

Área Científica **Viticultura e Enologia**

Código PTDC/AGR-GPL/099512/2008 **Início** 2010/03/01 **Termo** 2013/08/31

Título Silenciamento de Closterovirus mediado por enxertos transgénicos

Programa

FCT

Medida

Projetos de I&D em todos os Domínios Científicos

Instituição Líder Universidade do Algarve

Investigador Responsável INIAV José Eduardo Jorge Eiras Dias

Orçamento Total 147 385,00€

Orçamento INIAV 17 112,00€

Parceria

INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.	Nacional
BioFIG	Centro de Biodiversidade, Genómica Integrativa e Funcional	Nacional
UAlg	Universidade do Algarve	Nacional

Equipa

José Eduardo Jorge Eiras Dias
João Do Sacramento Andrade Brazão
Margarida Thierstein Romão Duarte Teixeira Santos

Resumo

Os actuais meios de contról de virus são poucos e de reduzida eficácia. Na ausencia de medidas curativas a proteção

assenta em medidas preventivas, o que aumenta bastante os custos indirectos.

O silenciamento de RNA é um mecanismo endógeno que possibilita resistencia contra os vírus e a sua utilização é bastante prometedora. Este mecanismo origina a degradação específica de mRNA viral. É desencadeado por moléculas curtas

de RNAs (siRNA) resultantes da clivagem de RNA de cadeia dupla (dsRNA) homologo das sequências virais. Este mecanismo

tem sido usado em culturas transgénicas mas origina diversos problemas, especialmente em plantas lenhosas: longo

períodos de juvenilidade; alterações das características agronómicas devidas aos processos de regeneração, necessidade

de obter uma linha transgénica para cada variedade, dúvidas de opinião publica relativas ao consumo de comida transgénica. Para além disso, uma cultura transgenica lenhosa não apresenta a flexibilidade suficiente para se adaptar a mudanças no contexto fitopatológico.

Recentemente tem-se tentado controlar virus mecânicamente transmissíveis a plantas herbáceas pela aplicação exógena (pulverização, bombardeamento) de dsRNA. Em termos práticos esta estratégia é de difícil aplicação a um pomar já instalado devido a:

- a) necessidade de repetir o tratamento várias vezes durante a vida do pomar,
- b) custo elevado da produção de uma quantidade suficiente de dsRNA necessário para cobrir a copa de árvores adultas,
- c) eventual ineficácia contra vírus restritos ao floema,
- d) riscos ambientais desconhecidos devido à libertação na atmosfera de elevadas quantidades de dsRNA.

Outras alternativas recentes envolvem o silenciamento génico induzido por vírus (VIGS), em que um vírus artificial é usado como vector do RNA protector, *Agrobacterium tumefaciens* para fornecer o material genético protector ou uma mistura de ambos métodos. Contudo a sua aplicabilidade em condições de campo é desconhecida e o envolvimento de microorganismos adicionais poderá originar novos problemas (ex. recombinação).

Para solucionar estes problemas em plantas lenhosas propomos fornecer o sinal de silenciamento através da enxertia de um pedaço de tecido transgénico na planta a proteger. A priori este método parece promissor:

- a) o produto agrícola consumido é produzido numa parte da planta que não é geneticamente modificada,
- b) é flexível, i.e, pode ser aplicado apenas quando o risco se apresenta,
- c) o tecido protector poderá ser desenvolvido para toda uma cultura (i.e., não é necessario transformar várias variedades; basta que exista compatibilidade de enxertia),
- d) pode ser aplicado a pomares já existentes,
- e) pode ser removido ou substituído por outro tecido protector se as condições mudarem,
- f) pode ser aplicado pelos próprios agricultores.

Vários closterovirus afectam importantes culturas lenhosas Mediterrânicas (e Portuguesas) - vinha, citrinos, figueira e oliveira. Os closterovirus são vírus limitados ao floema que têm genomas de RNA anormalmente grandes e ocorrem em misturas de estirpes. O estudo da interacção destes virus com as plantas cultivadas é dificultado pela ausência de hospedeiros herbáceos. Contudo o Grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV 2), que está envolvido no desenvolvimento de incompatibilidades com o porta enxertos e na doença do enrolamento folear, pode ser mecânicamente transmitido a *Nicotiana benthamiana*. Por outro lado, o Citrus tristeza virus (CTV) apenas infecta protoplastos desta espécie. A obtenção de resistencia contra GLRaV 2 e CTV já foi tentada através da clássica expressão do gene da proteína da cápside (CP) mas ainda não existe uma solução a curto prazo. Para além disso é conhecimento corrente que deve existir uma elevada homologia entre o indutor de silenciamento e a sequencia viral, mas este aspecto não tem sido levado em conta na concepção das contruções.

Neste projecto vamos estudar:

- 1) o fornecimento através de enxertia lateral com tecido transgénico dos sinais que desencadeiam o silenciamento para os casos de GFP, da resistência contra GLRaV 2, e, dependendo de resultados ainda desconhecidos, tambem da resistencia contra CTV, como modelo válido para os closterovirus.
- 2) a gama de proteção em função da variabilidade genómica de GLRaV 2 e de CTV.

Para conseguir obter resultados no período do projeto os ensaios serão feitos em *N. Benthamiana*. No final do projecto, para além dos conhecimentos necessários para o fornecimento dos sinais de silenciamento por enxertia teremos tambem desenvolvido uma construção genética silenciadoras de multiplas estirpes de CTV capazes de ser usadas em citrinos no âmbito de projectos subsequentes.

Esta equipa reúne um conhecimento significativo da filodinâmica de CTV (ver resultados do projecto POCTI/AGR/59090/2004) e está atualmente envolvida no estudo de silenciamento de RNA no projecto PTDC/AGR-GPL/67844/2006 e enrolamento folear da videira no projecto PTDC/AGR-AAM/65094/2006. A equipa reúne especialistas em virologia, biotecnologia e fisiologia.