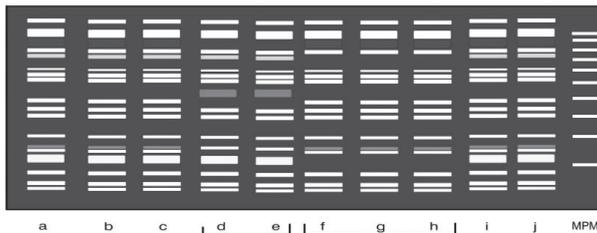


Figura 20.5 Esquema representando resultados imaginários do uso de marcador molecular para comparar dez diferentes amostras de *Arabidopsis thaliana*. As amostras a-c e i-j apresentam o mesmo padrão de bandas, diferente do das amostras d-e e f-h. As amostras d-e não possuem as bandas azul e rosa e possuem uma banda a mais, a vermelha. Já as amostras f-h não possuem a banda verde e amarela. As cores são ilustrativas. Legenda: MPM, marcador de massa molecular. Fonte: DAG – UFLA⁴⁹.

As bandas de interesse geradas pelo marcador molecular podem ser extraídas do gel de eletroforese, e seu DNA, sequenciado. Assim, marcadores moleculares aliados a técnicas de engenharia genética e de sequenciamento de genomas podem ser usados no melhoramento genético de plantas, permitindo aos melhoristas, por exemplo, produzir genótipos mais produtivos e tolerantes a estresses bióticos e abióticos⁴⁸.

20.3.3 Expressão diferencial de miRNAs

Estudos demonstram que a expressão e atividade de miRNAs variam em resposta a estresses bióticos e abióticos em plantas. Plantas modelo de *Arabidopsis thaliana* submetidas a diferentes condições de estresse revelaram

mesmo não havendo reprodução sexuada. Essas plantas são chamadas de variantes somaclonais ou somaclones.

novos miRNAs não detectados em experimentos com plantas condicionadas a ambientes controlados⁵⁰.

Sabe-se que os vírus são capazes de codificar proteínas conhecidas como supressoras do silenciamento, que interferem no acúmulo de miRNAs e siRNAs do hospedeiro⁴¹. Mudanças na expressão de miRNAs têm sido associadas à infecção viral em *Arabidopsis*⁵¹, e a alteração da expressão de miRNAs por proteínas virais parece estar associada ao desenvolvimento de sintomas de doença em *Nicotiana tabacum*⁵². Um estudo encontrou tanto aumento quanto queda na expressão de miRNAs em plantas de tabaco infectadas por diferentes vírus⁵³.

Interessante é que os miRNAs, por exemplo, regulam genes de resistência importantes na planta, como aqueles que codificam para proteínas *nucleotide binding leucine rich repeat* (NB-LRR)⁵⁴, importantes na resposta de defesa da planta a patógenos. Assim, essas pequenas moléculas de RNA são fortes candidatas a serem usadas no desenvolvimento de plantas com resistência antiviral. Definir quais miRNAs são interessantes para esse propósito pode ser um desafio. No entanto, existe no mercado uma espécie de microarranjo de miRNAs que permite mapear a expressão de centenas ou mais miRNAs em uma placa de 96 ou 384 poços (ou chips), dependendo do número de miRNAs analisados. A análise é feita pela PCR em tempo real*, que permite quantificar a expressão dos miRNAs. Isso pode ser utilizado, por exemplo, para mapear miRNAs diferencialmente expressos em plantas saudáveis e infectadas por vírus. Com base nos resultados, é possível selecionar miRNAs cujos alvos estejam envolvidos em respostas de estresse e de defesa antiviral e usá-los no desenvolvimento tecnológico de plantas resistentes. No entanto, essa técnica ainda pode ser de difícil utilização porque não existem placas ou chips para muitos organismos. Assim, dependendo da espécie de planta usada na pesquisa científica, torna-se necessário montar uma placa com os miRNAs que se deseja estudar.

* PCR em tempo real é uma técnica de biologia molecular que combina a metodologia da PCR com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. Ela permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação do DNA sejam realizados em um único experimento.

20.4 PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS RESISTENTES A VIROSES

Desde a descoberta da via de silenciamento do RNA, a degradação de moléculas específicas de RNA é um potencial mecanismo para produzir plantas geneticamente modificadas resistentes a algum vírus específico⁵⁵.

Plantas transformadas com RNA viral capaz de formar dupla fita são imunes ao vírus. Isso é possível pela expressão de dsRNAs ou de RNAs em forma de grampo (*hairpin*, Figura 20.6) de origem viral em células da planta. Plantas de tabaco transformadas com o gene viral que codifica para a protease (Pro) de *potato virus Y* em ambas as orientações, positiva e negativa, são imunes a esse vírus. Nesse caso, a imunidade é mais efetiva do que quando esse transgene é expresso em apenas uma das orientações da fita de RNA viral, pressupondo a formação e o reconhecimento de dsRNA viral⁵⁶.

Os miRNAs também podem ser usados para esse propósito. A expressão em plantas de sequências artificiais de miRNAs que têm como alvo genes virais específicos gera plantas resistentes ao vírus em questão. Por exemplo, em plantas de tabaco, a expressão de miRNAs artificiais cujo alvo era o gene que codifica para o supressor do silenciamento 2b de *cucumber mosaic virus* (CMV) inibiu eficientemente a expressão desse gene, conferindo uma resistência efetiva contra CMV⁵⁸.

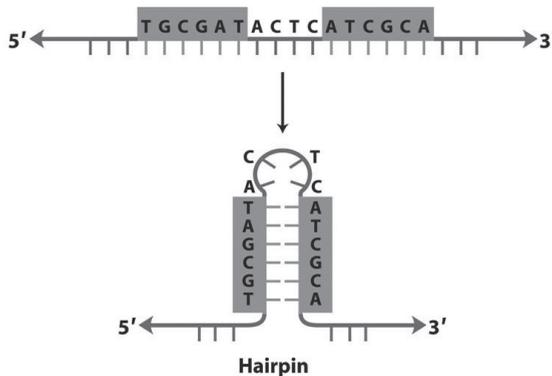


Figura 20.6 Esquema da estrutura de RNA em forma de grampo (*hairpin*). Em plantas, o RNA em forma de grampo pode ser usado para silenciar a expressão de genes-alvos usando a via do PTGS. Fonte: Studyblue⁵⁷.

Devido à simplicidade e à reprodutibilidade do método, a agroinfiltração é um dos métodos mais utilizados na transformação de plantas. Basicamente, a agroinfiltração é a transferência de transgenes de um DNA de transferência (do inglês, *transfer DNA* – T-DNA) da *Agrobacterium tumefaciens* para a célula da planta (Figura 20.7). Assim, esse método permite a coexpressão de diferentes transgenes na mesma célula.

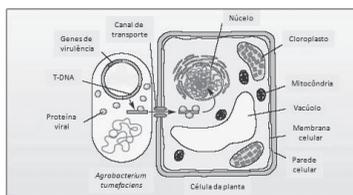


Figura 20.7 Esquema da transformação de plantas por *Agrobacterium tumefaciens*. O plasmídeo da *A. tumefaciens* possui uma região conhecida como T-DNA, que é transferido junto com proteínas de virulência para a planta por meio de um canal de transporte. Dentro da célula vegetal as proteínas de virulência promovem a integração do T-DNA ao genoma da planta. Fonte: IGEM 2010⁵⁹.

O DNA complementar (cDNA) de um determinado RNA viral é colocado em um vetor de expressão sob o controle de um promotor, normalmente o promotor 35S de *Cauliflower mosaic virus*. Plasmídeos chamados de vetores binários contêm as extremidades do T-DNA, entre as quais o transgene é clonado (Figura 20.8). Esse vetor é usado para transformar *Agrobacterium*.

Os vetores binários foram desenvolvidos para tornar a transformação mais fácil, já que os plasmídeos indutores de tumor (*tumor-inducing* – Ti) de *Agrobacterium* são difíceis de serem manipulados por causa do seu grande tamanho. Dessa forma, foi desenvolvida uma variedade de vetores binários disponíveis para agroinfiltração.

Uma vez que o DNA é uma molécula hidrofílica, ele não passa pela membrana da bactéria. Assim, é necessário tornar a célula bacteriana competente, isto é, capaz de receber o T-DNA com o transgene de interesse. A competência pode ser induzida pelo tratamento com cloreto de cálcio. A membrana da bactéria é permeável a íons cloreto, que, ao entrar na célula, carregam moléculas de água, facilitando a entrada do DNA⁶¹.

Para verificar se as células bacterianas realmente receberam o transgene de interesse, deve ser realizada uma análise pela PCR usando iniciadores específicos para tal transgene. Havendo amplificação, as culturas podem ser preparadas para a infiltração.

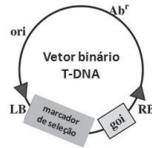


Figura 20.8 Esquema de vetor binário. O vetor binário é usado para introduzir genes em plantas usando a transformação por *A. tumefaciens*. Os genes de interesse (goi) são inseridos na região do T-DNA, delimitados por LB (do inglês *left border*) e RB (do inglês *right border*). O marcador de seleção é usado para indicar o sucesso da transformação. O gene de resistência a antibiótico (Abr) é usado para selecionar a presença do vetor na *Agrobacterium*. Legenda: ori, origem de replicação. Fonte: Plant Physiology⁶⁰.

A infiltração pode ser feita pelo método de cocultura⁶². Um explante vegetal é cultivado em um meio de cultura juntamente com a *Agrobacterium* que contém o vetor binário carregando o transgene a ser introduzido na planta. Posteriormente, o explante deverá ser transferido para um meio de regeneração apropriado, contendo antibióticos, geralmente cefotaxima, ampicilina ou carbenicilina, para eliminar as células de *Agrobacterium* que são, a partir desse momento, indesejáveis no meio de cultura. Esse meio deverá conter também um marcador de seleção, geralmente antibiótico ou herbicida, que será responsável pela inibição do crescimento das células da planta não transformadas (Figura 20.8). O efeito nocivo do agente de seleção será anulado pelo produto da expressão do gene marcador de seleção, geralmente uma enzima, nas células transformadas. Assim, somente essas células serão capazes de se regenerar em meio seletivo. Tem-se, por fim, a regeneração de plantas geneticamente modificadas expressando o(s) transgene(s) de interesse para conferir resistência à planta.

20.5 ESTUDO DE CASO: INOCULAÇÃO MECÂNICA DE DSRNA DO VÍRUS DA MELEIRA DO MAMOEIRO (PAPAYA MELEIRA VIRUS – PMEV) EM MAMOEIROS

O vírus da meleira do mamoeiro, *papaya meleira virus* (PMeV), cujo genoma é um RNA dupla fita (dsRNA), é um dos principais que infectam o mamoeiro no Brasil. Esse vírus é responsável por causar uma doença conhecida como “meleira do mamoeiro”, um importante problema fitossanitário na produção de mamão.

Apesar de diferentes genótipos de mamoeiro serem constantemente avaliados em programas de reprodução no Brasil, ainda não existe uma cultivar resistente ao PMeV. Atualmente, a melhor estratégia para controlar a meleira do mamoeiro é a identificação dos sintomas da doença e a subsequente erradicação das plantas afetadas (*roguing*)⁶³.

Uma maneira de induzir resistência antiviral em plantas é introduzir artificialmente moléculas de dsRNA de origem viral, que são capazes de desencadear uma resposta de defesa induzida por RNA^{19,20}. Considerando isso, o dsRNA do PMeV foi usado para inocular mamoeiros infectados. Os resultados mostram um atraso no processo de infecção, sugerindo que a defesa da planta tenha sido elicitada, inibindo a replicação viral⁵⁹. Esse resultado, portanto, é um prospecto para o controle da meleira do mamoeiro.

Até o presente, o PMeV foi observado ocorrendo somente em células do tipo laticíferos⁶⁴, um sistema celular hostil para a grande maioria dos micro-organismos^{65,66}. O dsRNA do PMeV está presente no látex de plantas infectadas em alta concentração e, atualmente, pode ser facilmente extraído com protocolo de extração de ácidos nucleicos usando fenol/clorofórmio⁶⁷. Rodrigues e colaboradores (2009)⁶⁸ mostram que o dsRNA do PMeV se mantém íntegro por um longo período quando o látex de plantas infectadas é diluído em tampão citrato pH 5,0 (1:1 v/v) e mantido a -20 °C, apontando para importância do uso de um tampão ácido e de baixas temperaturas para manter a integridade do dsRNA viral. Basicamente, para retirar proteínas e manter os ácidos nucleicos, preferencialmente RNA, ao látex diluído em tampão citrato adiciona-se fenol ácido (pH 4,3) e clorofórmio (2:1, v/v) em igual volume. Procede-se à agitação e centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. À solução sobrenadante adiciona-se o mesmo volume de clorofórmio, sempre mantendo as condições de agitação e centrifugação descritas acima. Após isso, transfere-se o sobrenadante para tubos contendo acetato de sódio 3 M pH 5,2 e etanol absoluto gelado para que os ácidos nucleicos sejam precipitados e, posteriormente, recuperados. Mantêm-se as amostras armazenadas a -20 °C por, pelo menos, uma noite, e após isso elas são centrifugadas por 50 minutos e colocadas para secar ao ar. Quando secos, os ácidos nucleicos, presentes no fundo do tubo como um precipitado, são ressuspensos em água ultrapura. Assim, tem-se o dsRNA do PMeV, que pode ser usado para inoculação mecânica.

Diferentes métodos de inoculação do PMeV foram usados a fim de avaliar como poderia ocorrer a transmissão desse vírus⁶⁹. Basicamente, o látex coletado de plantas sintomáticas para a meleira foi usado para inocular, por diferentes métodos, plantas sadias. Estas foram avaliadas quanto ao desenvolvimento

dos sintomas e quanto à presença do dsRNA viral. A infecção ocorreu apenas quando o látex foi injetado no ápice do caule⁶⁹. Assim, a inoculação mecânica do dsRNA pode ser feita com uma seringa estéril. Com a agulha faz-se um ferimento no ápice do caule de plantas infectadas, e a solução aquosa contendo o dsRNA é injetada. Uma gota (~ 20 µL) é suficiente.

Após a inoculação de dsRNA viral, é necessário avaliar qual seu efeito no processo de infecção do PMeV em mamoeiros. O método diagnóstico proposto por Rodrigues e colaboradores (2005)⁶⁷ tem a vantagem de ser relativamente rápido e de baixo custo. No entanto, a detecção de ácidos nucleicos pela simples corrida em gel de agarose é limitada. O limite de detecção para uma banda de dsRNA é estimada em 100 ng⁷⁰. Outro método diagnóstico, baseado em transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction* – RT-PCR), foi proposto usando látex de mamoeiro sem a extração prévia de ácidos nucleicos⁷¹. Como a presença do PMeV no látex de mamoeiros é bem estabelecida, ele é usado como primeira escolha na detecção viral. No entanto, o látex de mamoeiros possui uma alta concentração de proteínas⁷², o que pode resultar no baixo rendimento da RT-PCR. Além disso, a forte ligação entre a partícula viral e os polímeros do látex⁷³ pode diminuir a quantidade de dsRNA disponível para a transcrição reversa. Outro ponto importante a ser considerado é que a coleta de látex pode se tornar muito complicada quando se trabalha, por exemplo, com mudas de mamoeiro.

Novos métodos diagnósticos baseados em RT-PCR convencional e em tempo real permitiram a detecção precoce do PMeV em amostras de tecido do mamoeiro⁵⁹. Basicamente, o dsRNA do PMeV é extraído como descrito por Rodrigues e colaboradores (2005)⁶⁷, usando aproximadamente 100 mg de tecido e tampão de extração Doyle⁷⁴. O dsRNA é tratado com DNase I para eliminar qualquer DNA que possa estar ainda presente na amostra e, posteriormente, incubado a 96 °C por três minutos para ser desnaturado. O cDNA é sintetizado usando iniciadores randômicos e a enzima transcriptase reversa, seguindo orientações do fabricante. A amplificação ocorre usando iniciadores específicos para o PMeV⁷⁵.

Usando o método diagnóstico proposto por Abreu e colaboradores (2012)⁷⁵ foi detectada, pela RT-PCR, uma carga reduzida de PMeV apenas 57 dias após a inoculação de dsRNA⁷⁵, o que demonstra que a inoculação de dsRNA do PMeV em mamoeiros retardou o progresso da infecção. A princípio esta é uma resposta de defesa transiente que aponta para o uso de fragmentos do dsRNA viral para induzir uma resposta constitutiva de defesa contra o PMeV.

20.6 CONCLUSÕES

Neste capítulo, mostramos que, apesar de os vírus causarem importantes doenças nas plantas, os diversos métodos utilizados tradicionalmente para prevenir a infecção viral não são eficientes no controle desses patógenos. Assim, apresentamos as principais estratégias biotecnológicas utilizadas no desenvolvimento de plantas resistentes a vírus. Dentre elas, o silenciamento pós-transcricional do gene (PTGS) é um importante caminho para permitir que plantas resistam às infecções virais. O desenvolvimento de plantas modificadas geneticamente é a melhor estratégia para que a resistência antiviral seja efetiva. Alternativamente, a expressão transiente de genes de interesse representa a possibilidade de alcançar a resistência antiviral sem a manipulação do genoma da planta.

20.7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso de plantas geneticamente modificadas ainda é motivo de questionamento no mundo. Em resposta a isso, vários biotecnologistas têm sugerido o uso de tecnologias diferentes da transgenia para o melhoramento das plantas. O objetivo, nesse caso, é escapar do conceito de “organismo geneticamente modificado” (OGM). Assim, as plantas poderiam ser melhoradas geneticamente usando as técnicas de *cisgenesis*, mutagênese dirigida por oligonucleotídeo (do inglês *oligonucleotide-directed mutagenesis* – ODM), nucleases do tipo dedo de zinco (do inglês *zinc-finger nucleases* – ZFN) ou agroinfiltração *sensu stricto*.

Basicamente, em plantas conhecidas como cisgênicas, os genes inseridos são derivados da própria planta ou, no máximo, de espécies sexualmente compatíveis. A ODM é uma alteração (mutagênese) no genoma da planta que afeta a expressão do gene ou altera as propriedades de uma proteína. Essa mutagênese pode ser induzida por químicos ou por radiação. ZFNs são uma combinação de proteínas dedo de zinco que funcionam como fatores de transcrição. O método baseado em ZFNs leva a mutações pontuais, além de permitir a inserção de longas sequências no genoma da planta. Já a agroinfiltração *sensu stricto* é usada para expressar genes exógenos na planta apenas por um período de tempo (expressão transiente). Assim, o transgene não é inserido no genoma da planta, e a progênie permanece livre da sequência exógena⁷⁶.

O objetivo de todas essas técnicas é desenvolver plantas modificadas geneticamente de uma maneira considerada mais natural. No entanto, ainda não há consenso sobre isso, já que a percepção de naturalidade varia entre as pessoas⁷⁷.

REFERÊNCIAS

1. Lucas WJ, Yoo BC, Kragler F. RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(11):849-57.
2. Oparka KJ, Cruz SS. The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2000;51:323-47.
3. Van Bel AJE. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell and Environment*. 2003;26(1):125-49.
4. Kehr J, Buhtz A. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(1):85-92.
5. Biologia S. A célula vegetal 2008 [Internet]. [Cited 2014 Jan 8]. Available from: http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Morfofisiologia_vegetal/morfovegetal14.php.
6. Vassilakos N. Stability of Transgenic Resistance Against Plant Viruses. In: Çiftçi PYO, editor. *Transgenic Plants – Advances and Limitations: InTech*; 2012. p. 220-36.
7. Berkhout B, Haasnoot J. The interplay between virus infection and the cellular RNA interference machinery. *Febs Letters*. 2006;580(12):2896-902.
8. Buchon N, Vaury C. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity*. 2006;96(2):195-202.
9. Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, et al. Delay of Disease Development in Transgenic Plants That Express the Tobacco Mosaic-Virus Coat Protein Gene. *Science*. 1986;232(4751):738-43.
10. Beachy RN. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 1997;8(2):215-20.
11. Fuchs M, Gonsalves D. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: Lessons from realistic field risk assessment studies. *Annual Review of Phytopathology*. 2007;45:173-202.
12. Nejjidat A, Beachy RN. Transgenic Tobacco Plants Expressing a Coat Protein Gene of Tobacco Mosaic-Virus Are Resistant to Some Other Tobamoviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1990;3(4):247-51.
13. Malnoe P, Farinelli L, Collet GF, Reust W. Small-Scale Field-Tests with Transgenic Potato, Cv Bintje, to Test Resistance to Primary and Secondary Infections with Potato-Virus-Y. *Plant Molecular Biology*. 1994;25(6):963-75.
14. Tennant PF, Gonsalves C, Ling KS, Fitch M, Manshardt R, Slightom JL, et al. Differential Protection against Papaya Ringspot Virus Isolates in Coat Protein Gene Transgenic Papaya and Classically Cross-Protected Papaya. *Phytopathology*. 1994;84(11):1359-66.

15. Golemboski DB, Lomonossoff GP, Zaitlin M. Plants Transformed with a Tobacco Mosaic-Virus Nonstructural Gene Sequence Are Resistant to the Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(16):6311-5.
16. Prins M, Laimer M, Noris E, Schubert J, Wassenegger M, Tepfer M. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*. 2008;9(1):73-83.
17. Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
18. Pruss GJ, Lawrence CB, Bass T, Li QQ, Bowman LH, Vance V. The potyviral suppressor of RNA silencing confers enhanced resistance to multiple pathogens. *Virology*. 2004;320(1):107-20.
19. Tenllado F, Martinez-Garcia B, Vargas M, Diaz-Ruiz JR. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *Bmc Biotechnology*. 2003;3.
20. Tenllado FD-R, J. R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *Journal of Virology*. 2001;75:12288-97.
21. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004;431(7006):343-9.
22. Gene-quantification. siRNA mechanism [Internet]. [Cited 2014 Jan 7]. Available from: <http://www.gene-quantification.de/siRNA-mechanism.png>.
23. Singh J, Singh CP, Bhavani A, Nagaraju J. Discovering microRNAs from *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus. *Virology*. 2010;407(1):120-8.
24. Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG, Fraser NW. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript (Retracted Article. See vol 451, pg 600, 2008). *Nature*. 2006;442(7098):82-5.
25. Murphy E, Vanicek J, Robins H, Shenk T, Levine AJ. Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: Implications for latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(14):5453-8.
26. Sullivan CS, Ganem D. A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *Journal of Virology*. 2005;79(12):7371-9.
27. Sullivan CS, Ganem D. MicroRNAs and viral infection. *Molecular Cell*. 2005;20(1):3-7.
28. Triboulet R, Mari B, Lin YL, Chable-Bessia C, Bennasser Y, Lebrigand K, et al. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science*. 2007;315(5818):1579-82.
29. Allen E, Xie ZX, Gustafson AM, Sung GH, Spatafora JW, Carrington JC. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*. 2004;36(12):1282-90.

30. Chen XM. microRNA biogenesis and function in plants. *Febs Letters*. 2005;579(26):5923-31.
31. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(2):94-108.
32. Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(2):141-8.
33. Guo HL, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835-U66.
34. Perez-Quintero AL, Neme R, Zapata A, Lopez C. Plant microRNAs and their role in defense against viruses: a bioinformatics approach. *Bmc Plant Biology*. 2010;10.
35. Watson JM, Fusaro AF, Wang MB, Waterhouse PM. RNA silencing platforms in plants. *Febs Letters*. 2005;579(26):5982-7.
36. Gan DF, Zhang JA, Jiang HB, Jiang T, Zhu SW, Cheng BJ. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant Cell Reports*. 2010;29(11):1261-8.
37. Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*. 2002;108(4):501-12.
38. Ward JA, Ponnala L, Weber CA. Strategies for Transcriptome Analysis in Nonmodel Plants. *American Journal of Botany*. 2012;99(2):267-76.
39. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(1):57-63.
40. Oszolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(2):87-98.
41. Wang MB, Masuta C, Smith NA, Shimura H. RNA Silencing and Plant Viral Diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2012;25(10):1275-85.
42. Gan XC, Stegle O, Behr J, Steffen JG, Drewe P, Hildebrand KL, et al. Multiple reference genomes and transcriptomes for *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2011;477(7365):419-23.
43. Kunjeti SG, Evans TA, Marsh AG, Gregory NF, Kunjeti S, Meyers BC, et al. RNA-Seq reveals infection-related global gene changes in *Phytophthora phaseoli*, the causal agent of lima bean downy mildew. *Molecular Plant Pathology*. 2012;13(5):454-66.
44. Leal-Bertioli SCM, Jose ACVF, Alves-Freitas DMT, Moretzsohn MC, Guimaraes PM, Nielen S, et al. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. *Bmc Plant Biology*. 2009;9.
45. Guimarães CT, Magalhães JV, Lanza MA, Schuster I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: Borém AC, editor. Marcadores moleculares. Viçosa: UFV; 2009. p. 129-75.
46. Valle VGR, Machado MA, Müller GW, Targon MLPN, Teófilo Sobrinho J, Lee RF. Characterization of citrus tristeza closterovirus isolates by RFLP of the coat protein gene. *Fitopatologia Brasileira*. 2000;25:175-81.

47. Pal N, Sandhu JS, Domier LL, Kolb FL. Development and characterization of microsatellite and RFLP-derived PCR markers in oat. *Crop Science*. 2002;42(3):912-8.
48. Caixeta ET, Oliveira ACB, Brito GG, Sakiyama NS. Tipos de marcadores moleculares. In: Borém AC, editor. *Marcadores moleculares*. Viçosa: UFV; 2009. p. 94.
49. UFLA D-. Marcadores moleculares [Internet]. [Cited 2014 Jan 5]. Available from: [http://www.dag.ufla.br/site/_adm/upload/file/Luciane%20Vilela%20Resende/Marcadores_moleculares1_\[Modo_de_Compatibilidade\]\[2\]](http://www.dag.ufla.br/site/_adm/upload/file/Luciane%20Vilela%20Resende/Marcadores_moleculares1_[Modo_de_Compatibilidade][2]).
50. Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu JH. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms*. 2012;1819(2):137-48.
51. Liang G, Li Y, He H, Wang F, Yu DQ. Identification of miRNAs and miRNA-mediated regulatory pathways in *Carica papaya*. *Planta*. 2013;238(4):739-52.
52. Kidner CA, Martienssen RA. The developmental role of microRNA in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2005;8(1):38-44.
53. Lang QL, Jin CZ, Lai LY, Feng JL, Chen SN, Chen JS. Tobacco microRNAs prediction and their expression infected with Cucumber mosaic virus and Potato virus X. *Molecular Biology Reports*. 2011;38(3):1523-31.
54. Bazzini AA, Hopp HE, Beachy RN, Asurmendi S. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(29):12157-62.
55. Ritzenhaler C. Resistance to plant viruses: old issue, news answers? *Current Opinion in Biotechnology*. 2005;16(2):118-22.
56. Waterhouse PM, Graham HW, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(23):13959-64.
57. Studyblue. Hairpin structure [Internet]. [Cited 2014 Jan 5]. Available from: <https://www.studyblue.com/#flashcard/view/6008091>.
58. Qu J, Ye J, Fang RX. Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *Journal of Virology*. 2007;81(12):6690-9.
59. IGEN. How Agrobacterium Transforms Plants 2010 [Internet]. [Cited 2014 Jan 5]. Available from: http://2010.igem.org/wiki/index.php?title=Team:Nevada/Agrobacterium_Transformations&oldid=193796.
60. Lee LY, Gelvin SB. T-DNA Binary Vectors and Systems: *Plant Physiology*; 2008 [Internet]. [Cited 2014 Jan 5]. Available from: <http://www.plantphysiol.org/content/146/2/325/F1.expansion>.
61. Annamalai P, Rao AL. Delivery and expression of functional viral RNA genomes in planta by agroinfiltration. *Current Protocols in Microbiology*. 2006.

62. Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 1985;227:1229-31.
63. Ventura JA, Costa H, Tatagiba JDS. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI SAMH, editor. *Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management*. London: Klumer Academic Publishers; 2004. p. 201-68.
64. Kitajima EW, Rodrigues CH, Silveira JS, Alves FJL, Ventura JA, Aragão FJL, Oliveira CRB. Association of isometric virus-like particles restricted to laticifers with 'meleira' (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatologia Brasileira*. 1993;18:118-22.
65. El Moussaoui A, Nijs M, Paul C, Wintjens R, Vincentelli J, Azarkan M, et al. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001;58(4):556-70.
66. Hagel JM, Yeung EC, Facchini PJ. Got milk? The secret life of laticifers. *Trends in Plant Science*. 2008;13(12):631-9.
67. Rodrigues SP, Galvão OP, Andrade JS, Ventura JA, Fernandes PMB. Simplified molecular method for the diagnosis of Papaya meleira virus in papaya latex and tissues. *Summa Phytopathologica*. 2005;31:281-3.
68. Rodrigues SP, Andrade JS, Ventura JA, Fernandes PMB. New Approach for Papaya Latex Storage without Virus Degradation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009;40(1):122-4.
69. Rodrigues SP, Andrade JS, Ventura JA, Lindsey GG, Fernandes PMB. Papaya Meleira Virus Is Neither Transmitted by Infection at Wound Sites nor by the Whitefly *Trialeurodes Variabilis*. *Journal of Plant Pathology*. 2009;91(1):87-91.
70. Mcfadden JJP, Buck KW, Rawlinson CJ. Infrequent Transmission of Double-Stranded-Rna Virus-Particles but Absence of DNA Proviruses in Single Ascospore Cultures of *Gaeumannomyces-Graminis*. *Journal of General Virology*. 1983;64(Apr):927-37.
71. de Araujo MMM, Tavares ET, da Silva FR, Marinho VLD, Souza MT. Molecular detection of Papaya meleira virus in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 2007;146(1-2):305-10.
72. Moutim V, Silva LG, Lopes MTP, Fernandes GW, Salas CE. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Plant Science*. 1999;142(2):115-21.
73. Rodrigues SP, Da Cunha M, Ventura JA, Fernandes PMB. Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. *Plant Cell Reports*. 2009;28(5):861-71.
74. Doyle JJDJL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990;12:13-5.
75. Abreu PMV, Piccin JG, Rodrigues SP, Buss DS, Ventura JA, Fernandes PMB. Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 2012;180(1-2):11-7.

76. Brüller W, Hartmann J, Hochegger R, Leonhardt C, Mechtler K, Peterseil V, et al. Cisgenesis: a report on the practical consequences of the application of novel techniques in plant breeding. Vienna: AGES; 2012. 169 p. Disponível em: <http://www.bmgf.gv.at/cms/home/attachments/6/6/0/CH1052/CMS1352183689337/cisgenesis_20121105.pdf>.
77. Miebly H, Sandøe P, Lassen J. Multiple aspects of unnaturalness: are cisgenic crops perceived as being more natural and more acceptable than transgenic crops? *Agriculture and Human Values*. 2013;30:471-80.