



XXXVI CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Biológico - São Paulo, SP - 19 a 21 de Fevereiro de 2013

DESENVOLVIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA INOVADORA DE GENÉTICA REVERSA E DE DEFESA DE PLANTAS CONTRA TOSPOVÍRUS MEDIADA PELA DUPLA AÇÃO DE MOLÉCULAS DE RNA DEFECTIVO-INTERFERENTE (DI RNAS).

André Gustavo Machado Bertran, Tatsuya Nagata, Renato Oliveira Resende

Universidade de Brasília, Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia, Dep. de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Brasília-DF, Brasil. Email: bertran@unb.br; resende@unb.br

As tospoviroses são importantes doenças virais dadas a letalidade da infecção e as perdas agrícolas e econômicas delas decorrentes em um grande número de espécies de plantas cultivadas. O entendimento do processo de infecção de tospovírus em plantas hospedeiras, bem como, a busca de novas estratégias de controle mais eficientes e estáveis são essenciais para o manejo desses patógenos. Por constituírem um grupo de vírus com genoma de RNA negativo, esses patógenos apresentam várias limitações metodológicas no estudo do seu processo infeccioso. A ausência de um sistema de genética reversa para os tospovirus constitui uma grande barreira para o avanço no seu estudo biológico e molecular. Os RNA defectivos interferentes (DI) dos tospovirus, derivados do gene da polimerase viral (L RNA), por suas características de replicação extremamente eficiente e interferência na expressão de sintomas apresentam-se com uma ferramenta alternativa para o estabelecimento de um sistema para estudo de replicação viral via genética reversa. Além desta aplicação, a obtenção de um sistema de defesa contra tospovirus baseado em partículas defectivas interferentes (DI) é uma alternativa viável por meio de transgenia. Devido sua capacidade de interferência ativa na replicação viral, DI RNAs de tospovirus são responsáveis por significativa atenuação de sintomas durante a infecção viral. Além disso, devido à manutenção dos terminais 5' e 3' complementares do L RNA, essas moléculas defectivas são capazes de formar estrutura secundária indutora do mecanismo de silenciamento gênico em plantas via siRNA. Dessa forma, os DI RNAs podem constituir uma estratégia inovadora, ampla, dinâmica e de dupla funcionalidade em plantas transgênicas expressando essas moléculas. Nossa estratégia de utilização dos DI RNAs de tospovírus pode ser dividida em quatro etapas: prova conceitual; estudo da dinâmica populacional DI vs. vírus selvagem; genética reversa e busca de um DI mínimo para transgenia. Moléculas de DI RNAs de TSWV e GRSV serviram de base para a síntese de cDNAs sintéticos com a incorporação de ribozimas tanto na extremidade 5' quanto 3' do RNA a ser transcrito e da sequência promotora do fago SP6 na extremidade 3'. As moléculas sintéticas foram clonadas em vetor pBlueScript KS+ e foram usadas para experimentos de transcrição *in vitro* para validação da capacidade autocatalítica das ribozimas inseridas. Para ensaios de expressão *in planta* os DIs sintéticos foram subclonados no vetor binário pGreenII SK 62 e agroinoculados, de forma isolada ou coinoculados com os vírus selvagens (TSWV e GRSV) em combinações distintas. A cinética de transcrição dos DIs *in planta* foi determinada identificando o período ideal de inoculação viral (48 a 72 h) em função da curva de acumulação dos DIs transcritos. Os ensaios preliminares de coinoculação indicam que as moléculas de DIs transcritas pelo vetor binário são capazes de se replicar na presença do seu respectivo vírus selvagem. Essa constatação abre caminho para à utilização dos DIs como ferramenta de genética reversa dos tospovírus. Nas próximas etapas do projeto, serão sintetizadas versões mutantes das moléculas dos DI RNAs visando determinar as sequências mínimas requeridas para a replicação viral. Uma vez definido um DI mínimo, plantas transgênicas serão produzidas expressando essas moléculas defectivas derivadas da polimerase viral dos tospovirus. Espera-se que os DIs transgênicos possam atuar com agentes duplos, na inibição da replicação do vírus selvagem atenuando os sintomas nas plantas



XXXVI CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Biológico - São Paulo, SP - 19 a 21 de Fevereiro de 2013

infectadas e simultaneamente, na indução do silenciamento gênico causando a degradação viral durante o processo infectivo.

Agências financiadoras: CNPq, CAPES, FAP-DF