

**OBTENÇÃO DE MILHO TRANSGÊNICO POR  
RNAi RESISTENTE AO VÍRUS DO MOSAICO**

**GRACIELLE TEODORA DA COSTA PINTO COELHO**

**2008**

**GRACIELLE TEODORA DA COSTA PINTO COELHO**

**OBTENÇÃO DE MILHO TRANSGÊNICO POR RNAi RESISTENTE AO  
VÍRUS DO MOSAICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia, área de concentração  
Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de  
“Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Lavras  
Minas Gerais – Brasil  
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Coelho, Gracielle Teodora da Costa Pinto.

Obtenção de milho transgênico por RNAi resistente ao vírus do Mosaico / Gracielle Teodora da Costa Pinto Coelho. – Lavras : UFLA, 2008.

72 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Mosaico. 3. RNAi. 4. Transformação genética. 5. Potivirus. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.15

**GRACIELLE TEODORA DA COSTA PINTO COELHO**

**OBTENÇÃO DE MILHO TRANSGÊNICO POR RNAi RESISTENTE AO  
VÍRUS DO MOSAICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia, área de concentração  
Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de  
“Doutor”.

Aprovada em 20 de novembro de 2008.

Andréa Almeida Carneiro, PhD

. EMBRAPA Milho e Sorgo

Newton Portilho Carneiro, PhD

EMBRAPA Milho e Sorgo

Prof. Antonio Chalfun Junior, PhD

DBI-UFLA

Marcelo Murad Magalhães, Dr

DBI-UFLA



Prof. Dr. Lucia no Vilela Paiva  
UFLA  
(Orientador)

Lavras  
Minas Gerais – Brasil

## **EPIGRAFE**

*“Nascer, morrer, renascer ainda, progredir sempre, esta é a lei”.*

Allan Kardec

## DEDICATÓRIA

A Deus,  
pela oportunidade concedida.

.  
.  
.

A todos aqueles que tornaram real este sonho.

Ao meu mais precioso tesouro na Terra, minha filha Lívia.

Ao meu querido esposo Gustavo, por todo o carinho e compreensão.

Aos meus amados pais, Firmino e Carminha e irmãos, Richard e Letícia,  
pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

A todos, dedico...

## **AGRADECIMENTOS**

A minha filha, Livia, pela compreensão da ausência. A minha mãe, Carminha e pai, Firmino; aos irmãos, Leticia e Richard, as minhas queridas sobrinhas, Iasmim e Maria Clara, pelo carinho, paciência e confiança. Ao meu esposo, Gustavo, pelo incentivo e credibilidade. À Dra. Andréa, ao Dr. Newton e ao Dr. Luciano, pela confiança depositada. Aos amigos do LBC, Rosangela, Mariana, Raymundo, Maíra, Monalisa, Keka, Leandro e Carol, pelo auxílio e apoio. A minha estagiária, Fátima, por tudo, durante a execução do trabalho, principalmente no nascimento da Livia. Às pesquisadoras da Embrapa, Elizabeth e Isabel, e aos técnicos, Martinele e Célio, por todo o apoio e suporte concedido. A todos os amigos do LCBM. Ao Gui, pela amizade incondicional. A todos aqueles que acreditaram em mim. Aqueles amigos que não estão listados aqui, mas que estiveram presentes durante esta fase de minha vida. À UFLA, pela oportunidade e a todos do setor de Fisiologia Vegetal, pela amizade. À Capes e à Embrapa, pelo apoio financeiro e contrapartida institucional. Principalmente, a Deus, por ter me concedido a graça de poder percorrer mais esta etapa da vida.

A todos, o meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	II
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 A cultura do milho .....	4
2.2 Mosaico.....	5
2.3 Sugarcane mosaic virus (SCMV).....	6
2.4 Métodos para introdução de genes em plantas.....	9
2.5 Transferência de genes usando biobalística .....	10
2.6 RNA de interferência - RNAi .....	13
2.7 RNAi e viroses.....	17
2.8 ELISA-DAS.....	19
2.9 MONTAGEM DE CONSTRUÇÕES GÊNICAS RNAI.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1 Construções gênicas.....	22
3.1.1 Escolha da seqüência .....	22
3.1.2 Clonagem da seqüência .....	22
3.1.3 Montagem do cassete RNAi .....	24
3.2 Preparação do explante e cultura de tecidos .....	29
3.3 Bombardeamento de partículas.....	31

3.4 Seleção dos explantes bombardeados e regeneração de plantas .....	32
3.5 Análises de plantas transgênicas RNAi .....	34
3.5.1 Isolamento do DNA genômico .....	34
3.5.2 PCR: reação em cadeia da polimerase .....	34
3.5.2.1 RT-PCR .....	35
3.5.2.1.1 Obtenção do RNA total.....	35
3.5.2.1.2 RT-PCR: Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase .....	36
3.6 ELISA-DAS.....	37
3.7 Contaminação das plantas e análises fenotípicas .....	38
3.8 Microscopia eletrônica.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1 Construções gênicas.....	41
4.1.1 Escolha da seqüência RNAi.....	41
4.1.2 Montagem do cassete RNAi .....	41
4.2 Preparação do explante e cultura de tecidos .....	43
4.2.1 Bombardeamento de partículas, seleção dos explantes bombardeados e regeneração de plantas .....	43
4.3 Análises moleculares de plantas transgênicas RNAi .....	46
4.3.1 Análises por PCR.....	46
4.3.2 RT-PCR: Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase .....	47
4.4 ELISA-DAS.....	51
4.5 Inoculação das plantas com SCMV e análises fenotípicas das plantas RNAi .....	54
5 CONCLUSÕES .....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

## RESUMO

Coelho, Gracielle Teodora da Costa Pinto. **Obtenção de milho transgênico por RNAi resistente ao vírus do mosaico**. 2008. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho. Entretanto, doenças não consideradas importantes estão ocasionando grandes perdas como é o caso da virose do mosaico causado pelo SCMV. Essa doença pode trazer perdas de até 50%. A busca por cultivares cada vez mais produtivas, resistentes a doenças e adaptadas às mais diversas condições de cultivo pode ser acelerada com a utilização de técnicas como manipulação gênica e transformação. Este trabalho linhagens de milho transgênico resistente ao SCMV foram obtidas pela tecnologia do RNA de interferência (RNAi). Calos friáveis de milho HiII foram transformados via biobalística usando uma construção baseada em uma região específica da capa protéica. Plantas T1 de 80 eventos foram testadas contra o vírus durante 4 semanas consecutivas por inoculação mecânica. Os resultados mostraram que 20% das plantas T1 não apresentaram sintomas. As mesmas plantas foram também testadas contra a sensibilidade ao PPT (marcador de seleção). RT-PCR foram feitos para confirmar a presença do vírus nas plantas assintomáticas e para verificação da expressão da construção. Comparação de produtividade será feita assim que linhagens homozigotas copia única forem obtidas. Os resultados obtidos demonstram que a técnica do RNAi é funcional para conferir resistência ao mosaico em plantas transgênicas de milho.

Palavras-chave: *Zea mays*, mosaico, RNAi, transformação genética, potyvirus.

Comitê orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (orientador); Dr. Newton Portilho Carneiro, Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-orientadores), Embrapa Milho e Sorgo.

## ABSTRACT

Coelho, Gracielle Teodora da Costa Pinto. **Obtaining transgenic maize resistant to RNAi mosaic virus.** 2008. 72 p. (Doctor in Agronomy - Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Brazil is the third largest maize producer in world. However, currently diseases that were not previously considered important are generating enormous losses such as the mosaic (caused by the SCMV). The crops infected with the virus can drop the productivity up to 50%. The search for more productive varieties, resistant to diseases and adapted to diverse cultivation conditions can be accelerated with techniques such as gene manipulation and transgenic. In this work, mosaic resistant transgenic maize lines were obtained by the RNA interference technology (RNAi). Friable callus of maize HiII were transformed via biolistic using a construction based a specific region on coat protein. T1 plants from 80 events were tested against the virus by 4 weeks consecutive mechanical inoculation. The results showed 20% of the T1 plants with no symptoms. The plants were also tested against sensitivity to PPT (selection marker). RT-PCR were done to confirm the presence of the virus on the asymptomatic plants and the expression the RNAi construction. Productivity comparison with no transgenic plants will be done as soon as homozygous with a single copy transgene is obtained. These results have indicated that the technique of RNAi is useful to generate virus-resistant transgenic maize plants.

Key-works: *Zea mays*, Mosaic, RNAi, Genetic transformation, Potyvirus.

---

Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (orientador); Dr Newton Portilho Carneiro, Dra Andréa Almeida Carneiro (co-orientadores), Embrapa Milho e Sorgo.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho vem crescendo extensamente no mundo. No entanto, a limitação da terra produtiva, os recursos de água, os estresses ambientais, as doenças que acometem a cultura e o grande crescimento da população ocasionam uma grande demanda no aumento da produção, assim como na manutenção e na melhora sua qualidade (Huang & Wei, 2004)

Dentre os grandes prejuízos enfrentados pela agricultura, encontram-se os ataques de pragas e doenças. No caso do milho, esses problemas têm se agravado desde 1990, com o aumento das áreas cultivadas, tanto na safra normal como na “safrinha”, devido, principalmente, ao intenso cultivo em áreas irrigadas e à falta de adoção de rotação de culturas em certas áreas. Assim, nos últimos anos, doenças que antes não constituíam problema, aumentaram de importância, como é o caso das viroses e enfezamentos (causados por mollicutes - fitoplasmas e espiroplasmas) (Oliveira et al., 2003; Gonçalves et al., 2007).

Estimativas experimentais mostram reduções na produção de até 50%, em genótipos mais susceptíveis ao mosaico (Fernandes et al., 1995). Dentre as estirpes do complexo viral do mosaico comum, verificou-se que *Sugarcane Mosaic Vírus* (SCMV) e *Maize Dwarf Mosaic Vírus* (MDMV) são as viroses, do gênero potivirus mais importantes, provocando perdas significativas na produção de grãos e de forragem em genótipos de milho susceptíveis (Fuchs e Grüntzig, 1995). As partículas dos potivirus causadores do mosaico são flexíveis e apresentam comprimento aproximado de 750 nm (nanômetros) (Almeida, 1998; Shukla et al., 1994).

Pesquisas demonstram que a biotecnologia está buscando técnicas que, cada vez mais, possam garantir a produção de cultivares com resistência a diversas doenças, como: (i) RNA antisense, um polinucleotídeo produzido a partir de um gene antisense; (ii) co-supressão, uma interação entre genes

localizados em diferentes regiões do genoma, pode reduzir a atividade de outros genes, simultaneamente e, mais recentemente; o advento de (iii) RNA interferente (RNAi), mecanismo de silenciamento direto de genes, com seqüências específicas de 19-25pb (Venturini et al., 2006).

Plantas possuem diferentes mecanismos para proteção contra invasão por patógenos (Vermeulen et al., 2005; Poethig et al., 2006; Carrington et al., 2001) destas, a mais recentemente descrita é o RNA interferente (RNAi).

A primeira classe a participar do RNAi é o dsRNA, que é formado pela complementariedade de bases de duas fitas simples de RNA e automaticamente reconhecidos por um complexo enzimático chamado DICER (Chiu & Rana, 2003, Barbosa & Lin, 2004). Esse primeiro complexo tem atividade RNase III e digere o dsRNA em fragmentos de 21 a 25 pb. Esses pequenos fragmentos são reconhecidos por um segundo complexo enzimático que acopla a regiões homólogas desses fragmentos de 25 pb no mRNA alvo (que nesse caso será o próprio genoma do potivírus), degradando-o e impossibilitando que o vírus produza as enzimas necessárias à sua multiplicação (Chiu & Rana, 2003, Wang & Metzloff, 2005). Para que a fita de dsRNA ocorra nesse processo, uma região conservada do genoma do vírus (cerca de 400 pb) é colocada duas vezes na construção gênica, sendo uma delas invertida em relação à primeira. Quando a construção é transcrita, ocasiona a formação de uma dupla fita de RNA. Trabalhos de RNAi em plantas têm sido publicados com sucesso, contudo, obtenção de resistência em milho ao potivírus não foi ainda descrita.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a eficiência do RNAi, baseado na capa protéica do genoma viral, na obtenção de plantas de milho transgênicas resistentes ao vírus do mosaico. Esta seqüência e foi clonada em duas cópias invertidas separadas por um íntron, para que houvesse a formação de um grampo e, essa estrutura seria o substrato, para que a própria maquinaria da planta, formasse os RNAs, que silenciariam o vírus na planta transgênica. A

construção foi transferida para o milho pelo processo da biobalística, resultando em 33 plantas transgênicas assintomáticas ao mosaico.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A cultura do milho**

Atualmente, o milho (*Zea mays*) é um dos cereais mais cultivados no mundo (155 milhões de ha - hectares). Os principais países produtores de milho são os Estados Unidos (90 milhões de toneladas), a China (48 milhões de toneladas) e o Brasil (38 milhões de toneladas), seguidos por México, França, Argentina e Índia. No Brasil, as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste são as maiores produtoras, destacando-se, principalmente, os estados do Paraná e de Minas Gerais, segundo a Food and Agriculture Organization on the United Nations (FAO, in Crop prospects and food situation, n. 4 de outubro de 2008).

O milho é de grande importância econômica para o Brasil, sendo um dos grãos mais produzidos no país. A produção de milho se destaca por sua presença tanto na alimentação humana quanto na alimentação animal, sendo utilizada tanto forma *in natura* quanto na forma beneficiada, sendo empregados também seus subprodutos, com; farelos, farinhas, pães e silagens entre outros (Almeida, 1998).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2008), referentes à safra de 2008, mostram que o Brasil produziu, neste ano, na safra, 39,6 milhões de toneladas, e prevê para a safrinha, 18,2 milhões de toneladas, chegando a um total de 57. milhões e 800 mil toneladas. Segundo pesquisa realizada pelo IBGE (2008), o Brasil terá safra e entressafra (1ª safra e 2ª safra) recordes neste ano.

Milhões de pessoas, em regiões tropicais e subtropicais do mundo, dependem do milho para a sua subsistência. Nestas áreas, é freqüentemente baixa a produtividade nas colheitas, devido a estresses bióticos e abióticos (O'Connor-Sánchez et al., 2002).

Entretanto, no Brasil, a limitação da produtividade no milho causada pelo mosaico, que não era considerada fator importante (Balmer, 1980), recentemente passou a se destacar. O mosaico é, atualmente, uma das doenças mais importantes para as culturas do milho e do sorgo no Brasil, devido ao aumento da incidência e às perdas, que podem chegar à 50% da produtividade (Fernandes et al., 1995; Fernandes, 1998; Waquil et al., 1996; Almeida et al., 2001), principalmente no período da safrinha (maio a julho), devido à época em que esta ocorre. Neste plantio, a cultura é exposta a condições climáticas distintas dos plantios de verão (época da safra), o que pode determinar a alta incidência e severidade de doenças no milho, quando as condições de temperatura, umidade relativa do ar e luminosidade são favoráveis a condições de insetos vetor (Fernandes, 1998; Oliveira et al., 2002).

## **2.2 Mosaico**

O mosaico da cana-de-açúcar é uma importante doença do milho, sendo, em conjunto com o raiado fino, as duas principais viroses incidentes nesta cultura, no Brasil (Gonçalves et al., 2007). Em cultivares mais susceptíveis, segundo Casela et al. (2006) e Gonçalves et al. (2007), o mosaico pode causar mosqueado ou necroses nas folhas, raquitismos, caracterizado pelo encurtamento dos entrenós e esterilidade parcial ou total da planta, resultando na redução na produção de grãos e de forragem. Além disso, Gonçalves et al. (2007) afirmam que o crescimento da planta poderá ser reduzido de acordo com a estirpe do vírus e a cultivar do milho infectado, principalmente se a infecção ocorrer nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta. Estimativas experimentais mostram reduções na produção de até metade da lavoura prevista, em genótipos suscetíveis ao mosaico (Fernandes et al., 1995). Estes mesmos autores

acrescentam, ainda, que os efeitos causados pelo mosaico nas plantas de milho são tanto maiores quanto mais cedo se estabelece a infecção.

Os sintomas desta virose, normalmente, apresentam-se em padrão de mosaico, caracterizando-se pela presença de áreas irregulares de cor verde normal, sem relação com as nervuras, sobre áreas de coloração verde-claro ou sobre um fundo clorótico (Fernandes et al., 1995; Almeida, 1998). Geralmente, as áreas cloróticas se apresentam difusas, podendo ter forma definida e até serem acompanhadas de necrose (Almeida, 1998). Os sintomas iniciais da doença são pontos cloróticos no meio e na base da folha dispostos linearmente (Gonçalves et al., 2007). Estes sintomas podem ser observados na lâmina e na bainha de todas as folhas e na palha das espigas que se desenvolverem após a infecção. Algumas vezes, as plantas podem se apresentar levemente enfezadas (Fernandes et al., 1995).

Os sintomas mais nítidos podem ser observados nas folhas jovens em plantas, até a época de florescimento, algumas vezes desaparecendo quando estas folhas se tornam mais amareladas, prosseguindo, então, a necrose foliar (Almeida, 1998; Fernandes et al., 1995).

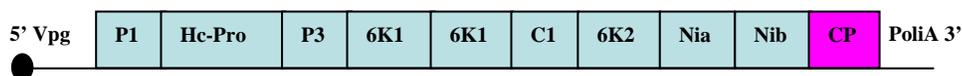
### **2.3 Sugarcane mosaic virus (SCMV)**

O *Sugarcane Mosaic Virus*, ou vírus do mosaico da cana-de-açúcar, ou SCMV, foi descrito, pela primeira vez, nos Estados Unidos da América, em 1919, por Brandes (Brandes, 1919). Entretanto, no Brasil, foi descrita somente em 1971, por Costa et al. (1971), e, durante anos, foi considerada de pouca importância econômica para o milho (Balmer, 1980). No entanto, atualmente, esta virose vem causando expressivas perdas na cultura do milho em todo o mundo.

Na China, o mosaico é considerado a virose mais importante do milho, gerando perdas anuais de 2% a 30% na produtividade final (Li et al., 2007). No Brasil, essas perdas podem chegar a 50%, em se tratando de genótipos mais suscetíveis à doença (Fernandes et al., 1995). O mosaico não leva a perdas produtivas somente no milho, tendo importante participação na diminuição da produtividade de importantes espécies de poaceas, como cana-de-açúcar, milho e sorgo (Chen et al., 2002). A família *Potyviridae* é o maior grupo causador de viroses em plantas e, possivelmente, a família mais importante economicamente (Chen et al., 2002).

O vírus do mosaico pertence à família potyviridae, sendo conhecidas diversas estirpes e variantes (Fernandes et al., 1995). Este vírus caracteriza-se como partícula filamentosa longa e com flexura de 750 nm de comprimento e 13 nm de diâmetro (Almeida, 1998; Shukla et al., 1994).

O genoma viral de RNA (Figura 3), do *Sugarcane Mosaic Virus* ou SCMV, indicando as proteínas codificadas pelo vírus e as suas possíveis funções (Shukla et al., 1991), é constituído por uma longa seqüência aberta de leitura (open read frame), que é traduzida em um polipeptídeo longo, variando de 340 a 368 kDa, dependendo do potivírus. Esse polipeptídeo é, subsequente, clivado em proteínas menores, a partir do N terminal, por meio de proteases. São elas: P1 primeira, uma protease, HC-Pro helper component – protease, P3 terceira protease. A proteína C1 com atividade RNA helicase; 6K1 e 6K2 são peptídeos; NIa e NIB são proteínas de inclusão nuclear a e b, em que NIa é uma protease e NIB, provavelmente, uma RNA polimerase dependente de RNA e CP é a proteína da capa. Por analogia com outros sistemas virais, sugere-se que VPg sirva como primer para a síntese do vRNA (Shukla et al., 1994) e estabilização do mRNA contra o ataque de exonucleases.



**FIGURA 1** - Representação esquemática da organização genômica de potivírus (adaptado de Murphy et al., 1995),

A virose do mosaico comum do milho pode ser causada por 4 diferentes potivírus: SCMV; *Maize Dwarf Mosaic Vírus*, ou MDMV; *Sorghum Mosaic Vírus*, SrMV e *Johnsongrass Mosaic Vírus*, ou JGMV (Almeida, 1998). Apesar disso, segundo Gonçalves et al. (2007), no Brasil, apenas as espécies SCMV e MDMV são descritas infectando naturalmente o milho.

Segundo Shukla et al. (1994), independente da espécie contaminante (SCMV, MDMV, SrMV e JGMV), a virose chamada de mosaico, geralmente, é atribuída ao SCMV, devido ao fato de os 4 potivírus: (i) produzirem sintomas similares; (ii) serem transmitidos pelos mesmos vetores e (iii) possuírem inter-relação sorológica.

O vírus é transmitido mecanicamente e, na natureza, é disseminado de maneira não persistente. Pode ser transmitido por mais de 20 afídeos (Fernandes et al., 1995; Shukla et al., 1994). No caso do milho, o pulgão-do-milho (*Rhopalosiphum maidis*) é considerado o principal transmissor (Fernandes et al., 1995; Casela et al., 2006), ressaltando-se também, na transmissão, os afídeos *Dactynotus amrosiae*, *Schizaphis graminium* e *Hysteroneura setariae* (Shukla et al., 1994). Esses agentes transmissores são os prováveis responsáveis pela infecção de cerca de 250 espécies de gramíneas hospedeiras dos vírus do mosaico. Essas espécies de gramíneas conhecidas podem servir também como reservatório de inóculo em áreas de cultivo de milho (Fernandes et al., 1995), o

que pode contribuir para o aumento da incidência do vírus em determinados locais.

#### **2.4 Métodos para introdução de genes em plantas**

Melhoristas de plantas dependem de variabilidade genética existente na natureza como matéria-prima para o desenvolvimento de cultivares melhoradas. O melhoramento tradicional conta apenas com características presentes na espécie que podem ser manipuladas e transferidas sem atravessar as barreiras biológicas que definem as espécies. Melhoria genética de colheitas foi alcançada tradicionalmente por hibridação sexual entre espécies em numerosas cultivares, com rendimentos altos e desempenho agrônômico superior. Obtenção de plantas via melhoramento convencional, às vezes combinada com técnicas de citogenética clássica, continua sendo o método principal de melhoria de cultivares de cereal (Repellin et al., 2001).

O advento da tecnologia de DNA recombinante e a possibilidade de transformar plantas permitem o acesso a um variado "pool" de genes e possibilitam a transferência de genes além dos limites permitidos pelo melhoramento tradicional (Repellin et al., 2001). Devido a essa nova tecnologia, foram superadas barreiras no cruzamento e genes de fontes sem conexões ficaram disponíveis para ser introduzidos assexuadamente em plantas.

Além de permitir incorporação de genes de interesse provenientes de outra espécie vegetal, microbiana ou animal, é possível manipular *in vitro* os genes próprios da espécie, para, por exemplo, alterar seu nível de expressão, o momento de ativação ou modificar a expressão tecido-específica com uma finalidade determinada (Batty & Evans, 1992; Christou, 1995; Ishida et al., 1996; Offringa et al., 1992).

Como as monocotiledôneas sempre se mostraram bastante recalcitrantes à transformação via agrobactéria vários métodos de transformação com DNA livre, como microinjeção, eletroporação e biobalística (transformação via “*gene-gun*”), foram desenvolvidos (Batty & Evans, 1992; Christou, 1995; Offringa et al., 1992).

## **2.5 Transferência de genes usando biobalística**

Em uma tentativa de solucionar alguns dos problemas relacionados com transformações de plantas utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, especialmente as limitações relacionadas com hospedeiro específico, foi desenvolvida a transformação usando biobalística (Klein et al., 1987). A biobalística é baseada na transformação de células usando micropartículas de tungstênio ou ouro revestidas com o DNA de interesse. Usando equipamentos especiais denominados “*particle gun*”, as micropartículas são atiradas e penetram a parede celular e as membranas sem matar as células (Klein et al., 1987). Em geral, o tecido que é bombardeado pode ser regenerado e plantas transgênicas são produzidas. Numerosos trabalhos de pesquisa têm sido publicados, demonstrando a viabilidade da técnica de biobalística para a transformação de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

Gordon-Kamm et al. (1990) e Fromm et al. (1990) foram os dois grupos precursores da produção de plantas transgênicas de milho utilizando biobalística. Estes pesquisadores obtiveram plantas férteis de milho transformadas e demonstraram a possibilidade de se transferir os genes introduzidos para a progênie. A estratégia descrita por Gordon-Kamm et al. (1990) envolveu três componentes principais: a) culturas de calos embriogênicos em suspensão; b) introdução de DNA via bombardeamento com partículas metálicas cobertas com DNA e c) um sistema de seleção baseado em marcadores dominantes. A cultura

de células em suspensão foi iniciada de calos embriogênicos friáveis do tipo II (Armstrong & Green, 1985) e o bombardeamento com microprojéteis foi calibrado de maneira a introduzir partículas com dano mínimo em um grande número de células (Gordom-Kamm et al., 1990).

Casas et al. (1993) publicaram um protocolo de regeneração e transformação de *Sorghum bicolor* usando biobalística. Entretanto, apenas 0,3% dos embriões usados produziram calos que eram embriogênicos.

Trigo transgênico foi produzido por Loeb & Reynolds (1994), a partir de micrósporos bombardeados com construções gênicas contendo um dos seguintes promotores, 35S, ubiquitina do milho ou Zm 13 (pólen específico) fusionado ao gene repórter GUS. O promotor da ubiquitina foi o que rendeu melhores resultados; 21 dias após o bombardeamento dos micrósporos, atividade do GUS foi detectada em embriões em desenvolvimento. O processo de transformação utilizando biobalística não afetou a germinação dos micrósporos de trigo (Loeb & Reynolds, 1994).

Trigo transgênico também foi gerado após o bombardeamento de embriões com partículas de ouro revestidas com a construção gênica composta do promotor da actin-1 e do gene repórter GUS. Doze plantas de trigo transgênicas foram produzidas a partir de 1.050 embriões bombardeados. Quatro dessas plantas foram crescidas em casa de vegetação até a maturidade e produziram sementes férteis (Becker et al., 1994).

*Tritordeum* transgênico, um cereal, foi também obtido por Barcelo et al. (1994), usando a técnica da biobalística. Inflorescências imaturas de *Tritordeum* foram bombardeadas com a construção gênica contendo o gene repórter GUS sobre o controle do promotor da actin1-D de arroz (pAct1-Dgus). As plantas recuperadas foram positivas em análises de *Southern blot* e em análises histoquímicas para a detecção do GUS. Plantas transgênicas foram colocadas em

casas de vegetação e desenvolveram até a maturidade, produzindo normalmente flores e sementes.

Embriões de aveia bombardeados com partículas de ouro revestidas com o gene repórter GUS sobre o controle do promotor Adh1 de milho, germinaram normalmente e produziram quatro plantas transgênicas a partir de 90 plantas analisadas (Ritala et al., 1994).

Buscando otimizar sistemas de transformação via biobalística, atualmente, muitos pesquisadores vêm descrevendo diferentes protocolos. Um novo sistema para a produção de milho transgênico de genótipos tropical e subtropical, a partir do bombardeamento de calos organogênicos, foi desenvolvido por O'Connor-Sánchez et al. (2002). Estes pesquisadores conseguiram transformar e regenerar seis genótipos diferentes de milho tropical.

Tadesse et al. (2003) trabalharam com otimização de protocolos de transformação via biobalística em sorgo (*Sorghum bicolor*), testando parâmetros físicos incluindo pressão de aceleração das partículas e distância das micropartículas dos explantes. Neste trabalho, os pesquisadores transformaram embriões, calos e brotos de sorgo.

Brandão et al. (2005) desenvolveram um protocolo de regeneração embriogênica de *Sorghum bicolor* a partir de inflorescência imatura altamente eficiente. Utilizando este protocolo, o grupo conseguiu transformar este cereal por meio da biobalística, com eficiência em torno de 1%, o que é considerado alto no caso do sorgo, onde o usual é 0,3% (Casas et al., 1993).

A biobalística tem se mostrado um método promissor para a introdução de novas e desejáveis características em cereais. Vários protocolos de regeneração e transformação de cereais usando a técnica da biobalística estão sendo publicados. Atualmente, esta técnica tem sido, rotineiramente, utilizada na produção de milho transgênico pelo Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo (Carneiro et al., 2003, 2004).

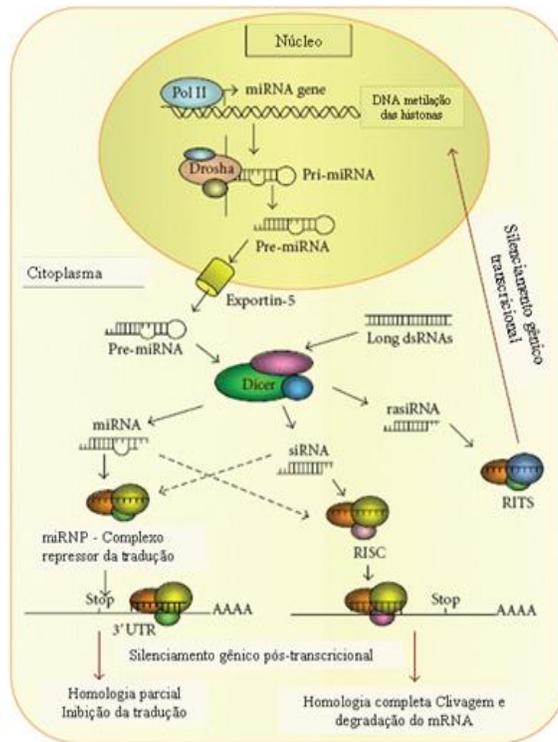
## 2.6 RNA de interferência - RNAi

O RNAi (RNA de interferência) é um mecanismo natural em organismos eucariotas como plantas, animais (Wang & Metzloff, 2005; Wang et al., 2003) e fungos (Wang et al., 2003) de silenciamento direto de genes. Neste mecanismo, seqüências específicas de RNAs dupla-fita (dsRNAs), são degradadas por um complexo enzimático chamado Dicer, originando seqüências de 21-25pb (Chiu & Rana, 2003; Barbosa & Lin, 2004), conforme representado na Figura 2.

As Dicers são nucleases, homólogas à RNase III de *Escherichia coli* (Barbosa & Lin, 2004) que apresentam um domínio de ligação aos dsRNAs.

Os fragmentos de dsRNA se associam a um complexo multimérico chamado RISC (*RNA Interference Specificity Complex*) formando os *small interfering RNAs* (sRNAs). Uma helicase presente no complexo RISC abre a dupla-fita dos sRNAs, de forma que a fita simples do duplex guia o complexo até o próximo mRNA alvo. O complexo RISC também possui uma endorribonuclease que é responsável pela clivagem do mRNA (Chiu & Rana, 2003; Wang & Metzloff, 2005; Barbosa & Lin, 2004; Waterhouse et al., 2001; Fire et al., 1998).

O silenciamento do RNA pode acontecer nas direções 3'-5' ou 5'-3', em que, por homologia das seqüências, há a formação de dsRNA- *double-stranded* RNA ou Grampos de RNA - *hairpin* RNA (hpRNA). A presença dessas estruturas leva à clivagem das mesmas pelas Dicers (Figura 2, 3).



**FIGURA 2:** Representação esquemática do mecanismo natural de resposta de silenciamento gênico mediado por RNA. mRNAs são transcritos de genes endógenos pela RNA polimerase II como longos transcritos primários (pri-miRNAs). No núcleo, a Drosha, uma enzima tipo RNase III, forma um grampo característico desta estrutura, contendo os 70 pb precursores do mRNAi originando o pré-mRNAi. Os pré-mRNAis são transportados para fora do núcleo pela Exportin-5, para serem processados pela Dicer e gerar o mRNAi de 21-23 nucleotídeos (nt). Similarmente, sRNAi duplexes de 21–25 nt são gerados a partir de seqüências longas dsRNAs no citoplasma pela ação da Dicer. Ambas as seqüências s/mRNAis são retidas pelo complexo RISC ou miRPN, ativando-os a atacar a seqüência alvo (mRNAi homólogo). sRNAis são totalmente complementares e induzem à clivagem e à degradação do mRNA transcrito. Em contraste, mRNAis, usualmente, apenas se ligam na parte complementar do mRNA na região 3'UTR e inibem a leitura para a tradução da proteína. Genes de inibição transcricional têm sido descritos como seqüências repetidas associadas a sRNAis (rasRNAi). Acredita-se que os “*RNAi-induced transcriptional gene silencing*” (RITS) sejam um complexo e podem estar presentes em locis genômicos homólogos, mas, este mecanismo ainda não está bem compreendido. Adaptado de Venturini et al. (2006)

Em plantas, este mecanismo resulta da ação de “sondas” (RNAis) de RNAs, especificamente aqueles que reconhecem o RNA externo para a degradação (Waterhouse et al., 2001), em casos de defesa contra patógenos. Esse reconhecimento pode acontecer com a formação de dsRNAs ou ssRNAs - *single-stranded* (ss) e acontece devido à presença de pequenas moléculas que apresentem homologia com RNA presentes na célula (Waterhouse et al., 2001). Segundo Fire et al. (1998), quando o evento está relacionado à presença de dsRNAs, apresenta uma potente e específica interferência, evidenciando o silenciamento na presença de grampos e formações que favoreçam a formação do RNA fita-dupla.

O RNAi, por ser uma resposta natural endógeno de defesa da planta se espalha célula a célula, através dos plasmodesmas e floema (Neilson & Sharp, 2008), gerando uma resposta rápida e eficaz. É uma via celular endógena envolvida na regulação pós-transcricional (Vermeulen et al., 2005), através da inativação de genes homólogos, causada pelo aumento da degradação de RNA.

Segundo Poethig et al. (2006) e Carrington et al. (2001), este mecanismo está relacionado, de maneira natural, com a regulação pós-transcricional de genes. Pode estar envolvido no desenvolvimento, na fisiologia da planta, em eventos com a supressão de RNAs deletérios, como RNAs oriundos de transposons, na defesa de ácidos nucléicos invasivos, incluindo viroses e ainda seqüências repetitivas no genoma (Wang & Metzlaflf, 2005; Carrington et al., 2001). O silenciamento gênico usando a tecnologia do RNAi é um evento estável, uma modificação epigenética desencadeada por seqüências específicas de sinais que, em alguns casos, podem espalhar sistemicamente (Serio et al., 2001).

O RNAi é uma sofisticada ferramenta por meio da qual se podem interconectar respostas celulares de defesa e controle total na manipulação da expressão de genes experimentalmente (Wang et al., 2003). Na aplicação desta

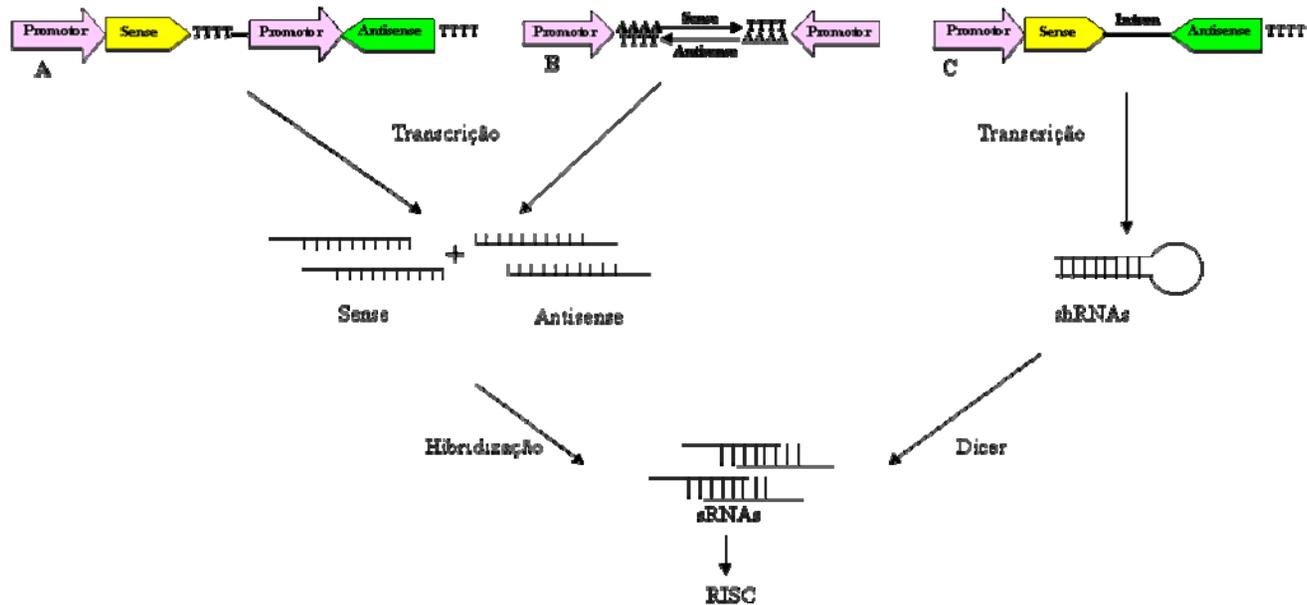
técnica, podem-se utilizar pequenas seqüências de RNA - sRNAs e mRNAs - para controlar a expressão de seqüências específicas de genes alvo, endógenos ou exógenos, para inibição pós-transcricional ou para a regulação (diminuição) da expressão do gene em questão (Echeverri & Perrimon, 2006).

## 2.7 RNAi e viroses

Grande parte das plantas é infectada por vírus que buscam replicar seus genomas. Quando isso acontece, são produzidos RNAs com potencial para formar ligações de interferência, sendo, portanto, indutores deste mecanismo de defesa (Waterhouse et al., 2001; Carrington et al., 2001). Várias linhas de pesquisas indicam que o silenciamento de RNA é, em geral, um mecanismo de defesa antiviral em plantas (Vance & Vaucheret, 2001).

Em alguns casos, o silenciamento do RNA durante a infecção pode resultar na recuperação do fenótipo, em que folhas novas emergem livres de vírus e de sintomas da infecção (Carrington et al., 2001). Isso pode se dar devido à cinética e ao padrão de propagação do sinal para o silenciamento que, segundo Neilson & Sharp (2008), é capaz de espalhar de células a célula, através dos plasmodesmas e sistemicamente através do floema. Estes autores ressaltam, ainda, que o possível mensageiro deste sinal seja um ácido nucléico. Além disso, o silenciamento de RNA em resposta a uma infecção viral pode proteger contra a infecção cruzada por viroses intercorrelacionadas (Carrington et al., 2001).

O PTGS (Silenciamento gênico pós-transcricional) é um mecanismo de defesa natural antiviral, e pode ser utilizado no controle de viroses em plantas transgênicas (Hamilton & C. Baulcombe, 1999, Waterhouse et al., 2001). Transgenes que codificam seqüências de RNAi, autocomplementares do tipo *Hairpin*, são eficazes na direção da degradação do gene exógeno presente na célula (Figura 2). Esses transgenes são eficientes também para a degradação de genes endógenos (SS) mRNAs, podendo ser aplicados, dessa forma, para a supressão de genes (Waterhouse et al., 2001). Atualmente, técnicas baseadas no RNAi (sRNAs – *Short interfering RNAs*) vêm sendo amplamente empregadas na pesquisadas e na supressão de seqüências virais intracelulares (Ramesh et al., 2007)(Figura 3).



**FIGURA 3:** Representação esquemática do vetor baseado no RNAi. Expressão de sense e antisense direcionada por dois promotores (A) ou a partir de um único fragmento de DNA sob o controle de dois promotores oposto (B), transcrição de sense e antisense direcionada pelo mesmo promotor com formação de grampo. Após expressão intracelular, em (A) e (B) acontecerá a hibridização, originando dois tipos de sRNAi duplex funcionais. shRNAs são transcritas como *single-stranded* e RNAis, formando um *hairping* em (C). Depois da transcrição e da formação do *grampo*, esta estrutura é clivada pela Dicer, produzindo os siRNAs. Adaptado de Venturini et al. (2006).

## 2.8 ELISA-DAS

Os potivírus podem ser detectados por diversas técnicas, baseadas nas suas propriedades biológicas, citológicas, estruturais e antigênicas. Dentre essas técnicas, destacam-se a sorologia de partículas virais e de regiões das proteínas da capa protéica, que tornam o ELISA-DAS, *Double-antibody sandwich*, é amplamente utilizado, por sua eficiência, na identificação e classificação de viroses em plantas (Almeida, 1998).

O ELISA-DAS baseia-se no princípio clássico da sorologia, em que o antígeno é reconhecido pelo antissoro, uma imunoglobulina, que lhe deu origem, formando o complexo antígeno-anticorpo, associado a propriedades colorimétricas. Esta colorimetria é resultado da ação de uma enzima conjugada a imunoglobulina, sobre um substrato cromogênico (Almeida, 1998). Nesta técnica emprega-se o anticorpo primário para recobrir a superfície da placa. São esses anticorpos que irão capturar as proteínas específicas presentes no extrato. Em seguida é adicionado um anticorpo secundário que também é específico para a proteína alvo, formando um sanduíche dos dois anticorpos e da proteína alvo. O anticorpo secundário está conjugado a uma enzima. Adiciona-se, então, o substrato para esta enzima (Aragão & Ribeiro, 1998). Ainda segundo estes autores, o ELISA-DAS é de duas a cinco vezes mais sensível que o ELISA-direta e o ELISA-indireta, em que não há um anticorpo ligado à placa.

Em relação aos estudos sobre o vírus do mosaico no milho, em 1988, Jones et al. (1988) aplicaram o ELISA-DAS para a detecção e a diferenciação de estirpes A e B do MDMV, em plantas de milho infectadas com o mosaico. Estes autores relatam resultados com 100% de eficácia para o teste na estirpe MDMV-A e 95% para MDMV-B, evidenciando a qualidade da análise para viroses do mosaico em milho.

Atualmente, o ELISA-DAS é empregado pela sua confiabilidade. Mohammadi et al. (2006) aplicaram testes sorológicos de ELISA-DAS em amostras usando antissoros dos quatro membros da família potyviridae: *Sugarcane Mosaic Vírus* (SCMV), *Maize Dwarf Mosaic Vírus* (MDMV), *Sorghum Mosaic Vírus* (SrMV) e *Johnsongrass Mosaic Vírus* (JGMV). Estes pesquisadores obtiveram resultados satisfatórios em todas as amostras com o antissoro do SCMV, não observando nenhuma reação com os outros três antissoros (MDMV, SrMV e JGMV).

A produção de antissoro para os membros da família potyviridae, bem como as diferenças sorológicas deste grupo, não é recente, vem sendo pesquisada desde a década de 1970 (Hollings & Brunt, 1981). Os resultados obtidos por Jones et al. (1988), dentre outros, contribuíram muito para a validação do ELISA-DAS para viroses em plantas. Estudos como os realizados por Voller et al. (1976), Clark & Adams (1977), Hollings & Brunt (1981), Jones et al. (1988) e Mohammadi et al. (2006) demonstram a confiabilidade da técnica para a diagnose de viroses em plantas.

## **2.9 Montagem de construções gênicas RNAi**

Para a montagem de construções RNAi deve-se escolher uma seqüência de aproximadamente 400 nucleotídeos.

As seqüências RNAi são baseadas em características físico-químicas e homologias, pois a formação da estrutura secundária pode não garantir a geração de um sRNAi eficiente e funcional. Do mesmo modo, diferentes RNAis podem apresentar diferentes níveis de silenciamento (Venturini et al., 2006)

Na tentativa de se obter seqüências onde o silenciamento possa ter um sucesso maior, softwares são empregados (Zuker, 2003) Estes softwares são

capazes de calcular a energia livre necessária para a formação do RNAi, como o MFold (Zuker, 2003). O MFold 3.2, com base na energia livre ( $\Delta G$ ), prediz um  $\Delta G$  mínimo necessário para que ocorra o pareamento das bases, favorecendo a formação de dsRNAs (Zuker, 2003).

Para a clonagem de construções RNAi, o uso dos vetores pHANNIBAL e pKANNIBAL (Figura 5B) (CSIRO plant industry, Austrália) vem sendo amplamente empregadas (Helliwell e Waterhouse,2003). Estes vetores possuem um intron que favorece a formação do grampo (ihpRNA – intron hairping-RNA) originando no transgene os dsRNA. Este tipo de construção (ihpRNA) pode apresentar até 100% de silenciamento em plantas transgênicas (Helliwell e Waterhouse,2003).

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Construções gênicas**

#### **3.1.1 Escolha da seqüência**

Para a montagem do cassete gênico, um fragmento gênico da região 3' da CP (capa protéica) do SCMV (Figura 1) foi escolhido, por ser uma região conservada entre os diferentes potyvirus.

Para tanto, foram utilizados seqüenciamentos de vários isolados de SCMV realizados na Embrapa Milho e Sorgo (número de acesso no NCBI - DQ315489, DQ315490, DQ315491, DQ315492, DQ315493, DQ315494, DQ315495, DQ315496, DQ315497, DQ315498). Na busca de regiões mais conservadas, seqüência dos genomas completos de *Sorghum Mosaic Vírus* - SrMV (U57358), *Sucarcane Mosaic Vvirus* - SCMV (NC\_003398), *Johnsongrass Mosaic Vírus* - JGMV (NC\_003606) e *Maize Mosaic Vírus* - MDMV (NC\_003377) disponíveis também foram consultadas. A seqüência final foi escolhida com base na tecnologia do RNAi e selecionada por meio do software MFold (Zuker, 2003).

#### **3.1.2 Clonagem da seqüência**

Esta seqüência foi amplificada por meio de reação de PCR do clone #BR06, utilizando-se os *primers* SCMV 5' (GCG GAT CCT CTA GAC TCG AGT AGG GAC TGG TGC AAC AG) X SCMV 3' (GCG GAT CCA AGC TTG GTA CCA TCG ATT GAA GTC CGT ACC TTG G), originando seqüência de 499 pb descrita acima. Cada 25 µl de reação continham tampão de PCR 10X, 2

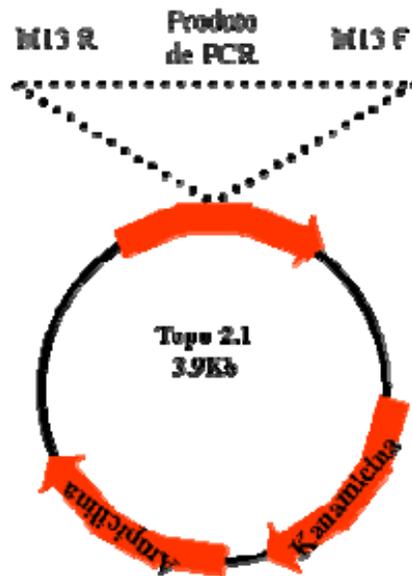
mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada um dos *primers*, 25 ng de DNA e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram feitas utilizando-se um termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT), programado para uma desnaturação inicial de 15 segundos, a 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C, por 15 segundos; anelamento a 60°C, por 15 segundos e extensão, a 72°C, por 15 segundos, seguidos de uma extensão final, a 72°C, por 4 minutos. O produto de amplificação foi separado por eletroforese, a 100 Volts, por 1 hora, em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (90 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0). O gel foi tratado com brometo de etídeo (0.5 μg/ml), visualizado sob luz ultravioleta e a imagem capturada e estocada em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene).

Confirmado o tamanho da banda, o resultado da PCR foi clonado no vetor TOPO 2.1 (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Após a confirmação da ligação por reação de PCR no vetor topo, foi realizada a reação de seqüenciamento utilizando os *primers* M13F e M13R, utilizando o ABI3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA) foi utilizado. As reações constaram de 3 μL (50-100 ng) do fragmento purificado, misturados a 2 μL de Big Dye V3.1 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 μL de tampão 5X e 1 μL de cada *primer* para cada reação. As reações de seqüenciamento foram submetidas a 96°C, por 20 segundos, a 50°C, por 15 segundos e a 60°C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes.

Foram adicionados, então, a cada amostra, 40 μL de isopropanol 75%(v/v) e procedeu-se a incubação das mesmas, por 30 minutos, no escuro. Centrifugou-se por 20 minutos, a 16.000 x g, foram descartados os sobrenadantes, adicionou-se 100 μL de etanol 70% aos precipitados. As amostras foram centrifugadas a 16.000 x g, por 20 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e as amostras secas à temperatura ambiente, no escuro. Os precipitados foram ressuspensos em 10 μL de formamida HiDi (Applied

Biosystems, Foster City, CA), desnaturados a 95°C, por 5 minutos e mantidos no gelo até a injeção no ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

O processo de montagem do cassete gênico, as transformações de *Escherichia coli*, bem como a extração dos plasmídeos, foram realizadas conforme descrito por Sambrook et al. (1989).



**FIGURA 4:** Vetor TOPO 2.1 (Invitrogen), utilizado para clonagem de produto de PCR. Onde: M13R e M13F, Sítios dos primers M13 forward e reverse utilizados para seqüenciamento; sítio de inserção do produto de PCR; Genes de resistência à antibióticos representados, kanamicina e Ampicilina.

### 3.1.3 Montagem do cassete RNAi

Depois de confirmada a presença da seqüência correta da região da Capa Protéica do SCMV no vetor TOPO 2.1 (Invitrogen), este foi clivado com as enzimas XhoI e KpnI. A reação foi submetida à eletroforese e a banda isolada do

gel utilizando Kit GENECLAN<sup>®</sup> (Q.BIOgene, Vista, EUA). Estas mesmas reações foram realizadas com pKANNIBAL (CSIRO Plant Industry, Australia), para abertura do plasmídeo (Figura 5B). Foi realizada a ligação da seqüência SCMV originando o pKANNIBAL recombinante.

Para a segunda clonagem, a seqüência SCMV foi inserida invertida no pKANNIBAL, para tanto o vetor TOPO 2.1 (Invitrogen) foi novamente clivado, agora com HindIII e XbaI, a reação de clivagem foi submetida à eletroforese e a banda isolada do gel utilizando Kit GENECLAN<sup>®</sup> (Q.BIOgene, Vista, EUA). O fragmento isolado do gel foi então ligado ao plasmídeo pKANNIBAL recombinante já clivado com as enzimas HindIII e XbaI (Figuras 5B e C).

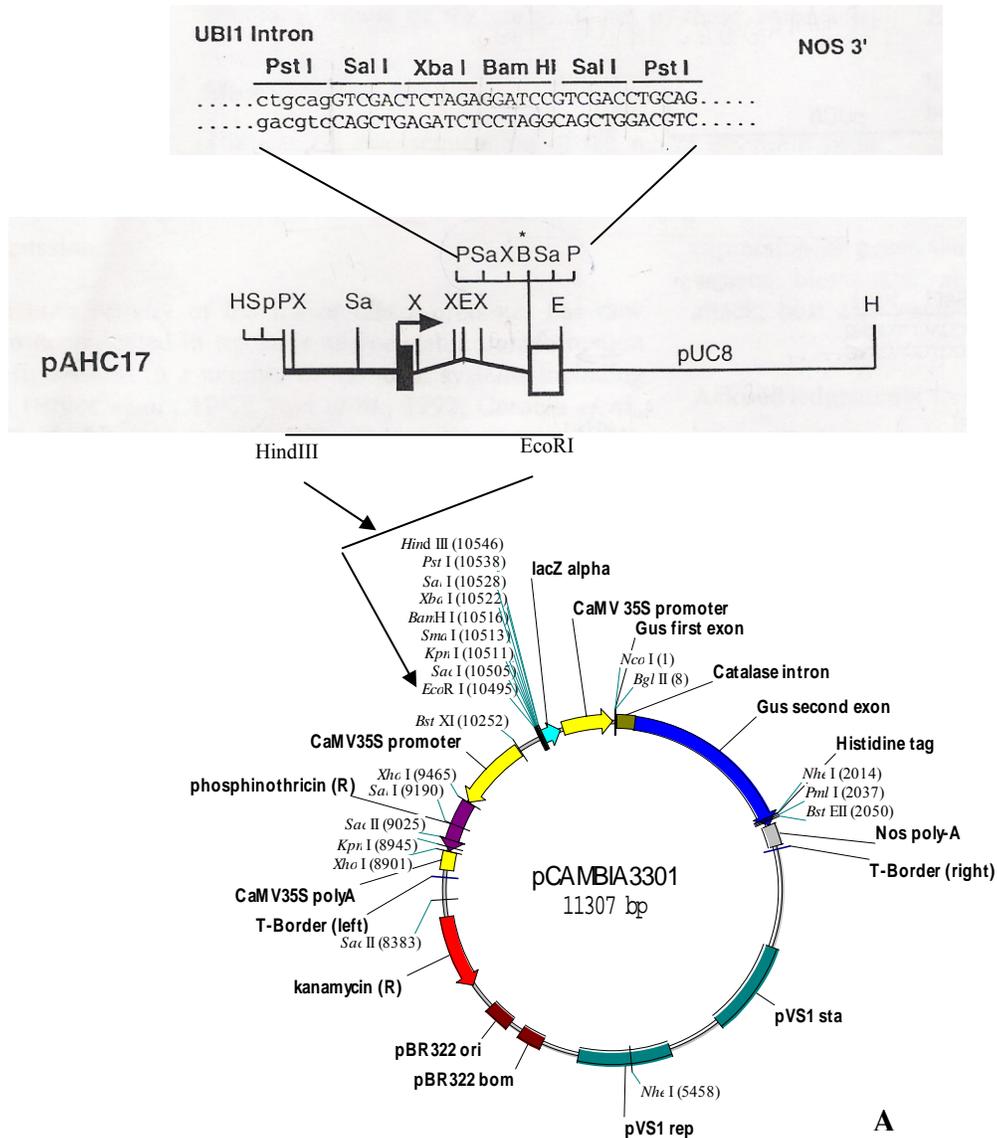
Após esta segunda clonagem obteve-se a construção do cassete RNAi que originaria o *grampo*.

O promotor constitutivo ubiquitina que direcionaria a expressão da construção e o terminador NOS foram transferidos do pAHC17 (Christensen & Quail, 1996) para o pCAMBIA 3301 (Cambia, Canberra, Austrália), utilizado para a transformação genética, por meio da clivagem do plasmídeo pAHC17 com HindIII e, parcialmente, com EcoRI, a reação de clivagem foi submetida à eletroforese e a banda isolada do gel utilizando Kit GENECLAN<sup>®</sup> (Q.BIOgene, Vista, EUA). O fragmento isolado do gel foi então ligado ao plasmídeo pCAMBIA 3301. Com a clivagem o pCAMBIA 3301 perdeu todo o polinker, contudo, foram adicionadas as enzimas PstI, Sall, XbaI, BamHI, Sall e PstI, conforme pode ser observado na Figura 5.

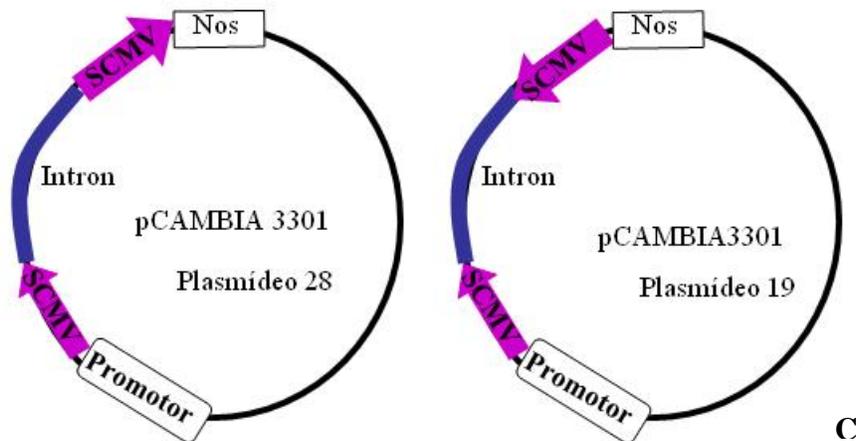
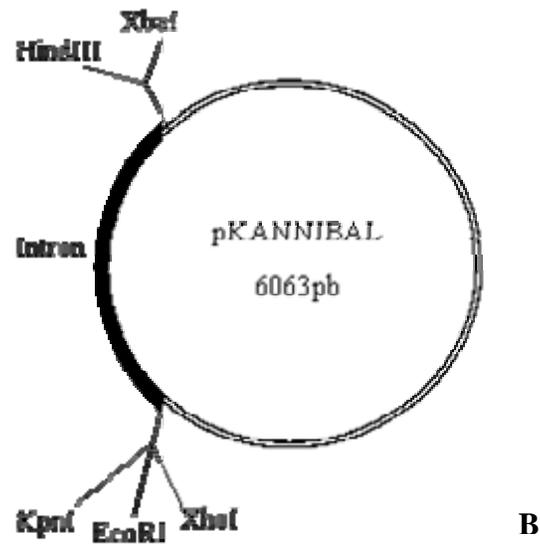
A seqüência RNAi foi então transferida para o plasmídeo pCAMBIA 3301 (Figura 5A). Para tanto, o plasmídeo pKANNIBAL contendo o cassete RNAi, assim como o pCAMBIA 3301 foram clivados utilizando a enzima BamHI. O produto da clivagem do pKANNIBAL foi submetida à eletroforese e a banda isolada do gel utilizando Kit GENECLAN<sup>®</sup> (Q.BIOgene, Vista, EUA). O fragmento isolado do gel foi então ligado ao pCAMBIA 3301 (Figura 5).

Em seguida foi realizado o seqüenciamento do plasmídeo pCAMBIA 3301, utilizando-se os *primers* M13F, M13R, UBI (UbiFinal 3'CGA GTT TAA GAT GGA TGG), íntron 1 (IntronKb1 – AGT GAT GTT AAT TAG TAT G) e íntron 2 (IntronKb2 – TCA TAC TAA TTA ACA TCA C), para a confirmação da posição inversa da seqüência SCMV.

*E. coli* transformadas com pCAMBIA 3301 recombinante foram crescidas em meio LB tendo como agente de seleção o antibiótico kanamicina. A representação esquemática do pCAMBIA 3301, utilizado para transformação, está demonstrado na Figura 5C.



**FIGURA 5:** Plasmídeos utilizados no processo de clonagem e montagem do cassete RNAi – SCMV. (A) pCAMBIA 3301, processo de clonagem do promotor ubiquitina e o terminador NOS do plasmídeo pAHc17 (Christensen & Quail, 1996) para o pCAMBIA 3301.



**FIGURA 5:** Plasmídeos utilizados no processo de clonagem e montagem do cassete RNAi – SCMV. (B) pKANNIBAL (CSIRO Plant Industry, Austrália), plasmídeo que contém o íntron pdk utilizado como formador do grupo, o processo de clonagem das seqüências inversas homólogas do SCMV foi realizado nas extremidades do íntron. (C) Representação esquemática do pCambia 3301 após receber as construções (19 e 28) montadas no pKANNIBAL .

### 3.2 Preparação do explante e cultura de tecidos

Embriões imaturos, com comprimento entre 1,0 e 1,5 mm (8 a 16 dias após polinização) foram colhidos de plantas produzidas nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo. As sementes utilizadas nestes experimentos foram da linhagem temperada HiII, com alta capacidade regenerativa em cultura de tecido e previamente testadas quanto a sensibilidade ao inoculo. Espigas foram esterilizadas, utilizando-se 50% de água sanitária comercial e 0,01% de Tween 20, durante 40 minutos, sendo, então, enxaguadas, por 3 vezes, com água destilada estéril. Embriões imaturos foram isolados e cultivados com o eixo embrionário em contato com o meio de cultivo (Figura 6). Estes embriões foram usados para iniciar culturas de calos embriogênicos.

Embriões imaturos da linhagem HiII foram cultivados em meio de indução de calos – CI [N6 sais e N6 vitaminas (Chu et al., 1975), 100 mg L<sup>-1</sup> mio-inositol, 2,87 g L<sup>-1</sup> prolina, 100 mg L<sup>-1</sup> caseína hidrolizada, 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, 2,5 g L<sup>-1</sup> phytigel, 1,7 mg L<sup>-1</sup> nitrato de prata, 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D]. O pH foi ajustado para 5,8, com hidróxido de sódio 1N, antes de o meio ser autoclavado. Nitrato de prata, esterilizado por filtração, foi adicionado após autoclavagem. Esses calos foram iniciados um mês antes do bombardeamento, com intervalos de 10 dias de subcultivo.



**FIGURA 6:** Plaqueamento de embriões imaturos em meio de cultivo. (A) As extremidades de uma espiga de milho, coletada, aproximadamente, 2 semanas após a polinização, são cortadas; (B) uma pinça é inserida na extremidade posterior da espiga para facilitar o manejo; (C) a espiga é despalhada; (D) etanol é utilizada para um enxágüe inicial; (E) espigas são imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial 50%, sob agitação constante; (F) a superfície do grão é cortada com bisturi, expondo o endosperma, e os embriões imaturos são coletados, em ambiente estéril, com o auxílio de uma espátula e plaqueados em meio de cultivo.

### **3.3 Bombardeamento de partículas**

Calos embriogênicos foram bombardeados com micropartículas de tungstênio utilizando um canhão gênico acelerado pelo gás hélio (Figura 7).

Para tal, um estoque de micropartículas de tungstênio foi preparado, ressuspensando-se 60 mg tungstênio M10 (Sylvania, GTE Chemicals/ Towanda – USA) em 1 ml de uma solução 50% glicerol estéril. DNA plasmidial, construção (UBI :: SCMV::íntron::VMCS:: NOS – RNAi ou UBI ::SCMV íntron::SCMV:: NOS) contendo o gene da capa protéica do vírus do mosaico da cana-de-açúcar, tecnologia do RNAi, foi precipitado sobre 50 µl da solução estoque de tungstênio. As partículas de tungstênio cobertas com DNA foram cuidadosamente

lavadas e ressuspendidas em 60 µl de etanol 100%. Seis microlitros foram depositados no centro dos macrocarreadores, discos (24 mm) de membranas Kapton (Du Pont). Essas membranas foram usadas no bombardeamento de calos embriogênicos de milho, utilizando-se 1100 psi de pressão de gás hélio, 1,6µg/tiro de DNA plasmidial e os explantes foram posicionadas a 6 cm da plataforma de lançamento das micropartículas. Foram mantidas constante a distância entre a câmara de gás de alta pressão e a membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA (8 mm), distância entre a membrana carreadora e a tela de retenção (12mm) e a pressão de vácuo (27 mm Hg).

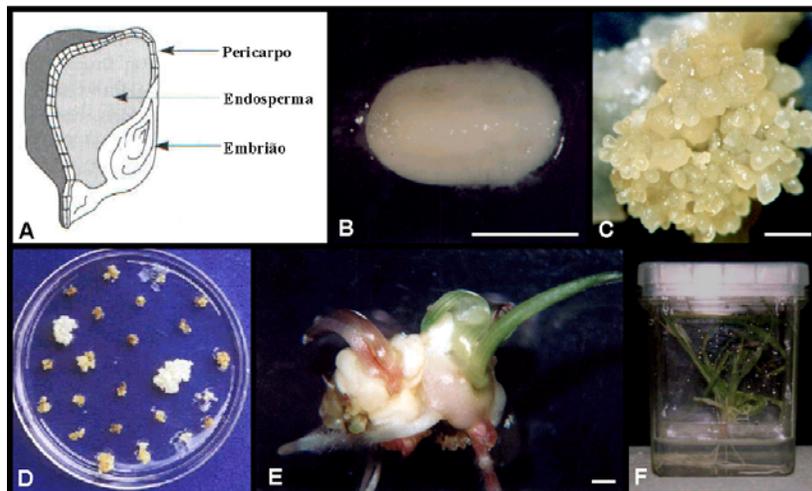
Antes do bombardeamento, os explantes foram colocados em meio osmótico com 12% sacarose (meio CI + 120 g.L<sup>-1</sup> sacarose), durante, aproximadamente, três horas.

Bombardeamentos foram realizados em placas de Petri 60 x 15 mm (Falcon 1007) contendo, 30 calos embriogênicos de, aproximadamente, 3 mm de diâmetro cada, arranjados dentro de um círculo de 35mm de diâmetro. Uma tela (100 mesh) de proteção foi colocada logo acima das placas, com os explantes, na hora do bombardeamento.

#### **3.4 Seleção dos explantes bombardeados e regeneração de plantas**

A seleção de plantas transgênicas foi iniciada 15 dias após bombardeamento, quando os calos de milho foram transferidos para meio SM suplementado com glufosinato de amônia, o composto ativo do herbicida Finale<sup>®</sup> (AgrEvo). Calos foram subcultivados a cada duas semanas em meio SM [N6 sais; N6 vitaminas (Chu et al., 1975), 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 100 mg L<sup>-1</sup> mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, 2,5 g L<sup>-1</sup> phytigel], suplementado com dosagens crescentes de glufosinato de amônia (3, 6 e 9 mg L<sup>-1</sup>).

Calos que se desenvolveram em meio seletivo foram transferidos para o meio RM [MS sais e vitaminas (Murashige & Skoog, 1962), 60 g L<sup>-1</sup> sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> mio-inositol, 0,2 mg L<sup>-1</sup> ANA, 3 g L<sup>-1</sup> phytigel, pH 5.8], acrescido de 6 mg L<sup>-1</sup> glufosinato de amônia. Para regeneração, calos embriogênicos foram transferidos para meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3 mg L<sup>-1</sup> glufosinato de amônia e cultivados a 26°C, em luz (16 horas). Plantas com, aproximadamente, 5 cm de altura foram transferidas para solo em casa de vegetação, onde completaram seu ciclo reprodutivo. O processo de formação de calos, seleção e regeneração de plantas transgênicas pode ser observado na Figura 8.



**FIGURA 8:** Formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas de milho em cultura de tecido. (A) Grão do milho; (B) embrião imaturo de milho com 2 mm; (C) embriões imaturos após 3 semanas em meio de cultura CI; (D) calos bombardeados crescendo em meio com agente seletivo fosfinotricina; (E) germinação de embriões transgênicos; (F) regeneração de plantas em frascos Magentas. Barra: 1 mm

### 3.5 Análises de plantas transgênicas RNAi

#### 3.5.1 Isolamento do DNA genômico

DNA genômico foi isolado de 38 plantas transformadas, utilizando-se o método de Saghai-Marooof et al. (1984). Três gramas de tecido fresco foram macerados em N<sub>2</sub> líquido em seguida, foram adicionados 10 mL tampão CTAB (Tris-HCl 1M pH 7,5, NaCl 5M, EDTA 0,5M pH 8,0, CTAB 2%, antes de usar adicionar 2% β-mercaptoetanol). A reação foi incubada, a 65°C, por 90 minutos e homogeneizada a cada 15 minutos. Em seguida, foram adicionados clorofórmio/octanol (24:1), misturou-se gentilmente por 10 minutos e centrifugou-se, a 10.000 rpm, por 10 minutos, removendo em seguida o sobrenadante para novo tubo. Para precipitação do DNA, adicionaram-se 6 mL de isopropanol à temperatura de -20°C e o DNA precipitado coletado com anzol de vidro. DNA foi transferido para 3 mL de TE pH 8,0 (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0).

#### 3.5.2 PCR: reação em cadeia da polimerase

A presença da construção gênica SCMV-RNAi nas plantas não inoculadas foi confirmada utilizando-se PCR com os *primers* SCMV3' X (AGC TCT AGA CTC GAG GGA TCC ACT AGT GCT GAG TTT ATT AAA C) X SCMV 5' (GCG GAT CCA AGC TTG GTA CCC TCA CCA TGC ATC CTT CC), gerando um fragmento de 499 pb. Cada 25 µl de reação continham tampão de PCR 10X, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos *primers*, 25 ng de DNA e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram feitas utilizando-se um termociclador, modelo 9600 (Perkin-Elmer).

Cetus, Norwalk, Connecticut, EUA), programado para uma desnaturação inicial de 10 segundos, a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 10 segundos, 60°C por 10 segundos e 72°C por 10 segundos, seguido de uma extensão final, a 72°C por 4 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese a 100 volts, por 3 horas, em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TAE (90 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0). Os géis foram tratados com brometo de etídeo (0.5 µg/ml), visualizados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas e estocadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene). A seqüência amplificada e os *primers* utilizados estão ilustrados na Figura 9.

SCMV 5'

ACAGGAAGTGGAGCAACTGGAGGTCAGGCAGGAACTGGTGGTGGCACCCGGACGAACAGGCACGGGC  
 TCAGTAGGGACTGGTGCAACAGGAGGCCAAAAAGACAAGGATGTAGATGCTGGTACGACAGGCACA  
 ATTACAGTGCCAAAACCTTAAAGCCATGTCTGAAGAAGATGCGCTTGCCAAAAGCAAAGGAAAAGAT  
 GTTTGTCATCTGGACTTTCTGTAAACATACAAAACCGCAGCAACAAGACATATCAAAACACAAGAGCA  
 ACCAGAGAGGAGTTTGATAGGTGGTATGAAGCCATAAAGAAGGAATATGAAATAGATGACACACAA  
 ATGACAGTCGTCATGAGCGGTCTAATGGTATGGTGTATTGAGAATGGTTGCTCACCAAACATAAAC  
 GGAAGTTGGACAATGATGGATGGAGATGAACAAGAGTCTTCCCATTTAAACCAGTTATTGAAAAC  
 GCATCCCCAACGTTCCGGCAAATAATGCATCATTTTAGTGATGCAGCTGAAGCGTACATAGAATAT  
 AGAAATTCTACTGAGCGTTACATGCCAAGGTACGGACTTCAAGCGCAATCTCACCGACTATAGCTTA  
 GCACGGTATGCATTTGATTTCTACGAGATGAACTCACGCACACCTGCTAGAGCTAAAGAAGCCAC  
 ATGCAGATGAAAGCCGCAGCAGTTTCGTGGTTCAAACACAC

3' SCMV

**FIGURA 9:** Seqüência da capa protéica do vírus do mosaico da cana-de-açúcar, a localização dos *primers* utilizados para a amplificação da seqüência por PCR.

### 3.5.2.1 RT-PCR

#### 3.5.2.1.1 Obtenção do RNA total

Para a extração do RNA total, 0,5 gramas de tecido foliar foram triturados com nitrogênio líquido e processados pelo método do Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), de acordo com especificações do fabricante. O produto da extração foi dissolvido em 60 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC.

A quantificação do RNA foi feita utilizando-se espectrofotômetro (NaNoDrop<sup>®</sup> ND-1000/Spectrofotometer - Wilmington, DE, EUA) em um comprimento de onda de 260-280nm. Para verificar a qualidade do RNA Uma alíquota de 1µg/µL do RNA total foi submetida a eletroforese em gel de TAE 2% a 200 volts, durante 12 minutos, com brometo de etídio (1 µL em 20 ml de gel). O gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado no equipamento Eagle Eye II, (Stratagene - La Jolla, CA).

#### **3.5.2.1.2 RT-PCR: Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase**

Um volume de 2 µL do RNA total foi tratado com 1 µL (10U/mL) de DNase I (Amershan – Sunnyvale, EUA), a 37°C, por 30 minutos. A DNase foi então inativada, a 65°C, por 10 minutos. Na reação de transcrição reversa para a obtenção do cDNA, 6 µL água DEPC, 0,5 µg Oligo DT (Invitrogen), 0,5 µg do *primer 2.2.0* (específico somente para o SCMV – GCG GAT CCA AGC TTG GTA CCC TCA CCA TGC ATC CTT CC, construído a partir de seqüência diferente da usada na transformação das plantas), 2,0 µg RNA total e 3,33 mM dNTPs foram incubados, a 65°C, por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados a esta reação 5µL tampão 5X First-Strand (Invitrogen), 0,1M DTT (Invitrogen) e 40U RNase Out (Gibco - Carlsbad, CA, EUA). A reação foi então pré-incubada, por 2 minutos, a 42°C, a enzima Super Script II 200U (Invitrogen) foi adicionada e a reação foi incubada por mais 1 hora a 42°C. PCRs foram então realizadas a partir do cDNA produzido, amplificando fragmentos referentes à seqüência específica do vírus, íntron e como controle uma referente ao gene da actina. Para cada reação de PCR de 25 µL foram utilizados: 2,5 µL tampão de PCR 10 X, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos *primers*, cDNA e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen).

As reações foram feitas utilizando-se um termociclador, modelo 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT), programado para uma desnaturação inicial de 15 segundos, a 94°C, seguida de 42 ciclos de desnaturação, a 94°C, por 30 segundos, anelamento 55°C, por 30 segundos e extensão a 72°C, por 30 segundos, seguido de uma extensão final, a 72°C, por 4 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese, a 100 Volts por 1 hora, em gel de agarose 2%, utilizando-se tampão TAE (90mM tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8,0). Os géis foram tratados com brometo de etídeo (0.5 µg/mL), visualizados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas e estocadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene).

### **3.6 ELISA-DAS**

O teste ELISA foi realizado conforme indicações do fabricante (Agdia® - Elkhart, Indiana - USA). Como controle positivo, foi utilizado um controle liofilizado, de folhas contaminadas com SCMV, preparado conforme instruções do fabricante (Agdia® - Elkhart, Indiana, USA).

O teste foi realizado com as plantas transgênicas produzidas e controle negativo, somado ao controle positivo do kit. Para tanto, foi realizada a extração das amostras na concentração de 400 mg/ml de peso fresco foliar por extrator. Desta extração foram feitas três diluições: 200 mg/ml (amostra concentrada), 100 mg/ml (concentração recomendada no Kit) e 50 mg/ml (amostra diluída). A análise foi realizada em amostras coletadas 0, 7, 15 e 30 dias após a inoculação da inoculação do vírus (SCMV) nas mesmas. Foram utilizadas duas amostras de milho transgênicos, uma do controle negativo, milho não transgênico.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELISA Titertek Multiskan Plus (Labsystems, NewYork, EUA), específico para leitura de placas

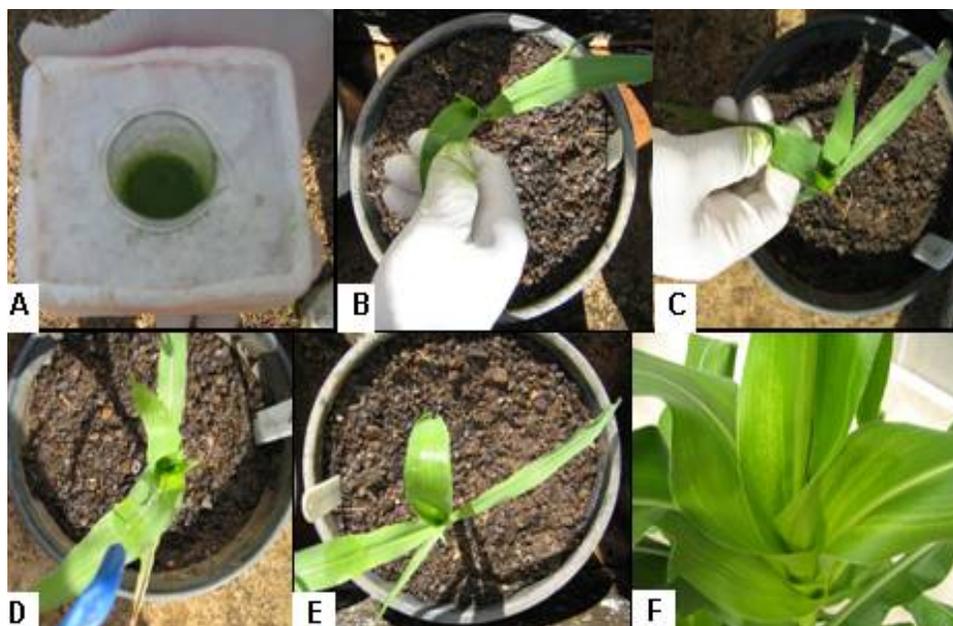
de Elisa em comprimentos de ondas de 405 nm, nos tempo de 15, 30, 60 e 120 minutos e 16 horas.

### **3.7 Contaminação das plantas e análises fenotípicas**

O inóculo utilizado no experimento foi obtido de plântulas cultivadas em canteiro e previamente infectadas com o complexo viral do mosaico comum, proveniente de diferentes plantas e campos de cultivo. O inóculo foi preparado pela maceração de folhas de plantas de milho, com sintomas de mosaico comum, em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4 na proporção de 1:5 (peso/volume). Todas as plantas do experimento foram inoculadas por meio da fricção do inóculo em plântulas no estágio de duas a três folhas, após pulverização com carborundo 600 mesh (Bioglobal, Wacol, Austrália) e, em seguida, lavadas com água (Almeida et al., 2000). Foram realizadas três infecções em cada planta.

Foram infectadas plantas transgênicas (T1) e controle negativo (planta não transgênica) previamente crescidas em casa de vegetação, 15 dias após o plantio, isoladas de qualquer tipo de insetos e outras plantas. O experimento com plantas T1 foi realizado duas vezes, para a confirmação dos resultados obtidos. Foram plantadas três sementes de cada planta, sendo analisada cada planta individualmente no tratamento (cada transgene - evento - doador das sementes foi considerado um tratamento).

As plantas foram avaliadas fenotipicamente, para presença ou ausência de sintomas de mosaico, após 15 e 30 dias da inoculação (Schuelter et al., 2003).



**FIGURA 10:** Processo de inoculação do mosaico. (A) Extrato elaborado a partir de planta contaminada; (B e C) contaminação por atrito em folhas de plântulas de milho; (D) lavagem do extrato; (E) plântula após a contaminação; (F) planta crescida, já apresentando sintomas da virose, 30 dias após a inoculação.

### **3.8 Microscopia eletrônica**

Folhas de plantas transgênicas e não transgênica apresentando sintomas típicos do mosaico foram examinadas ao microscópio eletrônico JEOL 100 C para observação das partículas virais. Folhas foram maceradas em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,3. Telinhas de cobre de 300 mesh, previamente recobertas por filme de Formvar e carbono, foram colocadas em contato com o extrato das folhas, por dois minutos e posteriormente lavadas com água destilada e contrastadas com solução de aquosa de acetato de uranila 3%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Construções gênicas

#### 4.1.1 Escolha da seqüência RNAi

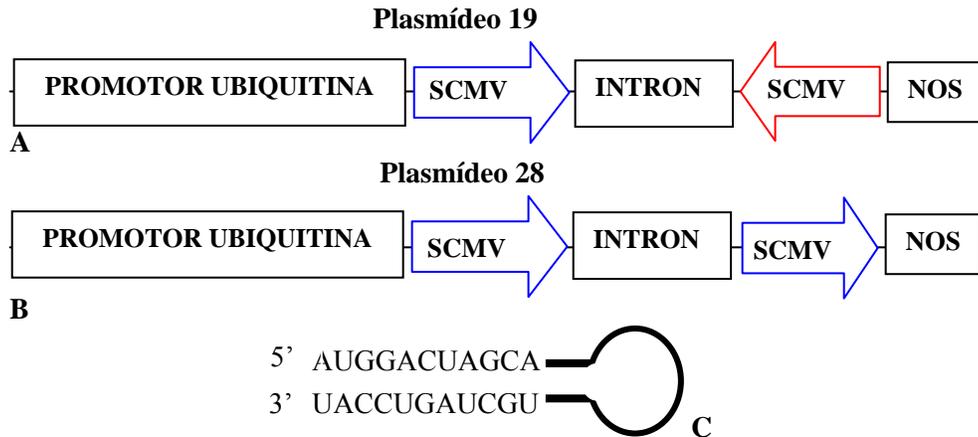
A seqüência utilizada, na construção gênica para a transformação das plantas de milho, foi escolhida baseada na tecnologia do RNAi e selecionada por meio do software MFold 3.2, com base na energia livre,  $\Delta G$ . Este software prediz um mínimo de  $\Delta G$  necessário para que ocorra o pareamento das bases, assim como a  $\Delta G$  que existe entre as bases. Este cálculo gera uma plataforma de dados entre o número de dados que se quer combinar na seqüência somados ao  $\Delta G$  do anelamento das bases para a formação do grampo (Zuker, 2003). As análises da seqüência da capa protéica do clone do vírus do mosaico (SCMV) #BR06 indicaram uma seqüência de 499 pares de bases, descritas na Figura 9, da qual foram elaborados *primers* para a montagem do cassete.

#### 4.1.2 Montagem do cassete RNAi

Após a escolha da seqüência, esta foi amplificada por meio de reação de PCR, utilizando-se os *primers* específicos SCMV 5' X SCMV 3', originando seqüência de 499 pb, descrita na Figura 9.

Foram, então, montadas duas seqüências duplo recombinantes, das quais uma originou um grampo pela complementaridade das seqüências homólogas separadas pelo íntron (chamada plasmídeo 19) e outra na qual as seqüências eram homólogas, mas não complementares (chamado plasmídeo 28), demonstradas na figura abaixo. Em ambos os cassetes, o íntron originou-se do plasmídeo pKANNIBAL. A esta seqüência foram adicionados o promotor constitutivo

ubiquitina e o terminador NOS, no pCAMBIA 3301, que direcionariam a expressão dos genes homólogos formando o grampo, conforme esquema abaixo.



**FIGURA 11:** Construções gênicas do RNAi do vírus SCMV. Sequências invertidas do SCMV do plasmídeo 19 (A) e sequências na mesma direção do plasmídeo 28 (B). O plasmídeo 28 tem sido usado como controle negativo, já que, teoricamente, de acordo com essa construção, não é possível formar a complementaridade de bases (e, conseqüentemente, a dupla fita de RNA). (C) Representação esquemática do grampo pela presença das sequências invertidas separadas pelo íntron no plasmídeo 19.

Estas construções foram sequenciadas para confirmar a direção da as clonagens do fragmento SCMV.

O uso de vetores, como pHANNIBAL (com resistência a ampicilina) e pKANNIBAL (com resistência a kanamicina), é bastante empregado para a montagem do grampo do RNAi (Helliwell & Waterhouse, 2003). A presença do íntron-RNA (ihpRNA – *intron hairping*-RNA) nestes vetores, facilita a produção das construções ihpRNA. Além disso, construções do tipo ihpRNA apresentam até 100% de silenciamento em plantas transgênicas, apesar de essas plantas poderem apresentar diferentes graus de silenciamento (Helliwell & Waterhouse, 2003).

## **4.2 Preparação do explante e cultura de tecidos**

### **4.2.1 Bombardeamento de partículas, seleção dos explantes bombardeados e regeneração de plantas**

Após o bombardeamento, os calos embriogênicos foram imediatamente transferidos para meio CI sem seleção, onde permaneceram por uma semana. Após este período, iniciou-se a seleção das células que receberam o transgene. Os calos bombardeados foram transferidos para o meio de seleção SM suplementado com 3 mg.L<sup>-1</sup> PPT (glufosinato de amônia). Neste meio, observou-se uma diminuição no crescimento dos calos em geral. Depois de 15 dias, todos os calos foram subcultivados em meio MS suplementado com 6 mg.L<sup>-1</sup> PPT. Nesta etapa de seleção, cerca de 80% dos calos apresentaram início de necrose e parada no crescimento. Calos que continuaram a crescer, após duas semanas de cultivo em meio suplementado com 6 mg.L<sup>-1</sup> PPT, foram subcultivados em meio SM suplementado com 9 mg.L<sup>-1</sup> PPT.

Nesta fase, os calos possivelmente transformados, que receberam o transgene e integraram o genoma, cresceram normalmente. Calos capazes de crescer neste meio foram transferidos para o meio de maturação RM suplementado com 6 mg L<sup>-1</sup> PPT e mantidos em regime de luz, por 16 horas, por um período que variou de 10 a 15 dias, de acordo com a maturação dos calos.

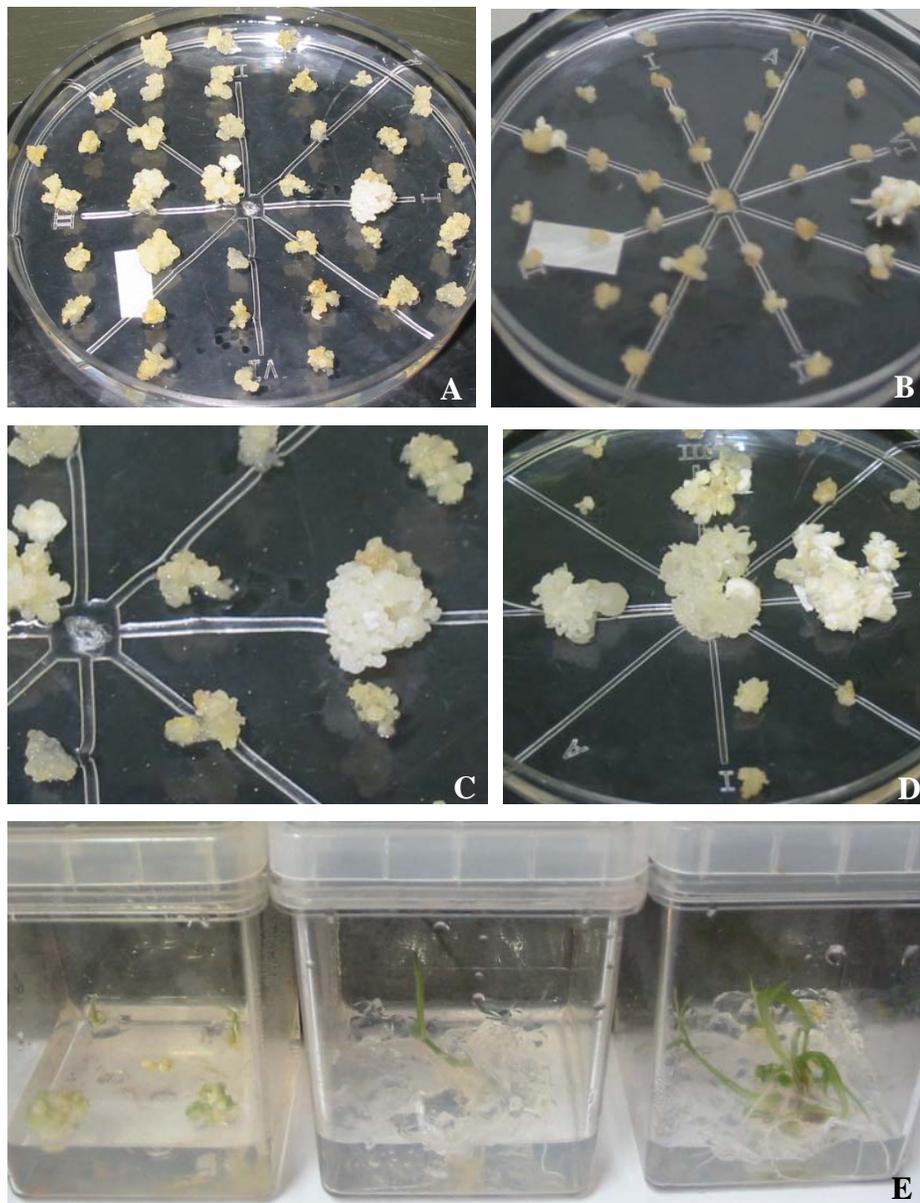
Calos maduros, com aparência branco opaca, foram transferidos para o meio de regeneração MS suplementado com 3 mg L<sup>-1</sup> PPT, no qual permaneceram até o desenvolvimento das plântulas de milho, por, aproximadamente, duas semanas.

A eficiência de transformação para o plasmídeo 19 (RNAi) foi de 16,4% (242 plantas/1.475 calos bombardeados). Do total de 59 placas bombardeadas (1475 calos), em 25 diferentes experimentos, regenerou-se sob seleção 242

plantas. Estas plantas foram transferidas para casa de vegetação, pulverizadas com 1% do herbicida Finale, apesar de todas as plantas serem tolerantes ao herbicida apenas 82 plantas produziram sementes, eficiência de 33,9%.

Já para a construção com o plasmídeo 28, em que não há a formação do grampo, a frequência de transformação foi de apenas 2%. De um total de 16 placas bombardeadas (400 calos), obtiveram-se 8 plantas possivelmente transgênicas e, apenas uma planta produziu sementes, uma frequência de 12,5%.

Dados publicados por Zhao et al. (1998, 2002) demonstraram elevada taxa de transformação genética de milho HiII, desenvolvido com *Agrobacterium tumefaciens*. Estes autores descrevem frequência de transformação em condições otimizadas, utilizando embriões imaturos, em 40%, em alguns dos experimentos realizados. Em pesquisas de transformação agrobactéria em embriões previamente bombardeados de A188, linhagem também temperada, formadora de calos do tipo friável, semelhantes ao HiII, Assem & Hassan (2008) observaram um frequência de transformação em torno de 4%, concordando com Frame et al. (2002). Já a frequência de transformação, observada em embriões de HiII, transformada por Frame et al. (2002) foi, em média, de 5%. Transformando A188 Coelho (2005) alcançou uma frequência de transformação via biobalística de 4,86%, empregando os mesmos parâmetros de transformação e cultura de tecidos utilizados neste trabalho, dados similares aos encontrados por Frame et al. (2002) e Assem & Hassan (2008). Esses dados demonstram que frequência de transformação em linhagens temperadas, que formam calos do tipo friável, pode variar em até 10 vezes, variando entre 4% e 40%.

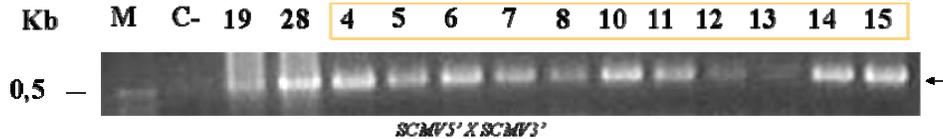


**FIGURA 12:** Processo de seleção de calos embriogênicos de milho transformados. A e C: calos em seleção cultivados em meio suplementado com 9PPT; B e D: calos em fase de maturação cultivados em meio RM suplementado com 6PPT; E: regeneração de plântulas de milho transgênicas em meio suplementado com 3PPT. Da esquerda para a direita observam-se estágio inicial da regeneração, início de formação da plântula e plântula já em fase de transferência para casa de vegetação.

### 4.3 Análises moleculares de plantas transgênicas RNAi

#### 4.3.1 Análises por PCR

Para comprovar a transgenia das plantas selecionadas, utilizaram-se análises de PCR. Inicialmente, foram realizadas reações de PCRs, utilizando-se *primers* SCMV5' X SCMV3', que amplificam uma região com 499pb da capa protéica do vírus, conforme descrito na metodologia. Estas análises mostraram a presença da construção gênica em todas as plantas analisadas.



**FIGURA 13:** PCR das plantas supostamente transgênicas, não inoculadas com SCMV, utilizando *primers* do fragmento SCMV (seta à direita da figura). Marcador molecular 1 kb (M); controle negativo - planta não transgênica (C-); Plasmídeos 19 e 28 (19 e 28). Plantas de milho provenientes da cultura de tecido e seleção em PPT (herbicida) supostamente transgênicas (4 a 15).

Autores como Delporte et al. (2001), O'Connor-Sánchez et al. (2002), Przetakiewicz et al. (2004), Carneiro et al. (2004) e Xu et al. (2005) também utilizaram reações de PCR para uma seleção inicial das plantas transgênicas produzidas em diferentes experimentos. Apesar disso, análises de PCR são criticadas quando utilizadas como prova final de transgênia porque, esta técnica, pode gerar falsos positivos. Quantidades mínimas de DNA contaminante, contendo o gene analisado, podem ser amplificadas (Romano, 1998). Apesar disso, a presença do controle negativo, planta não transgênica, demonstra a ausência de contaminação da PCR conforme figura 13. Para validar estes resultados, bem como demonstrar a resistência das plantas transgênicas

produzidas contra o mosaico, análises de Elisa-DAS e RT-PCR também foram realizadas.

#### **4.3.2 RT-PCR: Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase**

Para validar os resultados observados da expressão de RNAi nas plantas transgênicas de milho, foram realizadas análises de RT-PCR. Neste experimento, o material analisado é o RNA. Após a extração do RNA, é produzida uma fita de DNA por meio da transcriptase reversa, originando cDNA ou DNA complementar. Como primer para a produção do cDNA viral, foi utilizado primer baseado em uma seqüência específica da região do vírus não correspondente à utilizada na construção RNAi. A partir desta fita simples de DNA, foram realizadas PCRs com *primers* específicos para a amplificação de 487 pb da HC-pro seqüência do DNA viral não presentes na construção; para o íntron, parte da construção que dará origem ao grampo e para a actina, gene do milho, como controle, comprovando, assim, a expressão do transgene nas plantas.

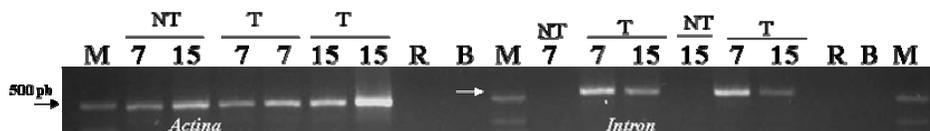
Os resultados apresentados na Figura 14, demonstram a presença do vírus, tanto nas plantas transgênicas quanto na controle (planta não transgênica), 30 dias após de contaminação, aos 15 e aos 7 dias após a contaminação é observada a presença do vírus na planta controle, no entanto nestas datas a presença do vírus é observada apenas em uma das plantas transgênicas. É importante destacar que as amostras E, H e K são referentes a planta 66 em diferentes datas de contaminação e que no caso desta planta o vírus aparece em 7 dias após a contaminação e desaparece aos 15 dias após a contaminação voltando a aparecer aos 30 dias após a contaminação, demonstrando a eficiência das contaminações realizadas. Já a amostras D, G e J são referentes à planta 87 e demonstram um comportamento semelhante, não estando contaminadas 7 dias

após a contaminação. Estes dados demonstram a presença do vírus nas plantas transgênicas apesar destas se apresentarem assintomáticas.

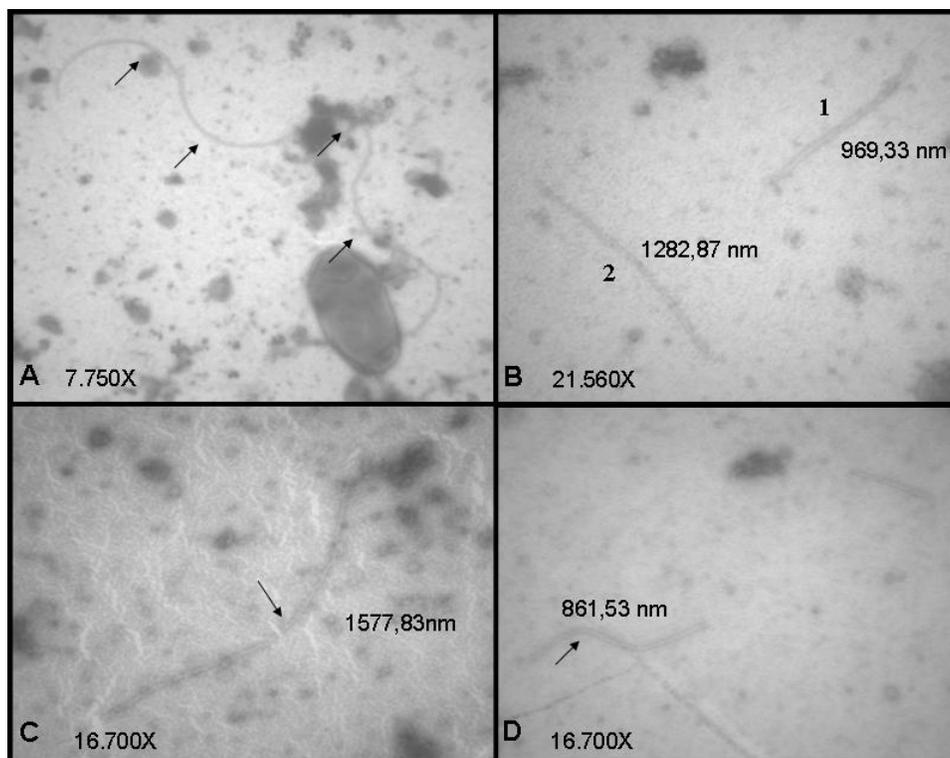


**FIGURA 14:** RT-PCR das plantas transgênicas utilizando *primers* do SCMV – região da Hc-Pro (seta à direita da figura); tamanho esperado da banda, 487pb. Seqüência não presente na construção RNAi. Marcador molecular (M); PCR do RNA total controle negativo e branco da reação (B e C); plantas transgênicas com 30, 15 e 7 dias de inoculação, respectivamente (D, E; G, H e J, K). Plantas não transgênicas com 30, 15 e 7 dias de inoculação, respectivamente (F, I e L).

Na Figura 15 observa-se a presença do íntron presente na construção RNAi apenas nas plantas transgênicas. Apesar de as plantas transgênicas não apresentarem sintomas de contaminação, a presença do vírus foi confirmada pela RT-PCR e pela microscopia eletrônica de varredura, que demonstrou e confirmou a presença do SCMV nas plantas analisadas através das características morfológicas, que acordam com o descrito por Almeida (1998) e Shukla et al. (1994) conforme figura 16.



**FIGURA 15:** RT-PCR das plantas transgênicas utilizando *primers* do actina e íntron, (seta à direita da figura); tamanho esperado da banda 500 pb e 600 pb, respectivamente. Actina, gene constitutivo; íntron, fragmento da construção presente apenas nos transgenes. Marcador molecular (M); PCR do RNA total controle negativo e branco da reação (R e B); plantas transgênicas com 7 e 15 dias de inoculação, respectivamente (T). Plantas não transgênicas com 7 e 15 dias de inoculação, respectivamente (NT).



**FIGURA 16:** Fotomicroscopia Eletrônica de plantas contaminada com vírus do mosaico. Micrografia eletrônica da preparação de folhas de milho apresentando sintomas típicos do mosaico. As setas mostram partículas alongadas e com flexuosas. Amostras A e B plantas não transgênicas. Amostras C e D plantas transgênicas infectadas sem sintomas do mosaico. Fotomicroscopia eletrônica com aumento de: (A) 7.750X; (B) 21.560; sendo que as partículas virais 1 e 2 medem 969,33 e 1282,87 nm, respectivamente; (C) 16.700X; (D) 16.700 sendo que as partículas virais C e D medem 1577,83 e 861,53 nm, respectivamente .

Os resultados descritos acima eram esperados, já que as plantas transgênicas analisadas continham o cassete RNAi, e construções RNAi podem conferir resistência, pelo silenciamento do vírus de até 100% (Helliwell & Waterhouse, 2003). As plantas transgênicas analisadas apresentaram-se assintomáticas mesmo tendo sido realizadas quatro inoculações em semanas consecutivas, onde a primeira inoculação ocorreu na semana 0 e a última, 21

dias após a primeira contaminação, o que comprova a resistência conferida pelo silenciamento gerado pelo RNAi.

Segundo Schuelter et al. (2003), as avaliações em experimentos com inoculação de potivirus em milho devem ser realizadas aos 15 e aos 30 dias, para permitir a expressão de sintomas em plantas susceptíveis. Estes autores ainda ressaltam que, em seu trabalho, a comparação dos resultados das avaliações realizadas nas duas épocas (15 e 30 dias) permitiu a identificação de plantas susceptíveis que haviam sido classificadas como resistentes aos 15 dias, demonstrando, assim, a importância desta avaliação. Estes dados demonstram que os sintomas do mosaico começam a ser observados 15 dias após a inoculação das plantas, o que justifica a expressão dos genes virais na planta apenas com 15 e 30 dias após o inóculo.

#### 4.4 ELISA-DAS

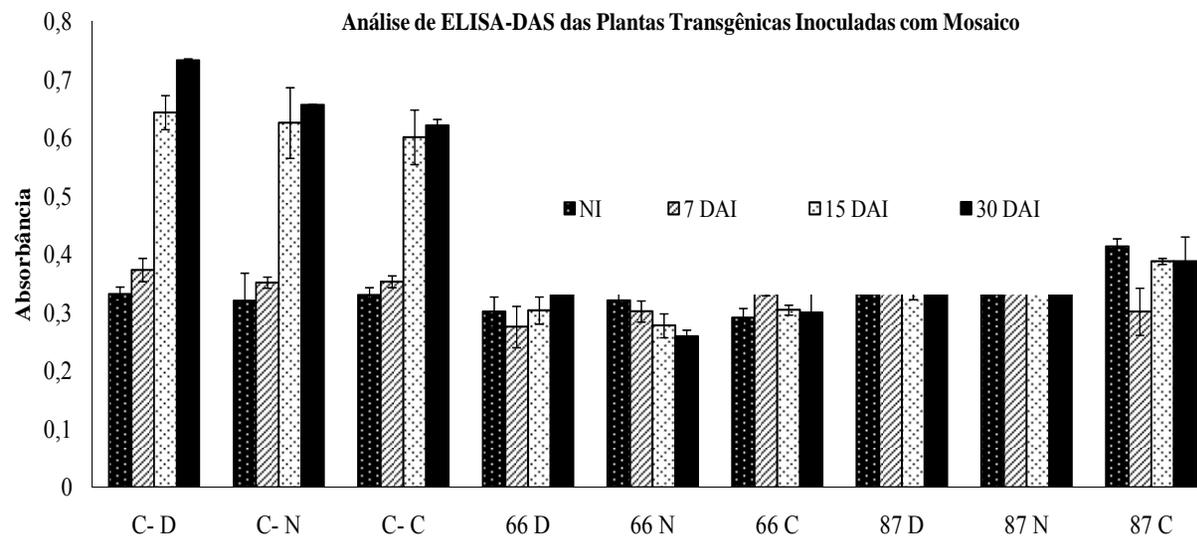
DAS-ELISA foi usado para detectar a possível presença do vírus do mosaico em plantas transgênicas de milho, aos 0, 7, 15 e 30 dias após a infecção. Foram realizadas leituras nas amostras diluídas e concentradas, para eliminar falsos positivos e negativos. Foram consideradas negativas as amostras que apresentaram a absorbância igual à leitura do controle negativo utilizando plantas saudas, não inoculadas (Nascimento et al., 2005).

Apenas as reações das plantas não transgênicas apresentaram aumento na absorbância 15 e 30 dias após a inoculação do vírus, datas previstas para o aparecimento dos sintomas (Schuelter et al., 2003).

Os resultados negativos para plantas transgênicas eram esperados, uma vez que o mecanismo do RNAi age degradando todo o RNA viral presente na planta infectada, não permitindo a infecção da planta pelo vírus e o desenvolvimento da doença. Resultados semelhantes foram encontrados por Nascimento et al. (2005), cujos testes sorológicos foram negativos, indicando que a resistência foi mediada pela RNA viral e caracterizada pela ausência de detecção da proteína codificada pelo transgene em questão. A ausência da detecção sorológica é uma indicação de que o transgene não foi traduzido (Nascimento et al., 2005) e que o vírus não conseguiu utilizar a maquinaria da planta para multiplicar seu material genético e traduzir suas proteínas, indicando que a resistência nas plantas transformadas foi mediada pelo RNAi, uma vez que o ELISA-DAS apresentou resultados positivos para a planta não transgênica.

Neilson & Sharp (2008) relatam que a infecção de uma planta transgênica com vírus resulta na redução do estado de equilíbrio dos níveis virais e do RNA das plantas transgênicas, apesar de a transcrição a partir do transgene permanecer inalterada, indicando a presença do mecanismo de silenciamento pós-

transcricional de RNAi. O silenciamento por RNAi vem se mostrando muito eficaz em plantas transgênicas. Lu et al. (2004) conseguiram 80% de silenciamento do gene repórter GUS e relataram uma presença abundante presença de sRNAs.



**FIGURA 17:** Análise de ELISA-DAS das Plantas Transgênicas Inoculadas com o Mosaico. (C-) Controle negativo, planta não transgênica; (66 e 87) Plantas transgênicas. Amostra: (D) diluída (50 mg/ml); (N) normal - concentração recomendada pelo kit (Agdia® - Elkhart, Indiana, USA). (100mg/ml) e (C) concentrada (200mg/ml), respectivamente. (NI) Plantas não inoculadas com o mosaico; (DAI) Dias após a inoculação com o mosaico.

#### **4.5 Inoculação das plantas com SCMV e análises fenotípicas das plantas RNAi**

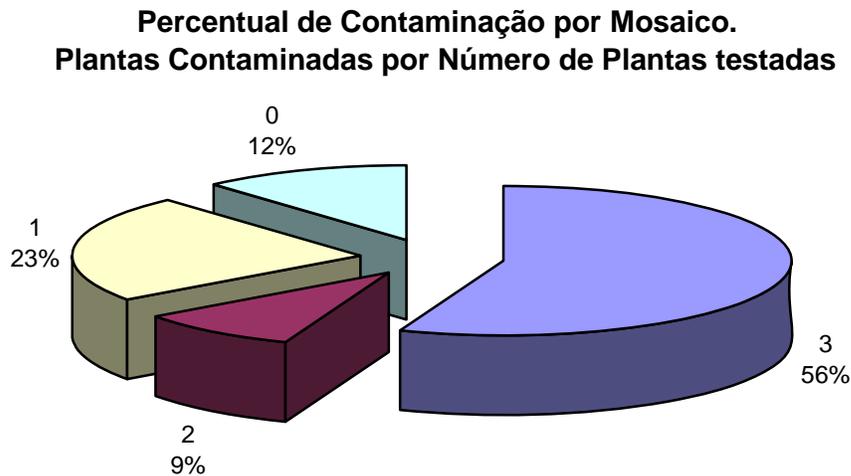
De um total de 135 eventos T1 testados, oriundos de 45 plantas T0, 33 foram assintomáticas. Além disso, foi observada também uma diminuição dos sintomas nas 3 plantas testadas do evento 63 no decorrer das semanas após a primeira infecção. Estudos demonstram que, em relação às análises fenotípicas, realizadas em plantas T1, para transgenes hpRNA, o gene inserido funciona como dominante, podendo portanto, ser realizado o rastreamento através do fenótipo em plantas T0 ou T1, sem a necessidade da produção de linhagens homozigotos (Helliwell e Waterhouse, 2003).

Os resultados obtidos demonstram que a técnica do RNAi é funcional, sendo possível afirmar que plantas de milho transgênicas contendo o cassete correto em relação à formação do grampo (plasmídeo 19) apresentam resistência à contaminação pelo vírus do mosaico.

Estudos demonstram que, em relação às análises fenotípicas, realizadas em plantas T1, para transgenes hpRNA, o gene inserido funciona como dominante, podendo portanto, ser realizado o rastreamento através do fenótipo em plantas T0 ou T1, sem a necessidade da produção de linhagens homozigotos (Helliwell e Waterhouse, 2003).

O gráfico da Figura 18 demonstra o percentual de contaminação por mosaico em relação aos três eventos (T1) testados, oriundo das sementes de cada planta T0. Pelo mesmo gráfico pode-se observar um total de 12% de plantas transgênicas não apresentaram contaminação em nenhum dos 3 eventos testados; 23% apresentaram sintomas do mosaico em apenas um dos eventos testados e 9% apresentaram sintomas em dois eventos testados, onde um dos eventos se

manteve sadia. No total, 44% das plantas T0 apresentaram os três eventos T1 testados resistentes ao mosaico.



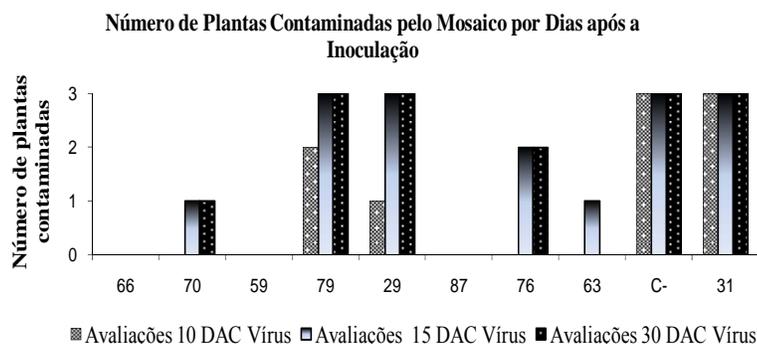
**FIGURA 18:** Total de eventos T1 testados: 135, sementes oriundas de 43 plantas T0, sendo 3 eventos de cada planta T0 (129 plantas), 3 amostras C-, controle negativo e 3 eventos do plasmídeo 28 em um total de 135 plantas testadas. Das 43 plantas doadoras de sementes T0, 24 apresentaram contaminação nos 3 eventos testados (72 plantas), 4 apresentaram em 2 dos 3 eventos testados (8 plantas), 10 apresentaram sintomas em apenas 1 dos 3 eventos testados (10 plantas) e 5 não apresentaram sintomas do mosaico em nenhum dos 3 eventos testados.

As datas de observação dos sintomas variaram entre 0 e 30 dias. Os sintomas do mosaico só podem ser observados 15 dias após a inoculação, sendo necessária a confirmação destes dados aos 30 dias após a inoculação (Schuelter et al., 2003), evitando-se, assim, falsos positivos ou negativos, uma vez que, em alguns casos, nas plantas transgênicas, foi observada perda dos sintomas. A perda de sintomas pode ser justificada pela recuperação do fenótipo devido ao RNAi, já descrita por Carrington et al. (2001), em que uma planta infectada pode apresentar os sintomas por um determinado tempo de resposta e, quando esta

resposta se torna efetiva, a perda desses sintomas é expressa fenotipicamente e há a restauração do estado de saúde da planta.

Pode-se observar, no gráfico da Figuras 19 que, em testes realizados com 8 transgenes, a resistência total, ou a não contaminação em 3 três eventos transgênicos (66, 59 e 87). O aparecimento de sintomas com posterior recuperação do fenótipo (Carrington et al., 2001) sadio foi observado na planta transgênica 63, num período de 5 dias, não tendo sido observados sintomas do mosaico 15 dias após a inoculação e o desaparecimento dos mesmos aos 30 dias após a inoculação. A confirmação de dados aos 30 dias após a inoculação, é recomendada conforme descrito por Schuelter et al. (2003).

As plantas transgênicas 70 e 76 apresentaram contaminação, após os 15 dias de inoculação, em 1 e 2 das 3 plantas testadas, respectivamente. Já as plantas 79 e 29 mostraram susceptibilidade ao mosaico, nas 3 plantas testadas, somente após a terceira contaminação.



**FIGURA 19:** Número de plantas contaminadas pelo mosaico, onde cada evento transgênico teve 3 sementes plantadas para a análise da planta-evento, em relação aos dias após a inoculação do vírus nas plantas. Eventos T1 RNAi testados: 66, 70, 59, 79, 29, 87, 76 e 63 (3 plantas de cada); 31, planta transformada com a construção não RNAi, utilizada como controle negativo transgênico; C-, planta não transgênica.

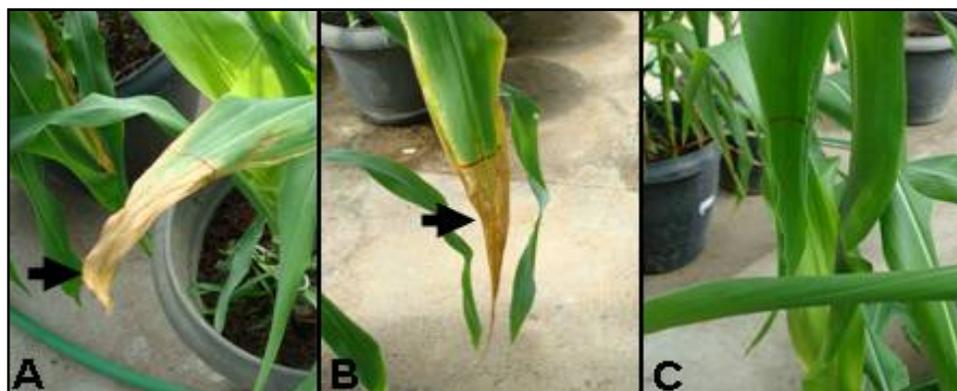
Plantas transgênicas e não transgênicas inoculadas com o mosaico, assim como plantas assintomáticas podem ser observadas nas figuras 20, 21. Os sintomas da doença são também demonstrados. Plantas assintomáticas presentes nestas figuras apresentaram melhor crescimento e desenvolvimento quando comparadas as plantas sintomáticas, principalmente pela produção superior de massa foliar destas plantas, indicando que o sistema do RNAi conferindo resistência ao mosaico. Teste com o herbicida PPT realizado para demonstrar a possível inserção do gene de resistência do herbicida na planta e pode ser observado pela necrose foliar na Figura 22.



**FIGURA 20:** Descrição de experimento em casa de vegetação. Planta transgênica sem sintoma (A); seta preta em B mostra os padrões de sintomas observados. Como controle, foram utilizadas 8 plantas do genótipo HiII não transgênico.



**FIGURA 21:** Plantas transgênicas inoculadas com o mosaico. Plantas assintomáticas (seta) apresentaram melhor crescimento e desenvolvimento que as plantas sintomáticas, indicando que o sistema do RNAi está realmente protegendo a planta contra a doença. É possível visualizar também os efeitos da doença sobre a cultura, observada pela produção superior de massa foliar das plantas assintomáticas.



**FIGURA 22:** Teste com o herbicida PPT na ponta de uma das folhas. Amostras sensíveis ao PPT (A, B) e amostra não sensível ao PPT (C), mostrando a possível inserção do gene de resistência do herbicida na planta.

As quatro contaminações realizadas tiveram como material vegetal folhas de milho contaminadas com mosaico comum, coletadas nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo. O diagnóstico do mosaico nas plantas é realizado através do aparecimento dos sintomas, por isso não se sabe inferir se apenas um dos quatro potivírus poderia estar infectando a planta naquele momento. Recentemente, foi demonstrado, no Brasil, em experimentos realizados

na Embrapa Milho e Sorgo, que um cDNA de 335 pb, obtido de RNA a partir do vírus purificado de folhas de milho com sintomas de mosaico, apresentou similaridade das seqüências de nucleotídeos entre esses quatro potivirus, nas seguintes proporções: MDMV-B (86,3%), SCMV (81,8%), SrMV (77,1 %) e JGMV (70,2 %) (Almeida et al., 2000).

Schuelter et al. (2003) realizaram também experimentos em linhagens de milho da Embrapa Milho e Sorgo e também observaram modificações nas proporções fenotípicas em suas plantas contaminadas. Estes autores atribuíram esses resultados ao tipo de inóculo, justificando, ainda, que a inoculação foi realizada com inóculo proveniente de plantas infectadas no campo, que pode apresentar variabilidade genética quanto à virulência. Conseqüentemente, o aparecimento de sintomas dependeria das constituições genéticas para resistência e virulência do hospedeiro e do vírus, respectivamente.

Como o cassete RNAi empregado nestas plantas contém uma seqüência do potivirus SCMV, a resistência das mesmas pode ser restrita a apenas alguns destes potivirus. Isso porque há uma diferença média de 21,15% de similaridade entre os potivirus causadores do mosaico, já que esta técnica é caracterizada como funcional e sugerida por diversos autores para o silenciamento de gênico, como Fire et al. (1998), Hamilton & Baulcombe (1999), Waterhouse et al. (2001) e Ramesh et al. (2007). Além disso, Helliwell & Waterhouse (2003) afirmam que, em relação à resistência conferida à planta pelo silenciamento, este pode ser diferente entre os transgenes, sendo que alguns podem apresentar até 100% de silenciamento quando a construção empregada é do tipo grampo. Os mesmos autores ressaltam, ainda, que a seqüência de especificidade em silenciamento gênico permite o uso de seqüências de genes-alvo específicos, assim como apresenta potencial para a utilização da técnica em famílias multigênicas, cuja seqüência alvo seja conservada entre os membros (Helliwell & Waterhouse, 2003).

De acordo as afirmações acima, a construção hpRNA-SCMV poderia conferir resistência a mais de um dos potivirus citados acima se a seqüência empregada na construção gênica fosse conservada entre os potivirus.

As amostras C-, planta não transgênica e 31 transgênica sem RNAi (construção 28), demonstraram sintomas desde a primeira contaminação, como esperado.

## 5 CONCLUSÕES

A construção hpRNA-SCMV, *hairping* – *Sugarcane Mosaic Virus*, é capaz de direcionar a formação de RNAs, em plantas de milho transgênicas, conferido às mesmas resistência ao mosaico comum do milho.

- A construção hpRNA-SCMV confere resistência ao mosaico em plantas de milho transgênicas.
- A seqüência da capa protéica do vírus do mosaico – SCMV é capaz de formar RNAs.
- O RNAi é funcional quanto à resistência à virose.
- Plantas transgênicas para RNAi contaminadas com mosaico que apresentam sintomas podem restaurar seu estado de sanidade.

Plantas resistentes ao mosaico são de grande interesse para a agricultura mundial, uma vez que ela está classificada entre as mais importantes doenças virais presente na agricultura do milho, hoje, no mundo, pela grande perda gerada na produção de grãos em áreas afetadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.C.L.; OLIVEIRA E.; RESENDE, R. Detecção de vírus por RT-PCR, hibridação “dotblot” e dot-ELISA em milho com mosaico comum.

**Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 168-170, jun. 2000.

ALMEIDA, A.C.L. **Detecção, caracterização e aspectos epidemiológicos do complexo viral do mosaico comum do milho (*Zea mays* L.)**. 1998. 83 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

ALMEIDA, A.C.L.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, R.O. Os fatores relacionadas à incidência e disseminação do vírus do mosaico comum do milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 766-769, dez. 2001.

ARAGÃO, J.L.; RIBEIRO, S.G. Detecção de proteínas pela técnica ELISA. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA- SPI, 1998.

ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the Involvement of L-proline. **Planta**, New York, v. 164, n. 2, p. 207-214, May 1985.

ASSEM, S.K.; HASSAN, O.S. Real time quantitative PCR analysis of transgenic Maize plants produced by Agrobacterium-mediated transformation and particle bombardment. **Journal of Applied Sciences Research**, Punjab, v. 4, n. 4, p. 408-414, 2008.

BARCELO, P.; HAGEL, C.; BECKER, D.; MARTIN, A.; LORZ, H. Transgenic cereal (tritordeum) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. **Plant Journal**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 583-592, Apr. 1994.

BALMER, E. Doenças do milho. In: GALLI, F. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. p. 371-391

BATTY, N. P.; EVANS, J.M. Biological ballistics: no Langer a shot in the dark. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 107-113, 1992.

BARBOSA, A.S.; LIN C.J. Silenciamento de genes com RNA interferência: um novo instrumento para investigação da fisiologia e fisiopatologia do córtex adrenal. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 48, n. 5, p.312-319, out. 2004.

BECKER, D.; BRETTSCHEIDER, R.; LORZ, H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. **Plant Journal**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 299-307, Feb. 1994.

BRANDÃO, R.L.; CARNEIRO, A.A.; SCHARFFERT, R.E.; PAIVA, L.V. CARNEIRO, N.P. **Transformação genética do sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. p. 1-38, 2005. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, v. 43).

BRANDES, E.W. **The mosaic disease of sugarcane and other grasses**. Washington: USDA, 1919. 26 p. (USDA. Technical Bulletin, n. 829).

BYTEBIER, B.; DEBOECK F.; DEGRIEVE, H.; VAN MONTAGU, M.; HERNALSTEENS, J-P. T-DNA Organization in tumor cultures and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, n.15, p. 5345-5349, Aug. 1987.

CARNEIRO, A.A.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E. Transferência direta de genes para plantas. In: \_\_\_\_\_. **Transformação genética de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p. 104.

CARNEIRO, A.A.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E. **Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 44 p.

CARRINGTON, J.C.; KASSCHAU, K.D.; JOHANSEN, L.K. Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. **Virology**, San Diego, v. 281, n. 1, p. 1-5, Mar. 2001.

CASAS, A.M.; KONONOWICZ, A.K.; ZEHR, U.B.; TOMES, D.T.; AXTELL, J.D.; BUTTLER, L.G.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 23, p. 11212-11216, Dec. 1993.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; FERNANDES, F.T.; PINTO, N.F.J.A. **Cultivo de sorgo**. 2. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. Versão Eletrônica. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de Produção, 2). Disponível em: <[www.cnpms.embrapa/ br/publicações/sorgo](http://www.cnpms.embrapa.br/publicações/sorgo)>. Acesso em: 20 set. 2008

CHEN, J.; CHEN, J.; ADAMS, M.J. Characterisation of potyvíruses from sugarcane and maize in China. **Archives of Virology**, New York, v. 147, n.6, p. 1237-1246, Apr. 2002.

CHIU, Y.; RANA, T.M. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. **RNA**, Cheveland, v. 9, p. 1034-1048, 2003.

CHRISTOU, P. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. **Euphytica**, Wageningen, v. 85, n. 1/3, p. 13-27, 1995.

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen Sources. **Scientia Sinica**, Beijing, v. 18, n. 5, p. 659-668, 1975.

CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of planta víruses. **Journal of General Virology**, London, n. 34, n. 3, p. 475-483, Mar. 1977.

COELHO, G.T. da C. **Análises do promotor do gene transportador de fosfato de Arabidopsis thaliana –AtPT2 – em plantas de milho transgênicas**. 2005. 83 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; ARRUDA, S. Moléstias de vírus e de micoplasma do milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 4, p. 39-41, 1971.

CHRISTENSEN, A.H.; QUAIL, P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Transgenics Research**, Netherlands, v. 5, n. 3, p. 213-218, Aug. 1996.

DELPORTE, F.; JEROUVILLE, B.; MELARD, A.; KUTTEN, L.; BALEUX, R.; IULIANO, M.; SCHELLINGEN, D.; JACQUEMIN, J.M. Wheat transformation with glutenin gene. **Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet**, v. 66, n. 3, p. 443-446, 2001.

DEROLES, S.C.; GARDNER, R.C. Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 365-377, 1988.

ECHEVERRI, J.; PERRIMON, N. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 7, n. 5, p. 373-384, May 2006.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

FERNANDES, F.T. The current status of maize diseases in Brazil. In: CASELA, C.; RENFRO, R.; KRATTIGER, A.F. (Ed.). **Diagnosing maize diseases in Latin America**. New York: ISAAA, 1998. p. 5-7. (ISAAA. Briefs, n. 9).

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E.; PINTO, N.F.J.A. Doenças do milho. In: POTAFOS. **Arquivo do agrônomo**. 2. ed. ampl. e mod. Piracicaba, 1995. p.15-18. (POTAFOS. Arquivo do Agrônomo, n. 2). Disponível em: <[http://www.potafos.org/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/d5fbc829a2f54298832569f8004695c5/\\$FILE/Milho.pdf](http://www.potafos.org/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/d5fbc829a2f54298832569f8004695c5/$FILE/Milho.pdf)>. Acesso em: 01 out. 2008.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, n. 6669, p. 744-745, 806-811, Feb. 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION ON THE UNITED NATIONS. **Crop prospects and food situation**, n. 4, Oct. 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai473e/ai473e00.htm>> Acesso em: 29 out. 2008.

FRAME, B.R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R.K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T.M.; PEGG, S.E.K.; LI, B.; NETTLETON, D.S.; PEI, D.; WANG, D. *Agrobacterium tumefaciens*: mediated transformation of maize embryos using a Standard Binary Vector System. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 1, p. 13-22, May 2002.

FROMM, M.E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, A.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J.; KLEIN, T.M. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. **BioTechnology**, New York, v. 8, n. 9, p. 833-839, Sept. 1990.

FUCHS, E.; GRÜNTZIG, M. Influence of sugarcane mosaic vírus (SCMV) and maize dwarf mosaic vírus (MDMV) on the growth and yield of two maize varieties. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 102, p. 44-50, 1995.

GONÇALVES, M.C.; MAIA, I.G.; GALLETI, S.R.; FANTIN, G.M. Infecção mista pelo sugarcane mosaic vírus e maize rayado fino vírus provoca danos na cultura do milho no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 348-352, out./dez. 2007.

GORDON-KAMM, W.J.; SPENCER, T.M.; MANGANO, M.L.; ADAMS, T.R.; DAINES, R.J.; START, W.G.; O'BRIAN, J.V.; CHAMBERS, S.A.; ADAMS, J.W.R.; WILLETS, N.G.; RICE, T.B.; MACKAY, C.J.; KRUEGER, W.; AUSCH, A.P.; LEMAUX, P.G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 7, p. 603-618, July 1990.

GRAVES, A.C.; GOLDMAN, S.L. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the monocot genus *Gladiolus*: detection of expression of T-DNA-encoded genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 4, p. 1745-1746, Apr. 1987.

HAMILTON, A.J.; BAULCOMBE, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, Washington, v. 286, n. 5441, p. 950-952, Oct. 1999. Disponível em: <<http://www.genetics.wisc.edu/courses/875/fall03/files/hamilton-baulcombe.pdf>>. Acesso em: 03 set. 2008

HOLLINGS, M.; BRUNT, A.A. Potyvíruses. In: KURSTAK, E. **Handbook of plant vírus infections**: comparative diagnosis. Amsterdam: Elsevier, 1981. p. 731-807.

HUANG, X.Q.; WEI, Z.M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, n. 11, p. 793-800, June 2004.

HELLIWELL, C; WATERHOUSE, P. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. **Methods**, San Diego, v. 30, n. 4, p. 289-295, Feb. 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.  
**Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA)**. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>>. Acesso em: 28 out. 2008.

ISHIDA, V.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, n. 6, p. 745-750, June 1996.

JONES, E.F.; HILL, J.H.; DURAND, D.P. Detection and differentiation of maize dwarf mosaic vírus, strains A and B, by use of different class immunoglobulins in a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 8, p. 1118-1124, Mar. 1988.

KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANDFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v. 326, n. 6117, p. 70-73, May 1987.

LI, L.; WANG, X.; ZHOU, G. Analyses of maize embryo invasion by sugarcane mosaic virus. **Plant Science**, Clare, v. 172, n. 1, p. 131-138, Jan. 2007.

LOEB, T.A.; REYNOLDS, T.L. Transient expression of the uidA gene in pollen embryoids of wheat following microprojectile bombardment. **Plant Science**, Clare, v. 104, n. 1, p. 81-91, Jan. 1994.

LOPES, M.J.C. **Estresse oxidativo e análise anatômica em plantas de diferentes ciclos de seleção do milho ‘Saracura BRS-4154’ sob encharcamento contínuo**. 2005. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LU, S.; SHI, R.; TSAO, C.C; YI, X.; LI, L.; CHAING, V.L. RNA silencing in plants by the expression of siRNA duplexes. **Nucleic Acids Research**, Osford, v. 32, n. 21, p. 171-176, Nov. 2004.

MARTON, L.; WULLEMS, G.J.; MOLENDIJK, L.; SCHILPEROORT, R.H. "In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana Tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*" **Nature**, London, v. 277, n. 5692, p. 129-131, Jan. 1979.

MOHAMMADI, M.R.; KOOHI-HABIBI, M.; MOSAHEBI, G.; HAJIEGHRARI, B. Identification of prevalent potyvirus on maize and johnsongrass in corn fields of Tehran province of Iran and a study on some of its properties. **Communications in Agricultural and Applied Biological Science**, v. 71, n. 3, pt. B, p. 1311-1319, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. (Ed.) **Virus taxonomy**. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Springer, 1995. 892p.

NASCIMENTO, L.C.; ASSIS FILHO, F.M.; PIO-RIBEIRO, G.; PAGUIO, O.; DEOM, C.M.; NAIDU, R.; SHERWOOD, J. Transformação de *Arachis hypogaea* com o gene não estrutural do S RNA do Tomato spotted wilt virus. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 9, n.1/3, p.939-948, jan./dez. 2005. Disponível em: [http://www.cnpa.embrapa.br/rbof/artigos/912005008\\_rbof,9\(1-3\),939-948,2005.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/rbof/artigos/912005008_rbof,9(1-3),939-948,2005.pdf). Acesso em: 01 mar. 2008

NEILSON, J.R.; SHARP, P.A. Small RNA regulators of gene expression. **Cell**, Cambridge, v. 134, n. 6, p. 899-902, Sept. 2008

O'CONNOR-SÁNCHEZ, A.; CABRERA-PONCE, J.L.; VALDEZ-MELARA, M.; TÉLLEZ-RODRÍGUEZ, P.; PONS-HERNÁNDEZ, J.L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. **Plant Cell Reporters**, New York, v. 21, n. 4, p. 302-312, Nov. 2002.

OFFRINGA, R.; ELZEN, P.M.J. van den; HOOYKAAS, P.J.J. Gene targeting in plants using the *Agrobacterium Tumefaciens* vector system. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 114-123, 1992.

OLIVEIRA, E.; CARVALHO, R.V.; DUARTE, A.P.; ANDRADE, R.A.; RESENDE, R.O.; OLIVEIRA, C.M.; RECCO, P.C. Molicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 2, p.38-46, maio/ago. 2002.

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R.O.R.; PECCI, M.G.; LAGUNA, I.G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por molicutes em milho no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 19-25, jan. 2003

POETHIG, R.S.; PERAGINE, A.; YOSHIKAWA, M.; HUNTER, C.; WILLMANN, M.; WU, G. The function of Rnai in plant development. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, Oakland, v. 71, p.165-170, 2006.

PRZETAKIEWICZ, A.; KARAŚ, A.; ORCZYK, W.; NADOLSKA-ORCZYK, A. *Agrobacterium*-mediated transformation of polyploid cereals: the efficiency of selection and transgene expression in wheat. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 9, n. 4, pt. B, p. 903-917, 2004.

RAMESH, S.V.; MISHRA, A.K.; PRAVEEN, S. Hairpin RNA-mediated strategies for silencing of tomato leaf curl virus AC1 and AC4 genes for effective resistance in plants. **Oligonucleotides**, New Rochelle, v. 17, n. 2, p. 251-257, June 2007

REPELLIN, A.; BAGA, M.; JAUHAR, P.P.; CHIBBARL, R.N. Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer: new challenges **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 64, n. 2/3, p. 159-183, 2001.

RITALA, A.; ASPEGREN, K.; KURTEN, U.; SALMENKALLIO-MARTTILA, M.; MANNONEN, L.; HANNUS, R.; KAUPPINEN, V.; TEERI, T.H.; ENARI, T. Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 24, n. 2, p. 317-325, Jan. 1994.

ROGERS, S.G.; HORSCH, R.B.; FRALEY, R.T. Gene transfer in plants: production of transformed plants using Ti plasmid vectors. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 118, p. 627-640, 1986.

ROMANO, E. Análise da integração do DNA pela técnica de Southern Blot. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA- SPI, 1998.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in Barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: Biological Sciences**, Washington, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, Dec. 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

DI SERIO, F. ; SCHÖB, H.; IGLESIAS, A.; TARINA, C.; BOULDOIRES, E.; MEINS Junior, F. Sense- and antisense-mediated gene silencing in tobacco is inhibited by the same viral suppressors and is associated with accumulation of small RNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 11, p. 6506-6510, May 2001.  
Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/98/11/6506.full.pdf+html>>  
Acesso em: 25 fev. 2008

SCHUELTER, A.R.; SOUZA, I.R.P.; OLIVEIRA, E.; GUIMARÃES, C.T. Controle genético da resistência ao mosaico comum em linhagens de Milho Tropical. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 2, n. 3, p. 103-110, set./dez. 2003.

SHUKLA, D.D.; FRENKEL, M.J.; WARD, C.W. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 13, p. 178-191, 1991.  
Disponível em: < [www.cps-scp.ca/download/cjpp-archive/ Vol13/ CJPP13\(2\)178-191\(1991\).pdf](http://www.cps-scp.ca/download/cjpp-archive/Vol13/CJPP13(2)178-191(1991).pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2007

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. **The potyviridae**. Cambridge: CAB International, 1994. 516 p.

TADESSE, Y.; SÁGI, L.; SWENNEN, R.; JACOBS, M. Optimisation of transformation conditions and production of transgênic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment. **Plant Cell**, Rockville, v. 75, n. 1, p. 1-18, Jan. 2003.

VANCE, V.; VAUCHERET, H. RNA silencing in plants: defense and counterdefense. **Science**, v. 292, n. 5525, p. 2277-2280, June 2001. Disponível em : <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/292/5525/2277>>. Acesso em: 28 jan. 2006

VENTURINI, L.; EDER, M.; SCHERR, M. Review article. RNA-mediated gene silencing in hematopoietic cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 2006, p. 1-13, 2006. Doi: 10.1155/JBB/2006/87340.

VERMEULEN, A.; BEHLEN, L.; REYNOLDS, A.; WOLFSON, A.; MARSHALL, W.S.; KARPILOW, J.; KHVOROVA, A. The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. **RNA**, v. 11, p. 674-682; Apr. 2005. Doi: 10.1261/rna.7272305.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D.E.; CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of General Virology**, Washington, v. 33, n. 10, p. 165-167, Oct. 1976. Disponível em: <<http://vir.sgmjournals.org/cgi/reprint/33/1/165?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=voller&fulltext>> Acesso em: 28 jan. 2008

WANG, M.B.; METZLAFF, M. RNA silencing and antiviral defense in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 2, p. 216-222, Jan. 2005.

WANG, Q.; NIE, Q.; FENG, Z. RNA interference: antiviral weapon and beyond. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 9, n. 8, p. 1657-1661, May 2003.

WAQUIL, J.M.; OLIVEIRA, E.; PINTO, N.F.J.A.; FERNADES, F.T.; CORREIA, L.A. Víruses em milho, incidência e efeito na produção. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 21, n. 4, p. 460-463, out./dez. 1996.

WATERHOUSE, P.M.; WANG, M.B.; FINNEGAN, E. J. Role of short RNAs in gene silencing. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, n. 7, p. 297-301, July 2001.

XU, M.L.; JIANG, J.F.; GE, L.; XU, Y.Y.; CHEN, H.; ZHAO, Y.; BI, Y.R.; WEN, J.O.; CHONG, K. FPF1 transgene leads to altered flowering time and root development in rice. **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, n. 2, p. 79-85, 2005. Disponível em: <<http://vir.sgmjournals.org/cgi/reprint/33/1/165?Maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=voller&fulltext>> Acesso em: 15 dez. 2007

ZHAO, Z.Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.A.; HONDRED, D.A.; BOND, D.; KRELL, S.; RUDERT, M.L.; BRUCE, W.B.; PIERCE, D.A. Molecular analysis of T<sub>0</sub> plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Ottawa, v. 72, p. 34-37, 1998.

ZHAO, Z.Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.A.; HONDRED, D.A.; BOND, D.; SCHROEDER, S.; RUDERT, M.L.; PIERCE, D.A. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. **Molecular Breeding**, London, v. 8, n. 4, p. 323-333, 2002.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 3406-3415, Apr. 2003.