



Universidade de Brasília  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Biologia Molecular

SILENCIAMENTO TRANS-ESPECÍFICO *IN VIVO* ENTRE FUMO E O  
FUNGO FITOPATOGÊNICO *Fusarium verticillioides*

Maria Laine Penha Tinoco

Brasília  
Setembro 2010



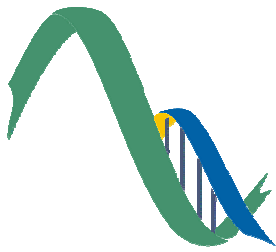
Universidade de Brasília  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Biologia Molecular

SILENCIAMENTO TRANS-ESPECÍFICO *IN VIVO* ENTRE FUMO E O  
FUNGO FITOPATOGÊNICO *Fusarium verticillioides*

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Molecular, curso de pós-graduação em  
Biologia Molecular como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em  
Biologia Molecular.

Maria Laine Penha Tinoco

Brasília  
Setembro 2010



Este trabalho foi realizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Transferência de Genes, sob a orientação do **Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão.**

## ÍNDICE

Índice de figuras e tabelas.....	01
Abstract.....	04
Resumo.....	05
1) Introdução	
1.1) Doenças fúngicas em plantas e o gênero <i>Fusarium</i> .....	06
1.2) RNAi e controle de doenças em plantas.....	14
1.3) RNA interferente.....	19
1.4) Propagação do sinal de silenciamento.....	23
1.5) Silenciamento <i>in trans</i> .....	26
2) Objetivo.....	28
3) Material e métodos	
3.1) Construção do vetor e transformação de plantas.....	28
3.2) <i>Fusarium</i> transgênico.....	32
3.3) Inoculação de plantas transgênicas com <i>Fusarium gus+</i> .....	32
3.4) Ensaio histoquímico e microscopia eletrônica de varredura.....	33
3.5) Análise por RT-PCR.....	34
3.6) Análise de RNAi.....	34
3.7) <i>Southern blot</i> .....	35
4) Resultado e discussão.....	36
5) Conclusão.....	46
Anexo.....	47

6) Referências bibliográficas.....48

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

---

**Tabela 1.** Espécies de fungos causadoras de doenças economicamente importantes..... **07**

**Figura 1) Sintomas das doenças provocadas por *Fusarium* nas principais culturas.** (A), (B), (C) Fusariose e podridão das raízes do milho [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com) (D) Fusariose em trigo [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com) (E) Murcha de Fusário em tomate [www.plant-disease.ippc.orst.edu](http://www.plant-disease.ippc.orst.edu) (F) Mal do Panamá em Banana [www.sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br](http://www.sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br) (G) *Fusarium* em couve [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com) (H) Podridão dos bulbos de alho [www.sciece.oregonstate.edu](http://www.sciece.oregonstate.edu) (I) *Fusarium* em cenoura [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com)..... **10**

**Figura 2) Esquema geral do ciclo de vida do gênero *Fusarium*.** Os clamidósporos presentes no solo ou em restos de cultura ou em plantas daninhas infectam as sementes ou raízes causando infecção precoce da planta e tombamento. Há dispersão de conídios pela parte superior da planta que quando no solo infectam novamente a semente ou a raiz da planta..... **12**

**Tabela 02)**Fungos filamentosos fitopatogênicos transformados com plasmídeos construídos para expressar dsRNA visando o silenciamento de genes específicos..... **18**

**Figura 3) Vias de silenciamento em células vegetais. (A)** Proteínas-tipo-Dicer (DCL2 e DCL3) processando transcritos contendo seqüências invertidas. **(B)** Proteína-tipo-Dicer (DCL1) processando intermediários formados durante a replicação de RNA viral. **(C)** dsRNA longo. **(D)** Proteína-tipo-Dicer (DCL1) processando precursores de miRNA. **(E)** Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC). **(F)** Clivagem da seqüência alvo específica do mRNA por RISC. **(G)** Destruição do mRNA após o processamento por RISC. **(H)** Possível silenciamento sistêmico composto por siRNA + proteínas de movimento siRNA primário. **(I)** Possível silenciamento sistêmico composto por dsRNA longos + proteínas de movimento siRNA primário. **(J)** Amplificação de *primer* depende de RdRP. **(L)** siRNA primário. **(M)** siRNA secundário processado por Dicer (DCL2 e DCL3). (Adaptado de Souza *et al.*, 2007)..... **22**

4) Fragmento de 627pb retirado do vetor pCambia3301 com *SspI* e *EcoRV* para gerar fragmentos no sentido sense e antisense na construção do vetor pSIUGUSi.....29

**Figura 5) Estratégia para a construção do vetor pSIUGUSgusi.** O intron ms-i3 foi removido do vetor pTOPOmsAt com *XbaI* e *SacI* e clonado no vetor pUC19-35S-AMVNos originando o vetor pSIU onde fragmentos de 627 pb do gene *gus* removidos do vetor pCAMBIA 3301 foram clonados nos sítios *NruI* e *KpnI* / *XbaI* gerando o vetor pSIUgus.....30

**Figura 6) Estratégia para a construção do vetor pC1302gusi.** O cassete de interferência para o gene *gus* foi retirado do vetor PSIUgus com a enzima *PvuII* e clonado no sítio de *SmaI* do *polylinker* do plasmídeo pCAMBIA1302 resultando no vetor de transformação pC1302gusi.....31

**Figura 7) Interferência genética após a inoculação do fungo *Fusarium verticillioides* expressando siRNA em planta de fumo.** (A) Esquema geral do vetor PC1302GUSi construído para promover silenciamento do gene *gus* em linhagens de fumo transformada GUS +. Um fragmento de 627-bp do gene *gus* (*gus frag*) foi clonado para gerar fragmentos nos sentidos sense e antisense, flanqueando o gene intron 3 malato sintase de *Arabidopsis thaliana* (MS-i3). (B) Uma linhagem de fumo expressando GUS (GUS +) foi re-transformada com ppC1302GUSi e não foi observada expressão do gene *gus* nas plantas regeneradas (GUS-RNAi). (C) Plantas transgênicas foram analisadas por PCR para detectar ambos os genes *gus* em plantas transformadas (GUS +) e o cassete de interferência do gene *gus* (hpGUS) na linhagem re-transformada (GUS-RNAi). (D) Detecção dos pequenos RNAs interferentes em plantas expressando GUS, em plantas GUS-RNAi e no controle. O controle é uma planta não-transformada. O marcador de tamanho molecular está indicado à esquerda nas figuras C e D.....37

**Figura 8) Inoculação de linhagens de plantas re-transformadas para expressar um RNA fita-dupla para silenciar o gene *gus* com *F. verticillioides* expressando Gus** (A) Células de micélio exibindo expressão do gene *gus* estável foram utilizadas para a inoculação das folhas da planta (B) Ensaio histoquímico GUS realizado com folha de tabaco re-transformada e inoculada com o fungo GUS +. Micélios interagindo com a planta re-transformada não mostraram expressão de GUS. Somente poucos esporos que estavam germinando apresentaram expressão de GUS. (C) Ensaio histoquímico GUS com as folhas de fumo não-transformadas inoculado com fungo GUS+. Após o ensaio de GUS,

superfícies foliares (apresentada em B e C) foram observadas em microscópio eletrônico de varredura para observar esporos germinando e penetrando nos estômatos (D e E).....**39**

**Figura 9) Colônias de *F. verticillioides* isoladas de ambos as linhagens re-transformada e não transformada de fumo.** (A) A expressão do gene *gus* foi quantificada em colônias de fungos isoladas de linhagens não-transgênicas (NT) e linhagens transgênicas (RT1 e RT2). (B) As duas colônias isoladas a partir de linhagens re-transformadas de plantas apresentaram redução da expressão do gene *gus* e foram analisados para a expressão de GUS após 8 passagens.....**41**

**Figura 10) Presença e expressão do gene *gus* em *F. verticillioides* transformados isolados de plantas de fumo siRNA.** (A) Análise de PCR para a presença do gene *gus* em *F. verticillioides* que não foram inoculados em plantas de fumo (N), Micélios que foram inoculados em plantas transformadas apresentaram uma redução de aproximadamente 62% (RT1) e 96 (RT2%) na expressão do gene *gus* e RT2 após a reversão para o fenótipo normal GUS + após a passagem 7 (R). (B) RT-PCR para a presença de transcritos do gene *gus* endógenos nas células fúngicas. (C) RT-PCR para a presença de transcritos do gene 5.8S rRNA do fungo (controle interno). (D) Detecção de siRNA a partir de fungos isolados de plantas transgênicas (RT1, RT2 e R) e as plantas não-transgênicas (N).....**43**

**Figura 11) Análise Southern blot do DNA genômico isolado de *F. verticillioides* para detectar o gene *gus*.** C: *F. verticillioides* não transgênicos; N: *F. verticillioides* transgênico que não foi inoculado em plantas de fumo; RT1 e RT2: *F. verticillioides* inoculado em plantas re-transformada; R: RT2 *F. verticillioides* após a reversão para o fenótipo normal GUS + .....**45**



## Abstract

Self-complementary RNA transcripts form a double-stranded RNA (dsRNA) that triggers a sequence-specific mRNA degradation, in a process known as RNA-interference (RNAi), leading to gene silencing. In vascular plants, RNAi molecules trafficking occur between cells and systemically throughout the plant. RNAi signals can spread systemically throughout a plant, even across graft junctions from transgenic to non-transgenic stocks. There is also a great interest in applying RNAi to pathogenic fungi. Specific inhibition of gene expression by RNAi has been shown to be suitable for a multitude of phytopathogenic filamentous fungi; however, dsRNA/siRNA silencing effect has not been observed *in vivo*. This study demonstrates for the first time the *in vivo* interference phenomenon in the pathogenic fungus *Fusarium verticillioides*, in which expression of an individual fungal transgene was specifically abolished by inoculating mycelial cells in transgenic tobacco plants engineered to express small interfering RNAs (siRNA) from a dsRNA corresponding to the particular transgene. The results provide a powerful tool for further studies on molecular plant-microbe and symbiotic interactions. From a biotechnological perspective, silencing of fungal genes by generating siRNAs in the host provides a novel strategy for the development of broad fungi-resistance strategies in plants and other organisms.

## Resumo

Transcritos de RNA auto complementar formam um RNA dupla fita (dsRNA) que aciona uma degradação de uma seqüência específica de RNA mensageiro (mRNA), em um processo conhecido como RNA (RNAi) interferente levando ao silenciamento gênico. Em plantas vasculares, o tráfico de moléculas de RNAi ocorre entre células e sistemicamente por toda a planta. Sinais de RNAi pode espalhar sistematicamente ao longo de uma planta, mesmo em enxertos transgênicos sobre cavalos não-transgênicos. Há também um grande interesse na aplicação do RNAi para fungos patogênicos. A inibição específica da expressão gênica por RNAi tem se mostrado adequado para uma grande variedade de fungos filamentosos fitopatogênicos, no entanto, o silenciamento por dsRNA / siRNA não foi observado in vivo. Este estudo demonstra pela primeira vez o fenômeno de interferência in vivo no fungo patogênico *Fusarium verticillioides*, em que a expressão de um transgene foi especificamente silenciado pela inoculação de células do micélio em plantas transgênicas de fumo transformadas geneticamente para expressar pequenos RNAs de interferência (siRNA) a partir de um dsRNA correspondente ao transgene. Estes resultados fornecem uma poderosa ferramenta para estudos sobre a interação molecular planta-patógenos, e interações simbióticas. Do ponto de vista biotecnológico, silenciamento de genes de fungos por geração de siRNAs no hospedeiro fornece uma nova ferrameta para o desenvolvimento de estratégias de resistência de fungos nas plantas e outros organismos.

## 1) INTRODUÇÃO

---

### 1.1) Doenças fúngicas em plantas e o gênero *Fusarium*

Desde que os seres humanos começaram a cultivar plantas, as doenças fúngicas têm sido uma das principais causas de perdas de culturas. Ultimamente, devido às moléstias patogênicas terem se tornado uma grande ameaça aos campos de produção, a maioria dos programas de melhoramento tem dedicado muito tempo e recursos na busca de genótipos com alta produtividade e elevada resistência em condições de campo.

Relatos estimam que mais de 65% da safra ou 21 bilhões de dólares são perdidos por ano nos Estados Unidos com a introdução de patógenos de plantas (Pimental *et al.*, 2005). Há centenas de anos, as doenças causadas por fungos têm um efeito negativo significativo na agricultura norte americana. Com o crescimento do comércio internacional a taxa de introdução desses organismos destrutivos tem aumentado. Os gastos com o controle dessas doenças estão em torno de 23,5 bilhões de dólares por ano, somente nos EUA. As perdas anuais devido aos patógenos exóticos de plantas, a maioria dos quais são fungos, são maiores que as perdas causadas por insetos (Rossman, 2009). Algumas das principais doenças fúngicas importantes para a agricultura mundial estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1. Espécies de fungos causadoras de doenças economicamente importantes.**

FUNGO	CULTURA	DOENÇA	REFERÊNCIA
<i>Phakospora pachyrhizi</i>	Soja	Ferrugem asiática	Schneider <i>et al.</i> , 2005
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Soja	Mofo branco	Danielson <i>et al.</i> , 2004
<i>Colletotrichum gossypii</i>	Algodão	Ramulose	Silva-Mann <i>et al.</i> , 2002
<i>Alternaria sp</i>	Algodão	Mancha alternaria	Ling & Yang, 1940
<i>Romularia areola</i>	Algodão	Falso oídio ou Míldio	Rathaiah, 1977
<i>Pyricularia grisea</i>	Arroz, Trigo		Rodríguez <i>et al.</i> , 2007
<i>Puccinia sp</i>	Trigo	Ferrugem	Steffenson <i>et al.</i> , 1984
	Milho	Ferrugem	Groth <i>et al.</i> , 1983
	Cana-de-açúcar	Ferrugem	Sotomayor <i>et al.</i> , 1983
<i>Fusarium solani</i>	Soja	Podridão vermelha da raiz (PVR) ou Síndrome da morte súbita (SMS)	Covert <i>et al.</i> , 2007
<i>Fusarium oxysporium</i>	Tomate	Fusariose	Steinkellner <i>et al.</i> , 2005 Houterman <i>et al.</i> , 2007
	Amendoim		El-Magraby & El-Magraby, 1988
	Fumo		Alves-Santos <i>et al.</i> , 2007
	Mamona		Araújo <i>et al.</i> , 2007
	Alfafa		Mendes <i>et al.</i> , 2001
	Feijão		Salgado <i>et al.</i> , 1994
<i>Fusarium verticillioides</i>	Algodão		Ragazi <i>et al.</i> , 1995
	Milho		Schjoth <i>et al.</i> , 2008
	Arroz		Quilis <i>et al.</i> , 2007
	Pinus		Martín-Pinto <i>et al.</i> , 2008

Dentre os fungos de grande importância para a agricultura mundial encontra-se o gênero *Fusarium*, não só por causar patologias em plantas, mas também porque algumas espécies produzem toxinas tais como tricotecenos, fumonisinas, a zearalenona, moniliformina e o ácido fusárico.

O gênero *Fusarium* apresenta uma expressiva importância na agricultura por ser patógeno para várias culturas de interesse econômico tais como milho, trigo, tomate, soja, feijão-caupi, causando doenças conhecidas por podridão das raízes, murcha e fusariose. Nos Estados Unidos, nas safras de 1998-2000 este fungo foi responsável por prejuízos de 871.000 mil dólares na cultura de trigo e cevada, com perdas econômicas secundárias de US \$ 1,8 bilhões, totalizando US \$ 2,7 bilhões de dólares somente no norte deste país onde representaram 55% das perdas totais neste período (Nganje et al., 2002). Na Nigéria, há relatos de epidemia causando a morte de até 50% das plantas em um campo naturalmente infestado e cultivado com variedades suscetíveis (Oyekan, 1977) e danos de até 75% na produção de feijão-caupi devido à murcha-de-fusário foram registradas na Índia (Allen, 1983).

No Brasil a incidência da podridão de colmo do milho chega acima de 70% e perdas de produtividade em torno de 50% têm sido relatadas em cultivares suscetíveis sob condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos patógenos. Resultados obtidos pela Embrapa Milho e Sorgo, na safra 06/07, mostraram que dentre os principais patógenos associados à podridão do colmo em milho, 20,68% são do gênero *Fusarium* (Costa et al., 2008). Em 1998, nos ensaios de rendimento de trigo conduzidos na Embrapa Trigo constatou-se, em genótipos brasileiros mais suscetíveis, que aproximadamente 40% dos grãos apresentaram sintomas de fusariose (Lima & Fernandes, 2002).

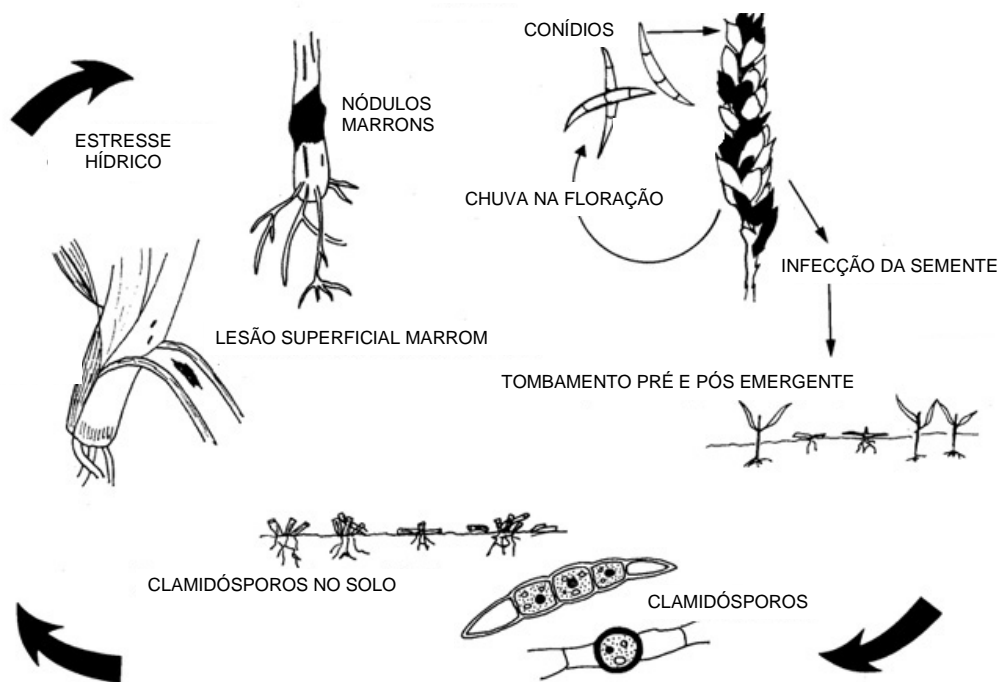
Os sintomas da doença caracterizam-se pela clorose e queda prematura de folhas, redução do crescimento e, finalmente, murcha e morte das plantas. A murcha é mais comum na fase reprodutiva da planta, podendo ocorrer também em plantas jovens, que em determinadas situações apresentam um rápido murchamento que precede a morte da planta (Poltronieri *et al.*, 1994). Os tecidos vasculares adquirem coloração castanha escura e pode haver formação de intumescências na parte mais baixa do caule. A Figura 1 ilustra os sintomas das doenças provocadas por *Fusarium* nas principais culturas atingidas.



Figura 1) Sintomas das doenças provocadas por *Fusarium* nas principais culturas. (A), (B), (C) Fusariose e podridão das raízes do milho [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com) (D) Fusariose em trigo [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com) (E) Murcha de Fusário em tomate [www.plant-disease.ippc.orst.edu](http://www.plant-disease.ippc.orst.edu) (F) Mal do Panamá em Banana [www.sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br](http://www.sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br) (G) *Fusarium* em couve [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com) (H) Podridão dos bulbos de alho [www.sciece.oregonstate.edu](http://www.sciece.oregonstate.edu) (I) *Fusarium* em cenoura [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com)

O gênero *Fusarium* pode ser encontrado habitando o solo, nas mais diversas regiões geográficas do mundo, especialmente em locais de climas tropicais e subtropicais. Esse fungo é capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação de estruturas chamadas clamidósporos, podendo colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus conídios que são disseminados pelo ar ou pela água (Figura 02). A disseminação do patógeno pode ocorrer através da água de irrigação e uso de implementos agrícolas que contenham propágulos de solo contaminado pelo fitopatógeno (Davis *et al.*, 2006). Esse gênero exibe alto grau de diversidade em relação aos atributos morfológicos, fisiológicos e ecológicos e não é surpreendente que representantes desse gênero ocorram na maioria dos nichos ecológicos nas mais diversas regiões geográficas do mundo (Burgess *et al.*, 1997). Admite-se que, desde 1900, aproximadamente 1.000 espécies de *Fusarium* foram descritas, a maioria pelo exame das suas estruturas (esporodóquios), diretamente nos hospedeiros ou substratos naturais, o que levou a que muitas dessas espécies fossem sinonímias, tendo em vista a grande variabilidade do *Fusarium* em diferentes ambientes e substratos (Burgess *et al.*, 1994).





**Figura 2) Esquema geral do ciclo de vida do gênero *Fusarium*.** Os clamidósporos presentes no solo ou em restos de cultura ou em plantas daninhas infectam as sementes ou raízes causando infecção precoce da planta e tombamento. Há dispersão de conídios pela parte superior da planta que quando no solo infectam novamente a semente ou a raiz da planta (Adaptado de Parry, 1990)

A complexa comunidade microbiana que habita a rizosfera interage com os patógenos de solo e influenciam, conseqüentemente, a infecção pelos fungos. Na rizosfera, além dos microrganismos patogênicos, também existem fungos e bactérias que possuem atividade antagonística contra fitopatógenos. Eles podem afetar adversamente densidades de populações, dinâmicas temporais e espaciais

e atividades metabólicas de patógenos de solo a partir da produção de metabólitos antimicrobianos secundários como as micotoxinas, enzimas líticas, entre outros (Raaijmakers *et al.*, 2009)

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos secretados por fungos no meio ambiente. Representam um sério risco para a saúde humana e animal, quando encontrada como contaminante em produtos de cereais como milho, aveia e trigo e são responsáveis por perdas econômicas estimadas em milhares de milhões de dólares todos os anos. A FAO/WHO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial da Saúde) estima que, em todo o mundo, cerca de 25% das colheitas de alimentos estão afetadas por micotoxinas (Cirillo *et al.*, 2003). Micotoxinas não são inativadas por altas temperaturas e por serem tóxicas em pequena quantidade, o acompanhamento de cereais afetados antes da distribuição é vital (Anderson *et al.*, 2010). Cinco tipos de micotoxinas são considerados econômica e toxicologicamente importantes: aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas (Charmley *et al.*, 1994).

*Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) é a mais importante das duas espécies do gênero produtora de fumonisina, uma micotoxina cancerígena que está entre as toxinas mais importantes quanto à segurança alimentar, com níveis de contaminação de até 100%. (Pozzi *et al.*, 1995). Foram identificadas 53 fumonisinas diferentes, sendo B1, B2 e B3 de maior relevância. A fumonisina B1 é a mais extensamente estudada, mas a Fumonisina B2 é mais citotóxica que B1. (Frisvad *et al.*, 2007).

A primeira descrição sobre a ocorrência natural de fumonisina B1 foi realizada por Sydenham *et al.* (1990) a partir de milho mofado colhido de uma área em Transkei, Sul da África, que apresentava alta incidência de câncer de esôfago em humanos. Esta micotoxina atinge animais de diferentes maneiras por

interferência no metabolismo de esfingolipídeos, que são lipídeos conjugados presente entre os neurônios e funcionam como lubrificante, acelerando o processo de transmissão do impulso nervoso (Merrill *et al.*, 2001). Fumonisinas são encontradas como contaminantes em rações derivadas de milho na África, China, França, Indonésia, Itália, em alguns países da América do Sul, e nos EUA (Lessard *et al.*, 2003). Alguns relatórios indicam que as fumonisinas não somente estão envolvidas com o aparecimento de câncer de esôfago (Marasas *et al.*, 1988; Yoshizawa *et al.*, 1994), mas também são responsáveis por leucoencefalomalácia em eqüinos e coelhos (Marasas *et al.*, 1988; Bucci *et al.*, 1996), edema pulmonar em suínos (Bouhnet *et al.*, 2006) e hepatotoxicidade em ratos (Gelderblom *et al.*, 1991). As primeiras citações sobre a detecção de fumonosina B1 no Brasil foram feitas por Meirelles *et al.* (1991). Estudos realizados por Orsi *et al.* (2000) mostraram a ocorrência natural de fumonisinas em 195 amostras de híbridos de milho no Estado de São Paulo, sendo 90,2% delas positivas para fumonosina B1 e 97,4% para fumonosina B2.

## 1.2) RNAi e controle de doenças em plantas

Devido á importância das doenças fúngicas na agricultura, há um grande interesse no desenvolvimento de modernas biotecnologias para obtenção de plantas resistentes. Visando a resistência a estes e outros patógenos em plantas, várias estratégias utilizando engenharia genética têm sido usadas, dentre elas a tecnologia do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) ou RNA interferente (RNAi). No entanto, estas estratégias têm sido muito mais eficientes para vírus, tendo sido primariamente aplicada comercialmente para esses patógenos. A busca por plantas resistentes a vírus levou pesquisadores a acidentalmente descobrir o fenômeno PTGS e a estabelecer modelos de RNAi (Angell & Baulcombe, 1997). A capacidade de manipular técnicas de silenciamento gênico tem produzido plantas transgênicas capazes de suprimir a expressão de genes endógenos e ácidos nucléicos invasores (Souza *et al.*, 2007).

Em 1986 Abel *et al.* demonstraram que plantas podem ser geneticamente transformadas visando à resistência a doenças virais. Um gene quimérico contendo um cDNA clonado do gene da capa proteica (CP) do vírus do mosaico de tabaco (TMV) foi introduzido em células de fumo via *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas regeneradas das células transformadas expressaram o gene CP do TMV. As plântulas que expressaram o gene CP, quando inoculadas com TMV, apresentaram atraso no desenvolvimento dos sintomas e 10% a 60% das plantas não apresentaram sintomas.

Plantas de fumo transgênicas expressando seqüência complementar de RNA (RNA antisense) à proteína da capa proteica do vírus do mosaico de tabaco foram protegidas quando inoculadas com TMV, mostrando que o acúmulo de RNA antisense a seqüência codificante e a região não codificante 3' de genoma TMV foram os responsáveis por esta proteção (Powell *et al.*, 1989).

Embora os experimentos pioneiros tenham mostrado que a presença de RNA virais resultantes da expressão de transgenes tenha sido eficiente para obtenção de plantas resistentes a vírus, os mecanismos envolvidos com a resistência não eram bem compreendidos. Em plantas, outros experimentos envolvendo o silenciamento de genes endógenos ajudaram a começar a elucidar os mecanismos de silenciamento.

O primeiro relato ocorreu em 1990, quanto Napoli *et al.* introduziram o gene da chalcona sintase em petúnia esperando-se que este fosse super expresso e aumentasse a pigmentação nas flores. Inesperadamente, o gene introduzido bloqueou a síntese de antocianina, produzindo flores totalmente brancas. Esse fenômeno foi denominado "co-supressão". Dois anos mais tarde, um fenômeno similar foi observado em *Neurospora crassa* por Romano & Macino (1992). Eles esperavam super expressar o gene albino-1 (*al-1*), envolvido na biossíntese dos

corotenóides que conferem a cor alaranjada ao fungo. Mas ao contrário do esperado, com a introdução de uma cópia extra do gene *al-1* foram observadas colônias exibindo um fenótipo albino. Este fenômeno foi denominado *quelling*.

O termo RNA interferente foi cunhado pela primeira vez em experimentos com *Caenorhabditis elegans* no qual a injeção de RNA dupla fita (dsRNA) induziu o silenciamento gênico pós-transcricional específico. Foi observada uma propagação do silenciamento em uma ampla região do animal após a injeção de dsRNA na cavidade abdominal extracelular (Fire *et al.*, 1998). Outros autores mostraram que o mesmo efeito também ocorre quando o *C. elegans* é alimentado com a bactéria *Escherichia coli* que transcreve o dsRNA recombinante (Timmons & Fire, 1998). O mesmo resultado também é alcançado quando o animal é embebido em preparações contendo RNA dupla fita (dsRNA) (Tabara *et al.*, 1998). Resultados de estudos obtidos *in vivo* e *in vitro* estão agora sendo usados para a engenharia de plantas transgênicas resistentes a nematóides parasitas (Steeves *et al.*, 2006).

Huang *et al.* (2006) silenciaram o gene *16D10* que codifica um peptídeo que ao ser secretado pelas células da glândula esofágica do parasita estimula a infecção da planta pelo nematóide. A ingestão *in vitro* de dsRNA de *16D10* pelo nematóide resultou na diminuição da capacidade de infecção do parasita. E a expressão *in vivo* de dsRNA de *16D10* em *Arabidopsis* resultou na resistência da planta contra quatro espécies de nematóides. No ano seguinte, Fairbairn *et al.* (2007) produziram plantas de fumo expressando diferentes dsRNA do fator de transcrição *MjTiis11* do nematóide causando o silenciamento deste gene quando o parasita se alimenta das raízes das plantas transgênicas. Este gene está envolvido na determinação do destino das células-ovo causando um fenótipo letal em *C. elegans*.

Como já mencionado, a estratégia de RNAi foi primariamente utilizada com sucesso para obtenção de plantas resistentes a vírus. Em 2000, plantas de trigo foram transformadas com uma construção do tipo intron hairpin (hpRNA) com seqüências do gene da polimerase do *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) e as linhagens resultantes foram consideradas imunes pois não houve detecção do vírus por ELISA (Wang *et al.*, 2000).

Na última década o número de exemplos de sucesso têm aumentado expressivamente. A expressão de RNA dupla fita de *AC1* conferiu resistência ao *Cotton leaf curl virus* em fumo transgênico (Asad *et al.*, 2003) e ao *Tomato yellow leaf virus* (TYCV) em tomate transgênico (Yang *et al.*, 2004). A expressão transiente de RNA dupla fita da região conservada de *Vigna mungo yellow mosaic virus* em *Vigna* spp resultou na resistência à infecção viral (Poogin *et al.*, 2003). Bonfim *et al.* (2007) utilizaram uma construção hpRNA para silenciar o gene viral *AC-1* em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para gerar linhagens transgênicas com forte resistência ao *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Esta resistência foi relacionada com silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) através da produção de siRNAs específicos. As plantas de feijoeiro resistentes ao vírus foram testadas no campo por vários anos e deverão se converter na primeira tecnologia comercial intencionalmente feita para expressar um dsRNA (Aragão & Faria, 2009).

A partir de 2003, houve um grande interesse na aplicação do RNAi para fungos patogênicos. A inibição específica da expressão gênica por RNAi tem se mostrado adequado para uma grande variedade de fungos filamentosos fitopatogênicos. Na tabela 02 encontra-se listados espécies fúngicas transformadas geneticamente com RNAi.

**Tabela 02) Fungos filamentosos fitopatogênicos transformados com plasmídeos construídos para expressar dsRNA visando o silenciamento de genes específicos.**

ESPÉCIE	GENE	REFERÊNCIA
<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>eGFP (enhanced green fluorescence protein)</i>	Kadotani <i>et al.</i> , 2003
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>PP2A (type 2A phosphoprotein phosphatae)</i>	Erental <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>RDRPs (RNA-dependent RNA polymerase)</i>	Hammond & Keller, 2005
<i>A. fumigatus</i> ,	<i>cbhB promoter (cellulobiohydrolase)</i>	Bromley <i>et al.</i> , 2006
<i>A. oryzae</i>	<i>brlA e <math>\alpha</math>-amylase</i>	Yamada <i>et al.</i> , 2007
<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>PKS1 (polyketide synthase gene)</i>	Moriwaki <i>et al.</i> , 2007
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	<i>MPG1 (fungal hydrophobin)</i>	Nakayashiki <i>et al.</i> , 2005
<i>Coprinus cinereus</i>	<i>LIM15/DMC1 (recA-like recombinase)</i>	Namekawa <i>et al.</i> , 2005
<i>Fusarium solani</i>	<i>FsFKS1 (1,3-<math>\beta</math>-glucan synthase)</i>	Ha <i>et al.</i> , 2006
<i>Mucor circinelloides</i>	<i>dcl-1 (dicer-like-gene)</i>	Nicolas <i>et al.</i> , 2007

### 1.3) RNA interferente

A maioria dos fenômenos de silenciamento gênico (SG) está relacionada com a atividade de RNA dentro das células. Por este motivo, o termo silenciamento de RNA é frequentemente usado para descrever SG e compreende todos os mecanismos pelos quais seqüências de RNA regulam a expressão gênica (Galun, 2005). Estudos genéticos e bioquímicos confirmam que o mecanismo de RNA interferente, co-supressão e silenciamento induzido por vírus são similares. Além disso, as vias subjacentes de GS induzido por dsRNA existem em muitos, se não em todos, organismos eucarióticos (Hannon, 2002). O estudo de fenômenos similares em organismos diferentes (*Caenorhabditis elegans*, *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* e *Petunia hybrida*) permitiu a proposta de modelos para formas de silenciamento diferentes, mas que se interagem (Souza *et al.*, 2007).

O mecanismo de RNA interferente (RNAi) está envolvido na defesa celular natural contra vírus, confinamento genômico de retrotransposon e regulação pós-transcricional da expressão gênica. RNAi pode silenciar genes específicos e individuais criando fenótipos nocauteados, tanto em transformantes que produzem o grampo de RNA necessário quanto por infecção com RNA recombinante de vírus que carregam o gene alvo. É um processo de muitas etapas que gera pequenos RNAs interferentes (siRNA) *in vivo* através da ação de uma endonuclease RNase III chamada de Dicer a partir da presença de dsRNA no citoplasma que pode variar tanto em tamanho quanto à origem. Os siRNA resultantes, de 21 a 28 nucleotídeos, mediam a degradação do seu RNA complementar (Angaji *et al.*, 2010).

Existem dois tipos de pequenos RNAs na via do RNAi: os pequenos RNAs interferentes (siRNA) e os microRNA (miRNA). As enzimas DICER têm um importante papel na formação dessas moléculas no processo de RNAi e clivam



longos dsRNA em siRNA e miRNA de um modo ATP – dependente (Angoji *et al.*, 2010). Os siRNA são processados por enzimas DICER-*like* (DCL2, DCL3 e DCL4) a partir de um longo RNA dupla fita. Por outro lado, DCL1 processa precursores de miRNA exportados do núcleo (Xei *et al.*, 2004). (Figura 3).

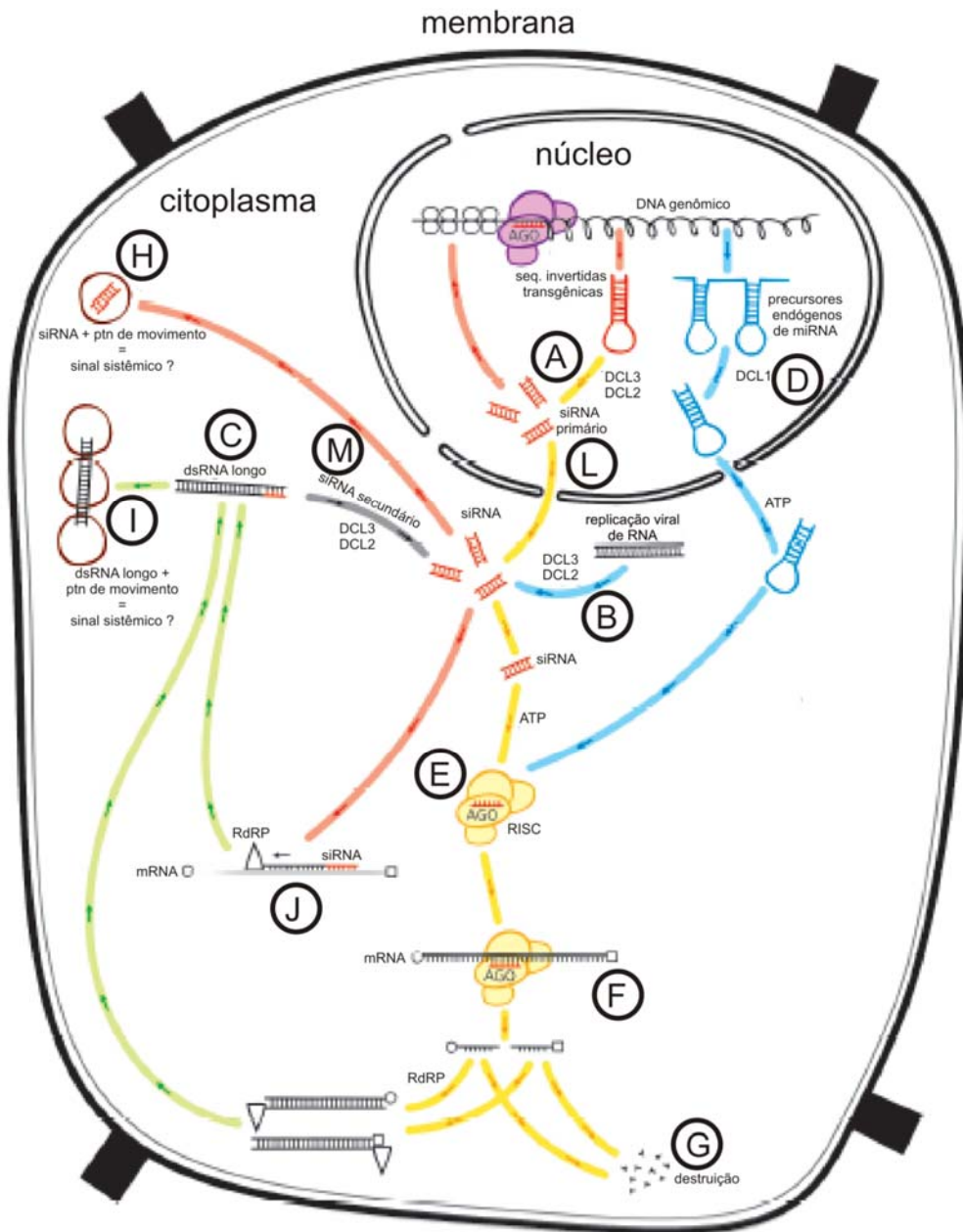
Após processar o dsRNA, os siRNAs são rearranjados no Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) (Hammond *et al.*, 2000). O complexo RISC foi originalmente identificado pelo fracionamento de uma nuclease específica de extrato *Drosophyla melanogaster* (Hammond *et al.*, 2001). Embora a composição de RISC não seja totalmente conhecida, sabe-se que este complexo inclui um membro da família Argonauta e uma fita guia (antisense para o RNA alvo) de um pequeno RNA. O complexo RISC é responsável pelo direcionamento e clivagem da seqüência específica de RNA dentro da célula (Martinez & Tuschul, 2004) e age clivando o mRNA alvo no meio da região complementar, 10 nucleotídeos *upstream* do resíduo 5' do siRNA/mRNA alvo dupla fita. Uma helicase do complexo RISC desenrola o siRNA duplex, que se pareia com a fita antisense do RNA mensageiro que têm um alto grau de complementaridade de seqüência com o siRNA. Por fim, uma proteína da família Argonauta do complexo RISC (freqüentemente referida como Slicer), provavelmente age como uma endonuclease clivando o mRNA alvo (Souza *et al.*, 2007). Esta clivagem leva ao silenciamento do mRNA alvo pelo bloqueio da leitura da mensagem pela maquinaria de tradução, resultando na destruição do mRNA (Tolia & Joshua-Tor, 2006). siRNAs exógenos sintéticos também podem ser incorporados ao RISC, ultrapassando assim a exigência de dsRNA ser processado por DICER e siRNAs podem ser incorporados ao RISC (Stevenson *et al.*, 2007).

Estudos recentes classificam os siRNAs em primários e secundários. Os siRNAs primários são gerados da atividade da enzima DICER, enquanto os siRNAs secundários seriam gerados por uma via diferente com o envolvimento de uma

RNA polimerase dependente (Pak & Fire, 2007). siRNAs secundários aparentemente regulam a expressão gênica no casos em que a amplificação do sinal de silenciamento é importante e o iniciador original para o desencadeamento do RNAi está ausente. Estudos comuns de SG resultantes de transformação de plantas propõem que nestes casos SG é causado pela interação de múltiplos transgenes com repetição invertida que levam a formação de dsRNA (Souza *et al.*, 2007).

MicroRNA são RNA endógenos que tem um papel regulatório importante em animais e plantas por clivagem ou por repressão da tradução do mRNA. Estas moléculas compreendem uma das classes mais abundantes de moléculas regulatórias em organismos multicelulares (Bartel, 2004). Em plantas, miRNAs estão envolvidos no controle do desenvolvimento de folhas e flores (Aukerman & Sakai, 2003).

Para a formação do microRNA primário, um transcrito de um micro-RNA primário (pré-miRNA) sintetizado a partir de introns de RNA codificante da enzima polimerase II, é processado por um complexo protéico contendo uma ribonuclease específica para dupla fita no núcleo para produzir um *hairpin* intermediário de 70 nucleotídeos. Este pré-miRNA, então, é transportado para o citoplasma onde é clivado por outra ribonuclease dsRNA específica, a DICER, em miRNA duplex. Após a separação das fitas do duplex, o miRNA fita simples é incorporado ao RISC. Este complexo inibe a tradução ou induz a degradação de mRNA alvo (Angoji *et al.*, 2010). As vias de silenciamento supra citadas estão ilustradas na Figura 3.



**Figura 3) Vias de silenciamento em células vegetais.** (A) Proteínas-tipo-Dicer (DCL2 e DCL3) processando transcritos contendo seqüências invertidas. (B) Proteína-tipo-Dicer (DCL1) processando intermediários formados durante a replicação de RNA viral. (C) dsRNA longo. (D) Proteína-tipo-Dicer (DCL1) processando precursores de miRNA. (E) Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC). (F) Clivagem da seqüência alvo específica do mRNA por RISC. (G) Destruição do mRNA após o processamento por RISC. (H) Possível silenciamento sistêmico composto por siRNA + proteínas de movimento siRNA primário. (I) Possível silenciamento sistêmico composto por dsRNA longos + proteínas de movimento siRNA primário. (J) Amplificação de *primer* depende de RdRP. (L) siRNA primário. (M) siRNA secundário processado por Dicer (DCL2 e DCL3). (Adaptado de Souza *et al.*, 2007)

#### 1.4) Propagação do sinal de silenciamento

O movimento de RNA extrapola o conceito de que RNAs funcionam apenas no interior das células em que são produzidos, e abre uma nova fronteira na biologia de plantas (Ding & Wang, 2009). Em plantas vascularizadas, o movimento dos pequenos RNA (smRNA) ocorre entre células e também sistematicamente em toda a planta (Haywood *et al.*, 2002; Klahre *et al.*, 2002; Voinnet & Baulcombe, 1997).

O movimento intercelular e sistêmico ocorre via plasmodesmata, que dão a continuidade do citoplasma e retículo endoplasmático entre células adjacentes, e no floema. Plasmodesmata são importantes reguladores do movimento intercelular e a longas distâncias. Normalmente os canais dos plasmodesmata são estreitos e permitem o movimento passivo de pequenas moléculas, enquanto as macromoléculas, como proteínas e ácidos nucléicos não poderiam passar pelos canais. Entretanto, determinadas proteínas interagem com os plasmodesmata para aumentar o tamanho do limite de exclusão e permitir que macromoléculas passem através dos canais (Roney *et al.*, 2007). Plantas têm essas proteínas de movimento chamadas proteína não autônomas que mediam o movimento de mRNA endógenos de célula para célula (Lucas *et al.*, 2001).

Em 1996, Palauqui *et al.*, sugeriram a propagação do sinal de silenciamento por toda a planta quando observaram a co-supressão da enzima nitrito redutase durante o desenvolvimento da planta. No ano seguinte, o mesmo grupo desenvolveu um sistema artificial e eficiente, usando plantas enxertadas, visando elucidar o mecanismo pelo qual a co-supressão percorre pela planta. Foi demonstrado que o silenciamento pós-transcricional do transgene *70-uidA* (*gus*) pode ser transmitido de um cavalo silenciado para um enxerto não silenciado. Após o silenciamento ser iniciado em poucas células, o sinal percorre através do sistema vascular e induz o silenciamento sistêmico inclusive atravessando tecidos

que não expressam a seqüência homóloga (Palauqui *et al.*, 1997). No mesmo ano Voinnet & Baulcome (1997) infiltraram folhas de *Nicotiana benthamiana* com *Agrobacterium tumefaciens* contendo o gene repórter *gfp*. Dois dias após a infiltração foi observada na borda da região expressando o gene *gfp* uma linha fina de tecido na qual a fluorescência do GFP estava ausente, indicando que a expressão do transgene GFP havia sido silenciada. Buhtz *et al.* (2008) analisaram o exsudado vascular de *Brassica napus* e observaram que a seiva do floema contém um grande número de pequenos RNA (chamados aqui de smRNAs), predominantemente, de 21 e 24 nucleotídeos.

São reconhecidos ao menos três mecanismos diferentes de propagação do sinal de silenciamento, um para propagação de curto alcance e outro para propagação de longo alcance, além do mecanismo para a propagação sistêmica. Existem evidências indiretas que a propagação de curto alcance do sinal de silenciamento acontece através do plasmodesmata. Esta evidência vem do fato que durante a propagação de curto alcance, as únicas células onde não houve silenciamento foram as células guarda dos estômatos que durante o desenvolvimento são isoladas devido ao bloqueio desses canais específicos (Kalantidis *et al.*, 2008). Análises recentes da propagação do silenciamento em embriões de *Arabidopsis* revelaram que a capacidade do sinal de curto alcance se propagar é influenciada pelo tamanho da abertura dos plasmodesmata presente no tecido específico onde a propagação irá ocorrer (Kobayashi & Zambryski, 2007). O silenciamento de curta amplificação de seqüências transgênicas não alcança mais que 10-15 células em torno da célula de origem do silenciamento (Palauqui & Balzergue 1999).

Foi mostrado que genes endógenos são protegidos da capacidade de amplificação pelas enzimas RDR (*RNA-directed RNA-polymerase*) e, como resultado, a propagação do silenciamento não pode usar um mecanismo de retransmissão do sinal. Em *Arabidopsis rdr6*-mutantes nulos, a propagação do

silenciamento se limitou a 10-15 células em torno da célula fonte do silenciamento (Himber *et al.*, 2003) e o mesmo resultado foi mostrado por Schwach *et al.* (2005) em *N. benthamiana* com o gene endógeno *RDR6* nocauteado.

Quando a amplificação do sinal de silenciamento excede as 15 células alcançadas pela amplificação de curto alcance, esta é chamada de amplificação do sinal de silenciamento de longo alcance. Um exemplo deste tipo de silenciamento é caracterizado quando as células de folhas de plantas transgênicas recebem o sinal de silenciamento para suprimir a expressão do transgene: o sinal de silenciamento chega através da nervura e se expande por toda a lâmina da folha. Este tipo de amplificação foi descrita apenas para transcritos transgênicos (Donoyer *et al.*, 2007) e evidências indicam que é mediada pela atividade de *RDR6* pois em *rd6* mutantes esta amplificação não acontece nos transgenes (Schwach *et al.*, 2005).

O silenciamento em plantas tem a capacidade de se espalhar sistematicamente por toda a planta e não é uma amplificação progressiva célula a célula. Após o silenciamento ser iniciado em poucas células, o sinal do silenciamento percorre através do sistema vascular e induz o silenciamento sistêmico. Este mecanismo foi mostrado pela primeira vez em experimentos com enxertos em plantas de *Nicotiana* onde o movimento do sinal passou por tecidos que não expressavam a sequência homóloga (Palauqui *et al.*, 1997). Acredita-se que o silenciamento sistêmico envolve uma molécula de RNA com especificidades, mas ainda não se sabe quais são estas características. Existe um grande interesse de entender o movimento sistêmico de viróides visto que estas partículas subvirais não codificam qualquer proteína e, entretanto, para o seu ciclo biológico, incluindo a propagação sistêmica, dependem de fatores relacionados ao hospedeiro (Ding *et al.*, 2005).

Estudos prévios revelaram que o silenciamento de RNA não é um evento celular não autônomo (Wilson *et al.*, 2002), mas até o momento muitas questões aguardam respostas, por exemplo: que tipo de molécula de RNA atua como molécula móvel na propagação do sinal do silenciamento? (Mlotshwa *et al.*, 2002) Como o sinal do silenciamento é regulado? (Ming *et al.*, 2006). Tomilov *et al.* (2008) formularam algumas hipóteses para estas perguntas. Para este grupo de pesquisadores as moléculas envolvidas na amplificação do silenciamento poderiam ser os pequenos dsRNA produzidos pela ação de enzimas Dicer que clivam as regiões de dupla fita do grampo de RNA. Ou ainda o hpRNA transcrito se desloque como um mRNA intacto e então seriam clivados em siRNA. Tentando elucidar estes questionamentos Dunoyer *et al.* (2010), realizaram um elegante experimento utilizando imunoprecipitação. Os siRNA dupla fita foram imunomarcados tendo assim o movimento entre as células da planta acompanhado. Concluíram que os siRNA agem como sinal de silenciamento entre as células da planta e possivelmente até mesmo por longas distancias. Apesar da exata forma da molécula móvel (isto é, proteína ligada *versus* molécula livre) ainda não estar totalmente elucidada, são os siRNA dupla fita os prováveis envolvidos nesta mobilidade, ao contrário dos siRNA fita simples. Isso ocorre provavelmente porque os siRNA de fita simples podem já estar associados a AGO, o que pode tornar mais difícil sua passagem de célula a célula.

### 1.5) Silenciamento *in trans*

Waterhouse *et al.* (1998) observaram o movimento do sinal de silenciamento quando, em nematóides, o silenciamento de genes foi desencadeado por uma dieta composta de plantas transgênicas modificadas para expressar dsRNA. O mesmo fenômeno foi observado em insetos herbívoros alimentados com uma planta geneticamente modificada para expressar dsRNAs de um gene vital dos insetos (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007).

Ainda em 2007, Roney e colaboradores constataram o movimento sistêmico de mRNA transitando através do floema entre tomate e cuscuta, (*Cuscuta pentagona* Engelm.). Cuscutas são plantas parasitas obrigatórias que têm ligações físicas com seus hospedeiros devido à sua habilidade fotossintética limitada e dependência de água e outros nutrientes. No ponto de contato com o hospedeiro cuscuta produz um haustório, um órgão especializado que penetra no tecido do hospedeiro formando conexões com o tecido vascular. Além das conexões vasculares diretas cuscuta tem uma continuidade citoplasmática com o seu hospedeiro através de plasmodesmata. Apesar de já se saber que vírus se movem entre cuscuta e suas plantas hospedeiras a translocação de mRNA endógeno ainda não havia sido observada.

Experimentos descritos por Tomilov *et al.* (2008) demonstraram que plantas hospedeiras transformadas com construções para gerar grampos de interferência podem silenciar a expressão do gene alvo planta parasita. Raízes transgênicas da planta parasita *Triphysaria versicolor* expressando o gene repórter *gus* parasitou raízes transgênicas de alface expressando o grampo de RNA contendo um fragmento do gene *gus* (hpGUS). Raízes de *Triphysaria* ligadas à alface não transgênicas mostraram alta atividade de GUS, mas aquelas que parasitavam alface contendo hpGUS perderam a atividade em tecidos da raízes mesmo distantes do haustório, demonstrando que o sinal de silenciamento de GUS gerado pelas raízes hospedeiras foi translocado pelo haustório e foi funcional no parasita. Além disso, o movimento pelo haustório foi bi-direcional, isto é, pode-se mover do parasita para o hospedeiro. Isso foi demonstrado em um experimento de dupla junção, no qual *Triphysaria* não transgênica parasitou ao mesmo tempo duas plantas hospedeiras, uma transgênica com hpGUS e outra transgênica com o gene *gus* funcional, atuando como uma ponte fisiológica. A atividade GUS foi reduzida ou eliminada perto da junção com o haustório nas raízes da planta de alface transformada para expressar *gus*.



Aly *et al.* (2009) mostraram que uma construção contendo o vetor binário pBIN-IR-M6PR inserido em plantas de tomate pode silenciar a expressão do gene M6PR em tubérculos de *Orobanche* parasitando as raízes transgênicas. Este vetor é capaz de induzir o silenciamento da manose 6-fosfato redutase, uma enzima chave na biosíntese de manitol um metabólito cujo acúmulo é criticamente importante para o desenvolvimento do parasita. Dessa forma foi possível obter plantas de tomate resistentes ao parasitismo por *Orobanche*.

A observação que moléculas responsáveis pelo silenciamento produzidas no hospedeiro são funcionais no parasita sugere uma nova estratégia para a engenharia de plantas resistentes a parasitas. Uma vez que genes codificando proteínas indispensáveis para o crescimento do parasita forem identificados, a seqüência específica do parasita pode ser clonada em vetores do tipo *hairpin* e inserida por transformação genética em plantas.

## 2) OBJETIVO

---

O principal objetivo deste trabalho é confirmar a nossa hipótese de que o sinal de silenciamento primariamente produzido por plantas de fumo re-transformadas para silenciar o gene *gus* é capaz de passar para as células de *F. verticillioides* que interagem com as células da planta silenciando especificamente a expressão do gene *gus* no fungo.

## 3) MATERIAL E MÉTODOS

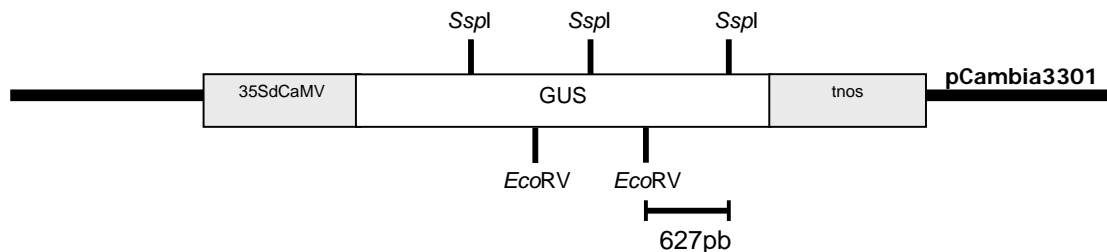
---

### 3.1) Construção do vetor e transformação das plantas

Plantas de fumo (cv. Xanthi), foram transformadas pelo sistema *Agrobacterium* como descrito por Horch *et al.* (1985) com o vetor pBI121 (Clontech) para expressar o gene *gus*. As linhagens transgênicas com alto nível de expressão do

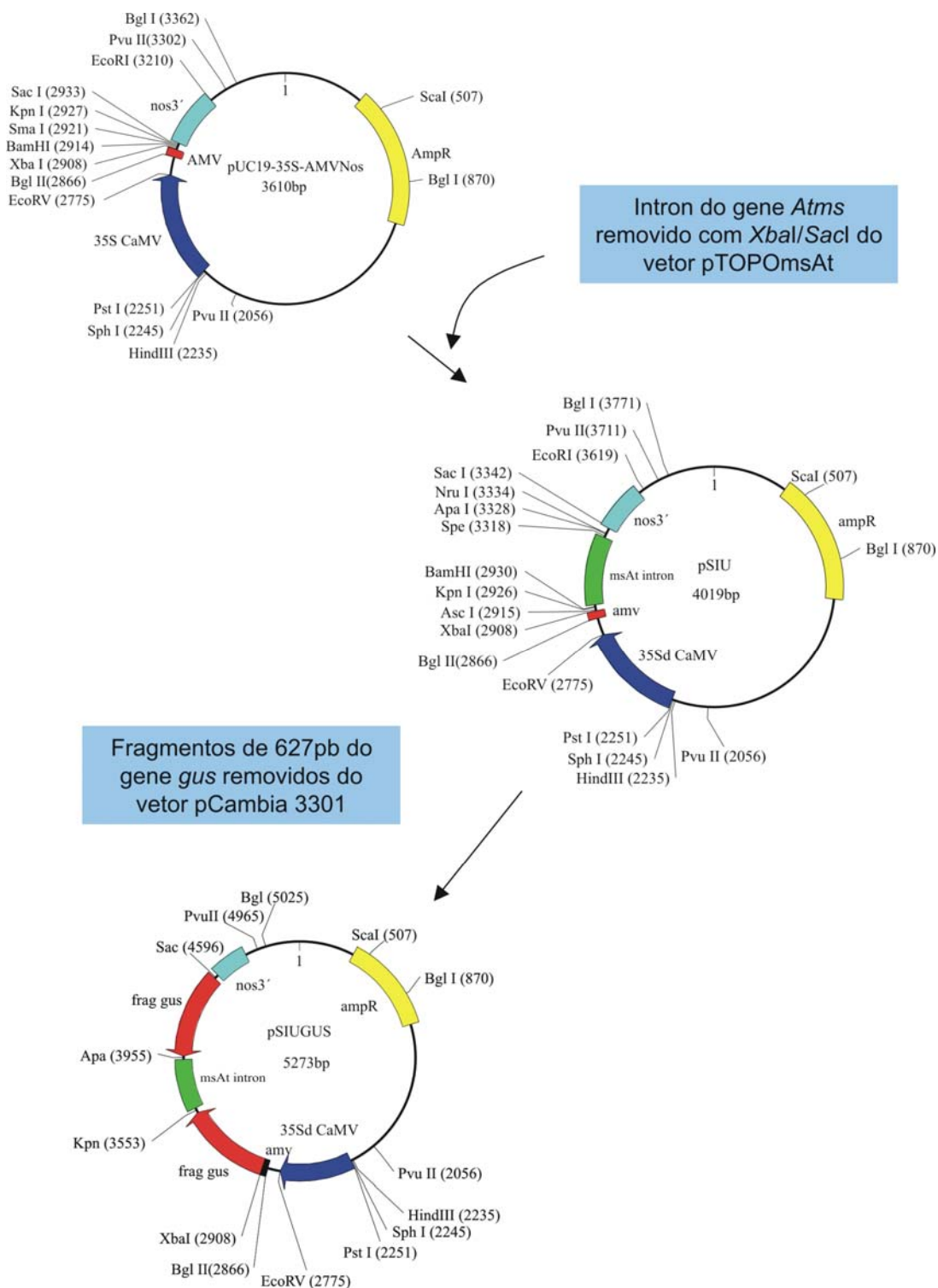
gene *gus* foram re-transformadas também via *Agrobacterium* com o vetor pC1302GUSi (Figura 6), um vetor gerado a partir do vetor pSIUGUSi, um vetor RNAi construído para promover o silenciamento do gene *gus* em linhagens re-transformadas. Para construir o pC1302GUSi, o intron 3 do gene da malato sintase de *Arabidopsis thaliana* (ms-i3; GenBank No. AB005235) foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico, utilizando *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e *primers* específicos (5'-CTCTAGAGGCGCGCCGGTACCCCGGATCCATCAGCCTGTTCAAA-3 e 5'-TGAGCTCTCGCGATGGGGCCCACTAGTTTTATGGTCCATTTTC-3'), gerando sítios de restrição *Xba*I, *Asc*I, *Kpn*I, *Bam*HI e *Spe*I, *Apa*I, *Nru*I, *Sac*I, respectivamente. O fragmento de 438-pb foi clonado em pCR2.1-TOPO (Invitrogen) e seqüenciado. O fragmento MS-i3 foi então removido com *Sac*I e *Xba*I e inserido no vetor pUC19-35SAMVNOS (Dias *et al.*, 2006) para gerar o vetor pSIU (Figura 5).

Um fragmento de 627-pb da seqüência codificante onde no gene do gene *gus* foi removida com *Ssp*I e *Eco*RV do vetor pCambia3301 (Cambia, Austrália) e clonado no sítio de *Sma*I da pBlueScript KS+ (Fermentas).

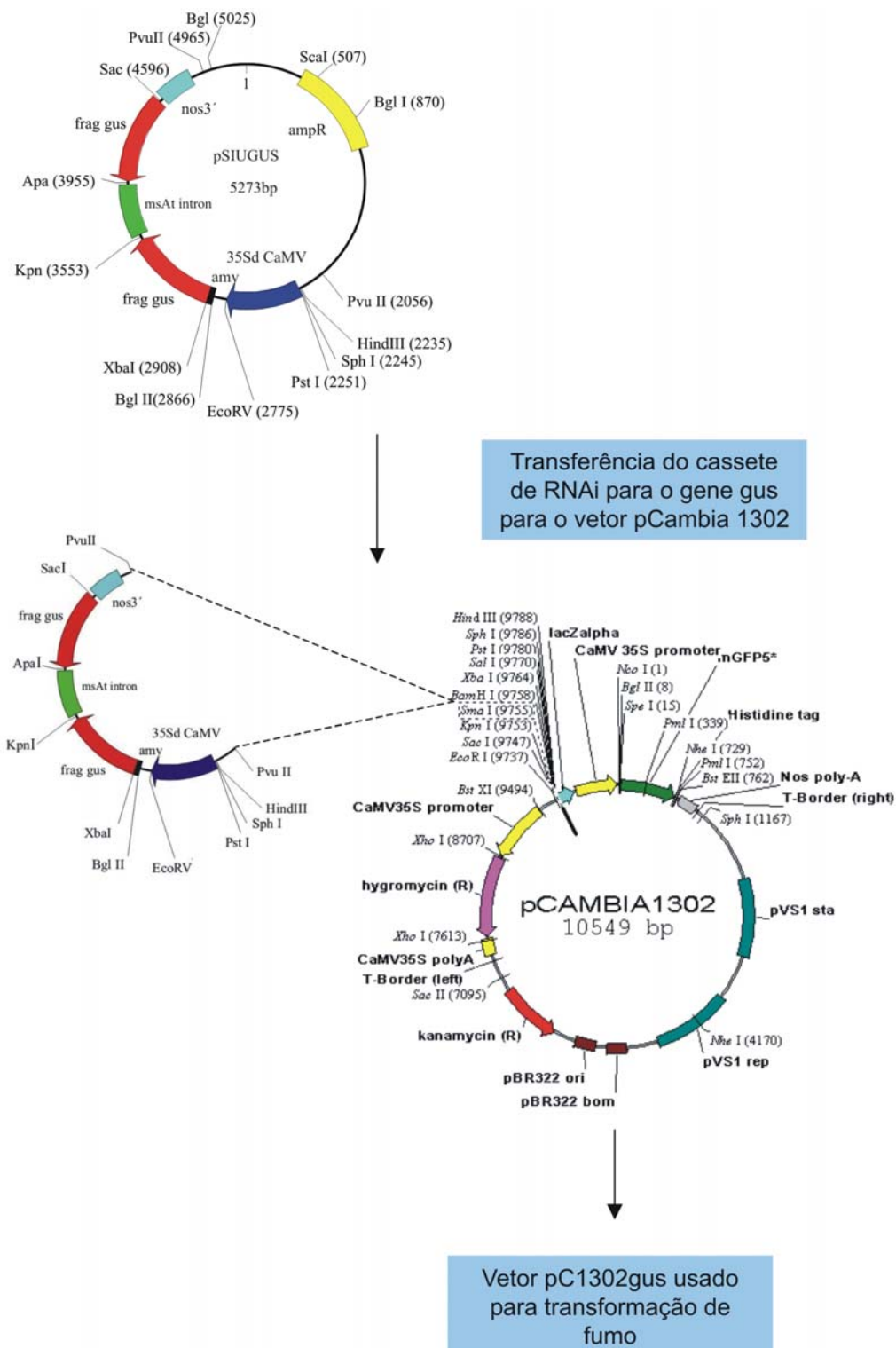


**Figura 4)** Fragmento de 627pb retirado do vetor pCambia3301 com *Ssp*I e *Eco*RV para gerar fragmentos no sentido sense e antisense na construção do vetor pSIUGUSi.

O fragmento do gene *gus* foi finalmente clonado nos sítios de *Nru*I/*Kpn*I e *Xba*I do vetor pSIU para gerar fragmentos em sentido sense e antisense, flanqueando o intron 3 do gene da malato sintase de *Arabidopsis thaliana* (GenBank No. AB005235) gerando o vetor pSIUGUSi. O cassete de interferência do gene *gus* (hpGUS) foi removido com *Pvu*II e clonado no sítio de *Sma*I do vetor pCambia1302 (Cambia, Austrália), gerando o vetor pC1302GUSi (Figura 6).



**Figura 5) Estratégia para a construção do vetor pSIUGUSgusi.** O intron ms-i3 foi removido do vetor pTOPOmsAt com *XbaI* e *SacI* e clonado no vetor pUC19-35S-AMVNos originando o vetor pSIU onde fragmentos de 627 pb do gene *gus* removidos do vetor pCAMBIA 3301 foram clonados nos sítios *NruI* e *KpnI* / *XbaI* gerando o vetor pSIUGus.



**Figura 6) Estratégia para a construção do vetor pC1302gusi.** O cassete de interferência para o gene *gus* foi retirado do vetor PSIUGus com a enzima *PvuII* e clonado no sítio de *SmaI* do *polylinker* do plasmídeo pCAMBIA1302 resultando no vetor de transformação pC1302gusi.

Análises de PCR foram realizadas para detectar o gene *gus* primário e o cassete de silenciamento nas linhagens de transformação e re-transformadas. O par de primers GUS251 (5'-TTGGGCAGGCCAGCGATACGT-3') e GUS671 (5'-ATAACGCAGTTCAACGCTGAC-3') foi usado para amplificar 420 bp da seqüência codificante do gene *gus* e o par de primers GUSF (5'-TCAGGAAGTGATGGAGCATCAGG-3') e MSIR (5'-TAGTTGGTCTGGCAGGCTAGT-3') foi utilizado para amplificar 627 bp do intron do vetor hpRNA (pC1302GUSi). Amplificações de PCR foram realizadas com 0,4 mM de primer, 250 mM dNTP's, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 U Taq DNA polimerase (5 U / mL) e cerca de 20 ng de DNA genômico. A mistura foi desnaturada a 95 ° C por 5 min, seguido por 36 ciclos de desnaturação a 95 ° C por 1 min, anelamento de primers a 55 ° C por 1 min e extensão a 72 ° C por 1 min e uma extensão final a 72 ° C por 5 min.

### 3.2) *Fusarium* transgênico

O fungo *F. verticillioides* linhagem S68 (mutante *nia*<sup>-</sup>) foi previamente co-transformada com os vetores pNOM102 contendo o gene *gus* sob controle do promotor GPD de *A. nidulans* e pNH24 contendo o gene da enzima nitrato redutase de *F. oxysporum* (*nia*) (Pamphile *et al.*, 2004). A linhagem TG8 exibindo o fenótipo *nia*<sup>+</sup> conferidos pelo vetor pNH24 foi selecionado em meio de cultura MM contendo nitrato como única fonte de nitrogênio e purificados através do isolamento de conídios de acordo com técnicas padrão. Apenas colônias que contem o vetor pNH24 (*nia*<sup>+</sup>) são capazes de crescer em meio MM.

### 3.3) Inoculação de plantas transgênicas com *Fusarium gus*<sup>+</sup>

Uma linhagem transgênica de *F. verticillioides* expressando o gene *gus* foi selecionada por análise histoquímica para inocular as linhagens de fumo re-transformadas e não transformadas. A expressão do gene *gus* foi demonstrada

por ensaio histoquímico. O fungo foi cultivado em meio MM (Pamphile *et al.*, 2004) a 26 ° C. A inoculação foi realizada de acordo com Dias *et al.* (2006). Um disco de micélio de 3 mm de diâmetro foi cortado a partir das margens de crescimento de cultura de 6 dias de *F. verticillioides* e aplicados na superfície adaxial de uma folha destacadas com 6 semanas de idade (n = 12 por linhagem ; repetido duas vezes). Depois de 11 dias a 26 ° C e em 90-100% de umidade relativa, o disco de micélio foi removido e as folhas, contendo estruturas de penetração e absorção do fungo que permaneceram aderidas à sua superfície, foram submetidas a uma análise para detecção da expressão do gene *gus*.

Colônias fúngicas foram re-isoladas das linhagens re-transformadas e não transformadas de fumo. Pequenas porções de micélio foram removidas sob estereomicroscópio e cultivadas em meio MM (como descrito acima) para chegar a 70-80% de confluência de 8 passagens. Ensaio histoquímico e fluorimétrico foram realizados em cada passagem. A atividade qualitativa da  $\beta$ -glucuronidase foi realizada de acordo com Couteaudier *et al.* (1993) usando 4-metil  $\beta$  umbeliferyl-D-glicuronídeo como substrato. Fluorescência foi medida em um Minifluorimeter TKO100 (Hoefer, San Francisco, CA) a 365nm. O teor de proteínas foi determinado utilizando um kit de teste de proteína (BioRad).

#### 3.4) Ensaio histoquímico e microscopia eletrônica de varredura

O ensaio histoquímico GUS foi realizado conforme descrito por Jefferson *et al.* (1987). Explantes foram examinados usando um estereomicroscópio Zeiss Axiophot e fotografado usando sistema de câmera digital AxioCam ICC3 com uma lente de alta resolução. Explantes também foram examinados usando um microscópio de varredura. Para microscopia eletrônica de varredura, as folhas foram fixadas em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,2 contendo 0,5% de glutaldeído e 2% de paraformaldeído por 15 horas a 4 ° C e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 h. Após a lavagem no mesmo tampão, as amostras

foram desidratadas em uma série de etanol, dessecadas no ponto crítico com CO<sub>2</sub>, metalizados com uma fina camada de ouro e observadas sob microscópio eletrônico SEM Zeiss DSM 962 a 15 kV.

### 3.5) Análise por RT-PCR

Células de micélio foram utilizadas para a extração de RNA total utilizando *Micro-to-Midi Total RNA Purification System* (Invitrogen), conforme recomendado pelo fabricante. O RNA total (400 ng) foi utilizado para a produção de cDNA usando a transcriptase reversa *Superscript III* (Invitrogen), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. PCR foram realizadas conforme descrito (Abreu & Aragão, 2007), exceto que 20 ng de DNA foram usados como um molde, em reações com 32 ciclos de amplificação. O número de ciclos de amplificação foi previamente otimizado, a fim de interromper a reação na fase exponencial, garantindo que a amplificação fosse semi-quantitativa. Os *primers* 5'-ATCACGCAGTTCAACGCTGAC-3' (GUS 671) e 5'-TTGGGCAGGCCAGCGTATCGT-3' (GUS 251) foram utilizados para amplificar um fragmento de 420 pb do gene *gus*. Como um controle interno, primers 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' (ITS5) e 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (ITS4) foram utilizados para amplificar um fragmento do gene endógeno de expressão constitutiva 5.8S rRNA. PCR com RNA total não apresentaram fragmentos amplificados. Os experimentos foram repetidos três vezes.

### 3.6) Análise de RNAi

O RNA total dos micélios dos fungos cultivados em meio líquido MM estático durante 14 dias a 26 ° C e das folhas de fumo. Foi extraído com Trizol (Invitrogen) conforme recomendado pelo fabricante. A análise de siRNA foi realizada de acordo com Bonfim *et al.* (2007). 50 µg do RNA total foi separado por gel de acrilamida 20% contendo 7 M de uréia e Tris-borato-EDTA (TBE) 1x. O

gel foi corado em TBE 1x contendo brometo de etídeo (0.5 µg/mL) e fotografado para verificar o padrão do RNA por visualização de tRNAs e rRNA 5S (Figura 5D). O RNA foi transferido para uma membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Bucking-hamshire, U.K.) e fixados na luz UV. RNAs foram hibridizados com uma sonda de DNA correspondente ao fragmento de 627-pb do gene *gus*, retirados com *EcoRV* e *SspI* do vetor pCambia2301. As sondas foram marcadas com α<sup>32</sup>P dCTP usando um *primer* do DNA Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. Três oligômeros (18, 24 e 38 nucleotídeos) foram utilizados como marcadores de tamanho molecular. Uma seqüência GUS contendo 21 nucleotídeos foi utilizada como controle positivo.

### 3.7) *Southern blot*

O DNA genômico das linhagens de *Fusarium* foi isolado como previamente descrito por Chow & Kafer (1993). *Southern blotting* foi realizado conforme descrito (Sambrook & Russell, 2001). DNA genômico (20 µg) foi digerido com *SphI*, separados em um gel de agarose 1%, e transferido para uma membrana de nylon (Hybond-N +, Amersham Pharmacia Biotech). Hibridizações foram realizadas utilizando um fragmento de 420-pb do gene *gus* amplificado por PCR, marcado com α<sup>32</sup>P dCTP (3000 Ci mol<sup>-1</sup>) utilizando um random-primer DNA Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. As bandas foram visualizadas com um analisador de imagem fluorescente (FLA-3000) (FUJIFILM).

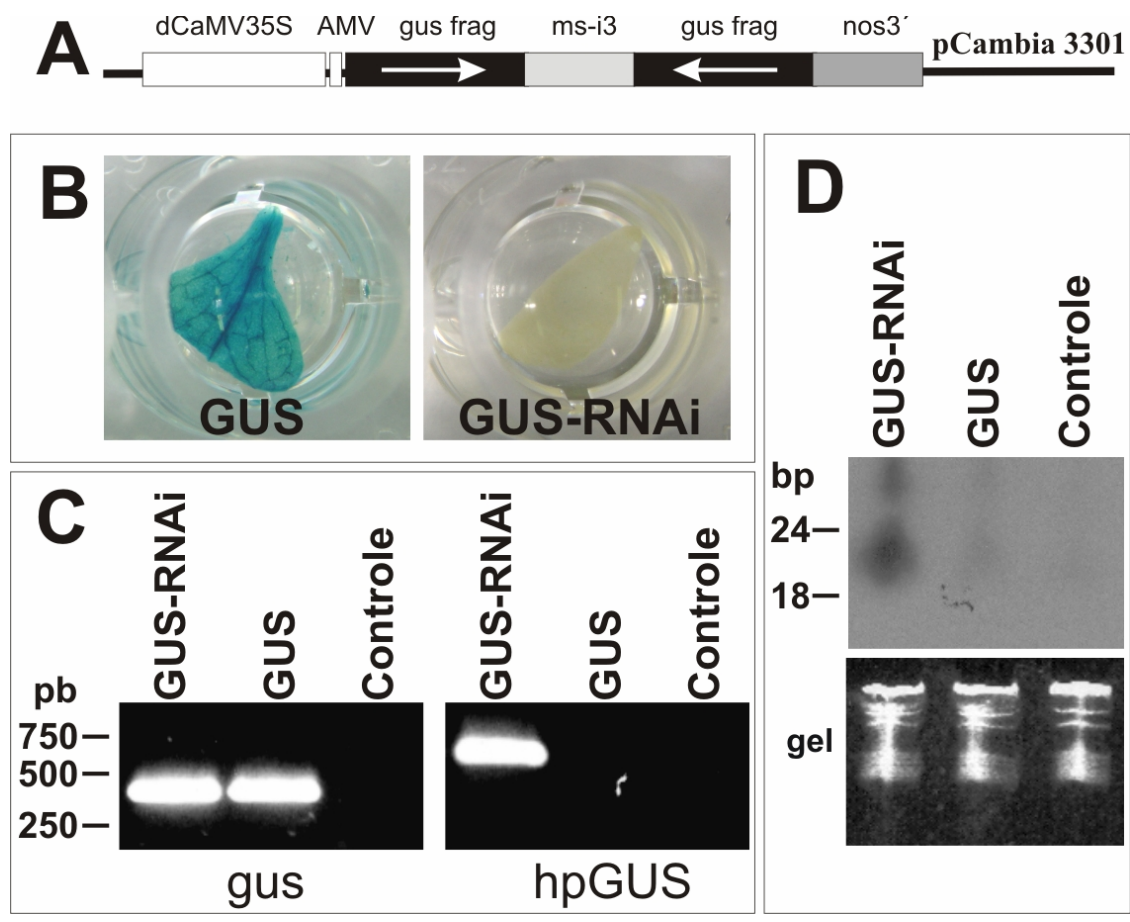


#### 4) RESULTADO E DISCUSSÃO

---

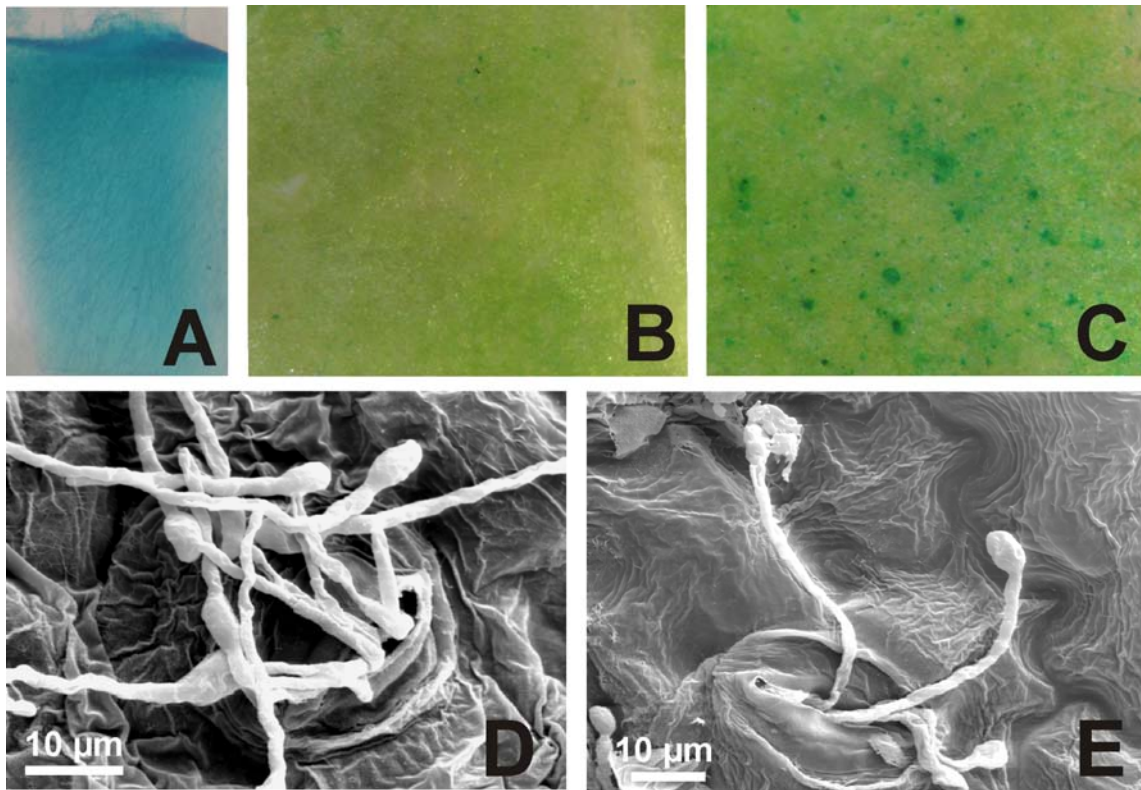
Neste trabalho, foi mostrado que uma planta expressando dsRNA pode resultar na trans-supressão específica *in vivo* do gene alvo correspondente nas células fúngicas associadas aos tecidos vegetais. As plantas de fumo expressando o gene *gus* foram re-transformadas com uma construção RNAi (Figura 7A). Não foi observada expressão do gene *gus* nas folhas das linhagens re-transformadas (Figura 7B) e não foram observadas diferenças significativas fenotípicas nas linhagens transgênicas de fumo, quando comparado com o tipo selvagem. A presença de ambos os transgenes na linhagem re-transformada foi confirmada por PCR (Figura 7C). Os siRNAs foram detectados por Northern blot em linhagens de fumo transgênicas apresentando bandas do tamanho esperado somente nas linhagens GUS-RNAi (Figura 7D).

---



**Figura 7) Interferência genética após a inoculação do fungo *Fusarium verticillioides* expressando siRNA em planta de fumo.** (A) Esquema geral do vetor PC1302GUSi construído para promover silenciamento do gene *gus* em linhagens de fumo transformada GUS +. Um fragmento de 627-bp do gene *gus* (*gus frag*) foi clonado para gerar fragmentos nos sentidos sense e antisense, flanqueando o gene intron 3 malato sintase de *Arabidopsis thaliana* (MS-i3). (B) Uma linhagem de fumo expressando GUS (GUS +) foi re-transformada com ppC1302GUSi e não foi observada expressão do gene *gus* nas plantas regeneradas (GUS-RNAi). (C) Plantas transgênicas foram analisadas por PCR para detectar ambos os genes *gus* em plantas transformadas (GUS +) e o cassete de interferência do gene *gus* (hpGUS) na linhagem re-transformada (GUS-RNAi). (D) Detecção dos pequenos RNAs interferentes em plantas expressando GUS, em plantas GUS-RNAi e no controle. O controle é uma planta não-transformada. O marcador de tamanho molecular está indicado à esquerda nas figuras C e D.

Discos de micélios contendo *F. verticillioides* foram inoculados na superfície adaxial de folhas destacadas de plantas *in vitro* (n = 12 por linhagem; repetido duas vezes). Após 11 dias os discos de micélios foram removidos e as folhas contendo estruturas de penetração do fungo que permaneceram aderidas à superfície das folhas foram analisados para a expressão do gene *gus*. Quando o *F. verticillioides* expressando o transgene *gus* foi inoculada em folhas de linhagens re-transformadas de fumo, expressando dsRNA correspondente ao gene *gus*, nenhuma expressão de *gus* foi observada nas estruturas do fungo, como observado pelo ensaio de expressão de GUS (Figura 8B). Foi observada uma coloração uniforme azul escuro apenas nos esporos que estavam germinando que não interagiram diretamente com as células vegetais. As folhas de fumo não-transgênicas foram incapazes de provocar um silenciamento evidente do gene *gus* nas estruturas de fungo transformadas (Figura 8C). Após o ensaio de GUS, as superfícies foliares foram observadas em microscópio eletrônico de varredura. A análise revelou que apenas esporos germinando permaneceram nas superfícies foliares (Figuras 8D-E). Quase todos os esporos observados estavam penetrando nos estômatos das folhas. Estes fenótipos indicam que o sinal de silenciamento foi translocado das células vegetais através dos esporos germinados pra as células fúngicas.



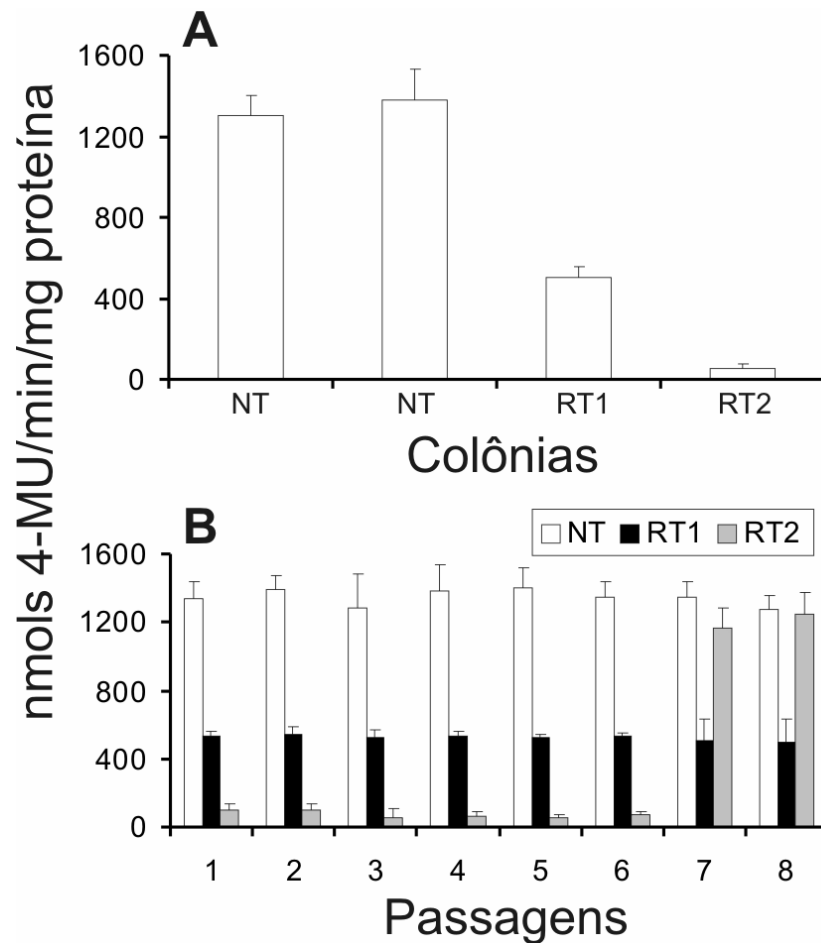
**Figura 8) Inoculação de linhagens de plantas re-transformadas para expressar um RNA fita-dupla para silenciar o gene *gus* com *F. verticillioides* expressando Gus (A) Células de micélio exibindo expressão do gene *gus* estável foram utilizadas para a inoculação das folhas da planta (B) Ensaio histoquímico GUS realizado com folha de tabaco re-transformada e inoculada com o fungo GUS+. Micélios interagindo com a planta re-transformada não mostraram expressão de GUS. Somente poucos esporos que estavam germinando apresentaram expressão de GUS. (C) Ensaio histoquímico GUS com as folhas de fumo não-transformadas inoculado com fungo GUS+. Após o ensaio de GUS, superfícies foliares (apresentada em B e C) foram observadas em microscópio eletrônico de varredura para observar esporos germinando e penetrando nos estômatos (D e E).**

Esse tipo de interação estabelece uma relação com a célula viva da planta hospedeira, permitindo a absorção de nutrientes e captação de moléculas de dsRNA/siRNA de seu hospedeiro. Este modo de colonização das plantas foi observado nos estágios iniciais de *F. verticillioides* interagindo com milho que foram caracterizados usando a expressão de GFP em isolados de fungos transgênicos. Foram encontrados conídios apenas no interior de uma célula na qual uma infecção foi estabelecida, enquanto que as células ao redor pareciam normais (Oren *et al.*, 2003).

Neste trabalho, foi demonstrado o silenciamento de um transgene pela interação de células fúngicas com um fumo transgênico modificado tanto para transcrever quanto para silenciar a expressão do transgene *gus*, permitindo a ocorrência da via conhecida como "PCR degradativo". O "PCR degradativo" é um modelo que propõe que siRNAs atuem como iniciadores para transformar o mRNA alvo em dsRNA. O dsRNA nascente é degradado pelo complexo Dicer gerando novos siRNAs em um ciclo de síntese e degradação de dsRNA (Lipardi *et al.*, 2001; Hutvagner & Zamore, 2002). O silenciamento gênico é dose-dependente e quando mais intactos e longos são os grampos de RNAs (dsRNA) um silenciamento gênico mais eficiente é observado (Gordon & Waterhouse, 2007).

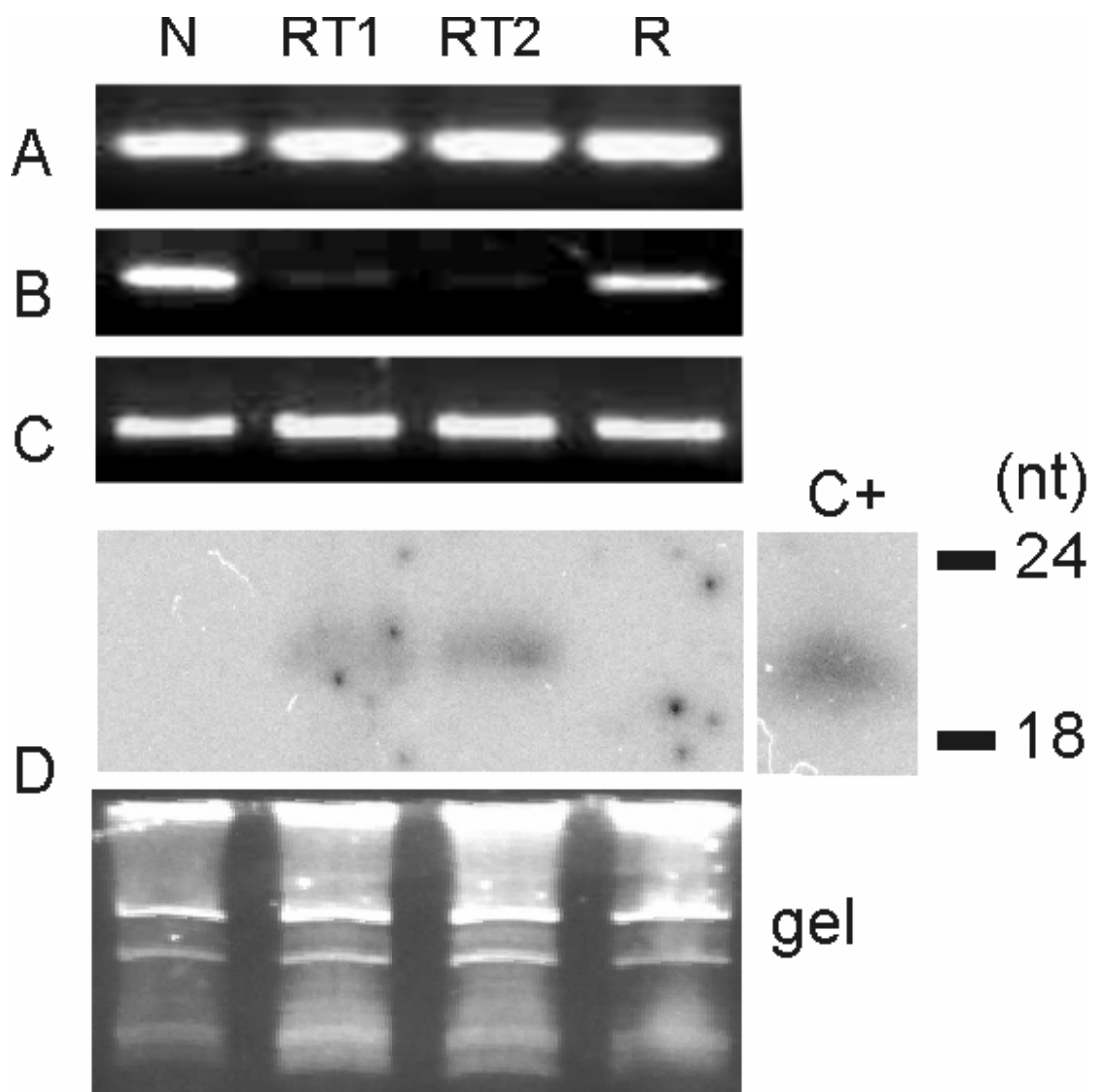
Dez colônias fúngicas foram re-isoladas tanto das linhagens de fumo re-transformadas quanto das linhagens não transformadas estabelecidas *in vitro*. A expressão do gene *gus* foi quantificada nessas colônias de fungos e os resultados revelaram que duas colônias isoladas a partir de linhagens re-transformadas de fumo apresentaram redução de aproximadamente 62% (RT1) e 96% (RT2) na expressão do gene *gus*, em comparação com as colônias isoladas de folhas não-transformadas (Figura 9A). Todas as colônias isoladas de plantas não-transformadas apresentaram uma expressão de GUS normal (atividade variando de 1.312 a 1.378 nmoles 4-mU.min-1.mg.protein-1). Além disso, investigamos a estabilidade de silenciamento de genes em células de micélio sobre várias

passagens na ausência de moléculas alvo de RNAi de re-transformadas plantas. As colônias que apresentaram redução da expressão de GUS foram cultivadas para atingir 70-80% de confluência em 8 passagens (Figura 9B). Ensaio fluorimétrico mostraram que a colônia que apresentou 62% de redução da atividade da  $\beta$ -glucuronidase (RT1) permaneceu expressando o gene *gus* em um nível semelhante. No entanto, a colônia que apresentou 96% de atividade da  $\beta$ -glucuronidase (RT2) retomou a atividade GUS normal após a sétima passagem.



**Figura 9) Colônias de *F. verticillioides* isoladas de ambas as linhagens re-transformada e não transformada de fumo. (A) A expressão do gene *gus* foi quantificada em colônias de fungos isoladas de linhagens não-transgênicas (NT) e linhagens transgênicas (RT1 e RT2). (B) As duas colônias isoladas a partir de linhagens re-transformadas de plantas apresentaram redução da expressão do gene *gus* e foram analisados para a expressão de GUS após 8 passagens.**

Os níveis de expressão de mRNA do gene *gus* em micélios após a sétima passagem foram estimados por RT-PCR semi-quantitativo. *Primers gus* específicos foram usados para distinguir o cDNA de seqüências genômicas GUS. Os resultados mostraram uma redução no nível de transcritos de *gus* em colônias de micélios RT1 e RT2, que exibem grau parcial de silenciamento do transgene. Além disso, após a reversão do silenciamento de GUS, a colônia RT2 apresentou nível de transcrição de *gus* semelhante aos micélios usados como controle (que não foram inoculados em folhas de fumo hpGUS) (Figura 9A e 9B). As análises de *Northern blot* mostraram bandas siRNA do tamanho esperado em ambas as colônias RT1 e RT2 e nenhum sinal foi observado na colônia de fungo isolado de folhas de plantas não transformadas (N) e na colônia RT2 que retomou a atividade normal GUS (R) (Figura 10D).



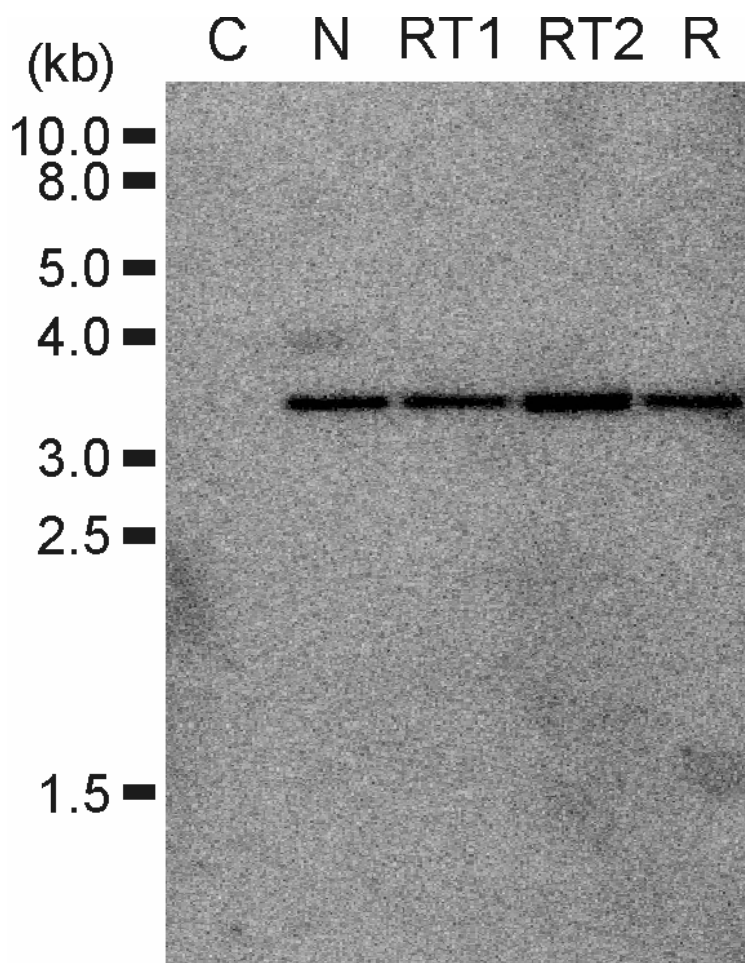
**Figura 10) Presença e expressão do gene *gus* em *F. verticillioides* transformados isolados de plantas de fumo siRNA.** (A) Análise de PCR para a presença do gene *gus* em *F. verticillioides* que não foram inoculados em plantas de fumo (N), Micélios que foram inoculados em plantas transformadas apresentaram uma redução de aproximadamente 62% (RT1) e 96 (RT2%) na expressão do gene *gus* e RT2 após a reversão para o fenótipo normal GUS + após a passagem 7 (R). (B) RT-PCR para a presença de transcritos do gene *gus* endógenos nas células fúngicas. (C) RT-PCR para a presença de transcritos do gene 5.8S rRNA do fungo (controle interno). (D) Detecção de siRNA a partir de fungos isolados de plantas transgênicas (RT1, RT2 e R) e as plantas não-transgênicas (N).



Tem sido demonstrado que os fenótipos de silenciamento induzidos por RNAi podem persistir por gerações. Apesar de numerosos relatos de silenciamento de RNA em uma variedade de organismos, ainda não é compreendido se a sinalização sistêmica de mRNA ocorre em fungos filamentosos. No entanto, o silenciamento mostrou ser uma característica dominante reversível, funcional em cepas heterocarióticas contendo uma mistura de núcleos transgênicos e não transgênicos, sugerindo que um sinal difuso e móvel de RNA está envolvido (Cogoni *et al.*, 1996). Em *C. elegans* um único episódio de silenciamento induzido por transgene de RNAi no nematóide foi herdado por mais de 80 gerações, na ausência da indução de silenciamento original (Vastenhouw *et al.*, 2006). Em camundongos, a microinjeção de microRNAs em ovos fertilizados também induziu um fenótipo de silenciamento hereditário, associados à transferência zigótica de moléculas de RNA (Rassoulzdegam *et al.*, 2006). Em plantas vasculares, estudos recentes sugerem que siRNA não agem apenas no local de síntese mas podem se mover entre as células (através do retículo endoplasmático e plasmodesmata), e podem se espalhar sistemicamente através de sistemas de transporte de longa distância (floema) (Chen & Kim, 2006; Lough & Lucas, 2006; Yoo *et al.*, 2004; Jorgensen, 2002; Kehr & Buhtz, 2008; Himber *et al.*, 2003). Há indícios de que siRNA podem se mover por 10-15 células sem amplificação, provavelmente as moléculas de 21nt, enquanto que o movimento sobre grandes distâncias requer uma amplificação do sinal original (Himber *et al.*, 2003). Além disso, certos tipos de células, como neurônios e espermatozoides são conhecidos por serem mais resistentes a RNAi. Embora, em fungos, nenhum tipo de célula foi relatado para ser resistente ao silenciamento mediado por RNA.

A instabilidade do efeito de silenciamento em fungos foi observada e associada com a organização dos *loci* transgênicos (Nakayashiki *et al.*, 2005; Cogoni *et al.*, 1996; Bogo *et al.*, 1996; Barreto *et al.*, 1997; Chicas *et al.*, 2005). A fim de investigar se o silenciamento do gene *gus* em células fúngicas estaria associada

a mudanças na integração do transgene no genoma, uma análise de *Southern blot* foi realizada em colônias de fungos que foram re-isoladas (cultivadas em linhagens de tabaco re-transformadas e não transformadas). Os resultados mostraram que todos os isolados de fungos apresentaram o mesmo padrão de integração (Figura 11) demonstrando que o *locus* do transgene foi mantido de forma estável nos isolados de fungos obtidos de plantas re-transformadas, mesmo depois de várias passagens.



**Figura 11) Análise Southern blot do DNA genômico isolado de *F. verticillioides* para detectar o gene *gus*. C: *F. verticillioides* não transgênicos; N: *F. verticillioides* transgênico que não foi inoculado em plantas de fumo; RT1 e RT2: *F. verticillioides* inoculado em plantas re-transformada; R: RT2 *F. verticillioides* após a reversão para o fenótipo normal GUS +.**

## 5) CONCLUSÃO

---

Este trabalho oferece um exemplo de transferência de informações mediada por RNA entre organismos e entre planta e patógeno. Novos estudos devem ser realizados para confirmar se os mecanismos de interferência mediados por RNA são observados nas interações naturais. A utilização de siRNAs (RNAi) tem se tornado uma ferramenta poderosa para regulação da expressão gênica, e tem sido demonstrado ser de grande importância nos estudos básicos e aplicados de interação molecular planta-patógeno, mixotróficas e simbiótica. Do ponto de vista biotecnológico, estes resultados de silenciamento por RNAi *in planta*, de um gene expresso em um fungo parasita, abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de amplas estratégias de resistência de plantas contra fungos e outros organismos.

## 6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN: **Delay of disease development in transgenic plants that express the Tobacco Mosaic Virus coat protein gene.** *Science* 1986 **232**: 738-743.
- Abreu EFM, Aragão FJL: **Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress.** *Ann. Bot.* 2007 **99**:285-292.
- Allen DJ: **The Pathology of Tropical Food Legumes: Disease Resistance in Crop Improvement.** New York. John Wiley & Sons. 1983.
- Alves-Santos FM, Martínez-Barmejo D, Rodrigues-Molina MC, Diez JJ: **Cultural characteristics, pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Spain.** *Physiol Mol Plant Pathol* 2007 **71**: 26-32
- Aly R, Cholakh H, Joel DM, Leibman D, Steinitz B, Zelcer A, Naglis A, Yarden O, Gilon: **Gene Silence of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant.** *Plant Biotech J* 2009 **7**: 487-498.
- Anderson GP, Kowtha VA, Taitt CR: **Detection of fumonisin B1 and ochratoxin A in grains products using microsphere-based fluid array immunoassays.** *Toxins* 2010 **2**:297-309.
- Angell SM, Baulcombe DC: **Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA.** *The EMBO J* 1997 **16**: 3675–3684.
- Angoji SA, Hedayati SS, Hosein poor R, Samad poor S, Shiravi S, Madani S: **Application of RNA interference in plants** *Plant Omics Journal* 2010 **3**: 77-84.
- Aragão FJL, Faria JC: **First transgenic geminivirus-resistant plant in the field.** *Nature Biotechnol* 2009 **27**: 1086-1088.
- Araújo AM, Suassuna ND, Coutinho WM: **Doenças e seu manejo.** In: Azevedo MP, Beltrão NEM: *O Agronegócio da Mamona no Brasil.* 2º edição Embrapa Informação Tecnológica Brasília DF: 2007: 281-303.

- Asad S, Haris WA, Bashir A, Zafar Y, Malik KA, Malik NN, Lichtenstein CP: **Transgenic tobacco expressing geminiviral RNAs are resistant to the serious viral pathogen causing cotton leaf curl disease.** *Arch. Virol.* 2003 **148**: 2341-2352.
- Aukerman MJ, Sakai H: **Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes.** *The Plant Cell* 2003 **15**:2730-3741.
- Barreto CC, Alves LC, Aragão FJL, Schrank A, Vainstein MH, Rech E: **High frequency gene transfer by microprojectile bombardment of intact conidia from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*.** *FEMS Microbiol Lett* 1997 **156**: 95-99.
- Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function.** *Cell* 2004 **116**:281-297.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M *et al*: **Control of coleopteran insect pests through RNA interference.** *Nature Biotechnol* 2007 **25**:1322-1326.
- Bogo MR, Vainstein MH, Aragão FJL, Rech E, Schrank A: **High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** *FEMS Microbiol Lett* 1996 **142**:123-127.
- Bonfim K, Farias JC, Nogueira EOPL, Mendes EA, Aragão FJL: **RNAi-Mediated Resistance to Bean golden mosaic virus in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*).** *Mol Plant Microbe Interact* 2007 **20**:717-726.
- Bouhnet S, Le Dorze E, Peres S, Fairbrother JM, Oswald IP: **Mycotoxin fumonisin B1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: in vivo and in vitro studies.** *Food Chem. Toxicol.* 2006 **44**:1768-1773.
- Bromley M, Gordon C, Rovira-Graells N, Oliver J: **The *Aspergillus fumigatus* cellobiohydrolase B (cbhB) promoter is tightly regulated and can be exploited for controlled protein expression and RNAi.** *FEMS Microbiol Lett* 2006 **264**:246-254.

- Bucci T, Hansen DK, Laborde JB: **Leukoencefalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub>**. *Nat Toxins* 1996 4: 51-52.
- Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J: **Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus***. *Plant J* 2008 53:739-749.
- Burgess L W, Summerell BA, Bullock S, Gott K P, Backhouse, D. Laboratory manual for *Fusarium* research, Sydney, University of Sydney.1994.
- Burgess L W, Summerell, B A, Backhouse, D et al.: **Biodiversity and population studies on *Fusarium***. In: LOGRIECO A, SEIFERT K A, LESLIE J F A. et al. Biodiversity of toxigenic *Fusarium* species. *Sydowia* 1997 30: 1-11.
- Charmley LL, Rosenberg A, Trenholm HL: **Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grain, foods and feedstuffs**. In: Mycotoxins in Grains. Miller J.D. and Trenholm H.L. (eds) St. Paul, MN: Eagan Press 1994 p471.
- Chen X-Y, Kim J-Y: **Transport of macromolecules through plasmodesmata and the phloem**. *Physiol Plant* 2006 126:560–571.
- Chicas A, Forrest EC, Sepich S, Cogoni C, Macino G: **Small Interfering RNAs that trigger posttranscriptional gene silencing are not required for the histone H3Lys9 methylation necessary for transgenic tandem repeat stabilization in *Neurospora crassa***. *Mol Cell Biol* 2005 25: 3793–3801.
- Chow TY-K, Kafer E: **A rapid method for isolation of total nucleic acids from *Aspergillus nidulans*** *Fungal Genet Newsl* 1993 40:25-27.
- Cirillo T, Ritieni A, Galvano F, Cocchieri RA: **Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in Italian marketed foodstuffs**. *Food Add. Contam* 2003 20: 566-571.
- Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G: **Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation**. *EMBO J* 1996, 15:3153-3163.
- Costa RV, Ferreira AS, Casela CR, Silva DD : **Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho**. *Circular Técnica - Embrapa* 2008 100: 1-7.

- Couteaudier Y, Daboussi MJ, Eparvier A, Langin T, Orcival J: **The GUS gene fusion system (*Escherichia coli* beta-D-glucuronidase gene), a useful tool in studies of root colonization by *Fusarium oxysporum*.** *Appl Environ Microbiol* 1993, **59**:1767-1773.
- Covert SF, Aoki T, O'Donnell K, Starkey D, Holliday A, Geiser DM, Cheung F, Town C, Strom A, Juba J, Scandiani M, Yang XB: **Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*.** *Fungal Genet Biol* 2007 **44**: 799-807.
- Danielson GA, Nelson BD, Helms TC: **Effect of Sclerotinia stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages.** *Plant Dis* 2004 **88**:297-300.
- Davis R M, Colyer P D, Rothrock C S, Kochman J K: **Fusarium wilt of cotton: population diversity and implications for management.** *Plant Disease* 2006 **90**: 692-703.
- Dias BBA, Cunha WG, Morais LS, Vianna GR, Rech EL, de Capdeville G, Aragão FJL: **Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*.** *Plant Pathol* 2006 **55**:187-193.
- Ding B, Itaya A, Zhong X: **Viroid trafficking: a small RNA makes a big move.** *Curr Opin Biol.* 2005 **8**:606-612.
- Ding B, Wang Y: **Viroids: Uniquely Simple and Tractable Models to Elucidate Regulation of Cell-to-Cell Trafficking of RNA** *DNA and Cell Biol* 2009 **28**:51-56.
- Dominguez A, De Mendoza AH, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, Peña L: **Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of *citrus tristeza virus*.** *Plant Cell Reports* 2000 **19**:427-433.
- Dunoyer P, Himber C, Ruiz-Ferrer V, Alioua A, Voinnet O: **Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways.** *Nat. Genet.* 2007 **39**: 848-856.

- Dunoyer P, Schott G, Humber C, Meyer D, Takena A, Carrington JC, Voinnet O: **Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells**. *Science* 2010 **328**: 912-915.
- El-Magraby OMO, El-Maraghy SSO: **Mycoflora and mycotoxins of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds in Egypt. III. Cellulose-decomposing and mycotoxin-producing fungi**. *Mycopathologia* 1988 **104**:19-24.
- Erental A, Harel A, Yarden O: **Type 2A phosphoprotein phosphatase is required for asexual development and pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum***. *Mol Plant Microbe Interact* 2007 **20**:944-954.
- Fairbairn DJ, Cavallaro AS, Bernard M, Mahalinga-Iyer J, Graham MW, Botella JR: **Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes**. *Planta* 2007 **226**:1525-1533.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans***. *Nature* 1998 **391**:806-811.
- Frisvad JC, Smedsgaard J, Samso RA, Larsen TO, Thrane U: **Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger***. *J. Agric. Food Chem.* 2007 **55**:9727-9732.
- Galun, E: **RNA silencing in plants**. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 2005 **41**:113-123.
- Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas, WFO *et al.*: **Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats**. *Carcinogenesis* 1991 **12**: 1247-1251.
- genética de isolados do complexo colletotrichum associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas**. *Fitopatologia Brasileira* 2002 **27**:27-32.
- Gordon KHJ, Waterhouse PM: **RNAi for insect-proof plants**. *Nature Biotechnol* 2007 **25**:1231-1232.
- Groth JV, Davis DW, Zeyen RJ, Mogen BD: **Ranking of partial resistance to common rust (*Puccinia sorghi* Schr.) in 30 sweet corn (*Zea mays*) hybrids** *Crop Prot* 1983 **2**: 219-223.



- Ha YS, Covert SF, Momany M: **FsFKS1, the 1,3-beta-glucan synthase from the caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*.** *Eukaryotic cell* 2006 5:1036-1042.
- Hammond SM, Berntein E, Beach D, Hannon GJ: **An RNA-dicted nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells.** *Nature* 2000 404:293-296.
- Hammond TM, Caudy AA, Hannon GJ: **Post-transcriptional gene silencing by double-strand RNA.** *Nat Rev Genet* 2001 2:110-119.
- Hammond TM, Keller NP: **RNA silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA-dependent RNA polymerases.** *Genetics* 2005 169:607-617.
- Hannon GJ: **RNA interference.** *Nature* 2002 418:244–251.
- Haywood V, Kragler F, Lucas WJ: **Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling.** *The Plant cell* 2002 14:S303-325.
- Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O: **Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing.** *EMBO J* 2003 22:4523-4533.
- Horch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Wallroth M, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT: **A simple and general method for transferring genes into plants.** *Science* 1985 227:1229–1231.
- Houterman PM, Speijer D, Dekker HL, De Koster C, Cornelissen BJC, Rep M: **The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum* infect tomato plants.** *Mol. Plant Pathol.* 2007 8: 215-221.
- Huang G, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS: **Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 103:14302-14306.
- Hutvagner G, Zamore PD: **A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex.** *Science* 2002 297:2056 - 2060.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW: **GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.** *EMBO J* 1987 6:3901-3907.

- Jorgensen RA: **RNA traffics information systemically in plants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 **99**:11561–11563.
- Kadotani N, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S: **RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*.** *Mol Plant Microbe Interact* 2003 **16**:769-776.
- Kalantidis K, Schumacher HT, Alexiadis T, Helm JM: **RNA silencing movement in plants.** *Biol Cell* 2008 **199**: 13-26.
- Kehr J, Buhtz A: **Long distance transport and movement of RNA through the phloem.** *J Exp Bot* 2008 **59**:85-92.
- Klahre U, Crete P, Leuenberger SA, Iglesias VA, Meins F, Jr.: **High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 **99**:11981-11986.
- Kobayashi K, Zambryski P: **RNA silencing and its cell-to-cell spread during *Arabidopsis* embryogenesis.** *Plant J.* 2007 **50**: 597-604.
- Lessard M, Boudry G, Seve B, Oswald I P, Lalles J-P: **Intestinal physiology and peptidase activity in male pigs are modulated by consumption of corn culture extracts containing fumonisins** *J. Nutr.* 2003 **139**: 1303-1307.
- Lima MIPM, Fernandes JMC : **Avaliação da resistência à giberela de genótipos de cereais de inverno** *Fitopatol. bras.* 2002 **27**.
- Ling L, Yang JY: **Stem blight of cotton caused by *Alternaria macrospora*.** *Phytopathology* 1940 **31**:664-671.
- Lipardi C, Wei Q, Paterson BM: **RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs.** *Cell* 2001 **107**:297–307.
- Lough TJ, Lucas WJ: **Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking.** *Ann Rev Plant Biol* 2006 **57**:203–232.
- Lucas WJ, Yoo B-C, Kragler F: **RNAs as a long-distance information macromolecule in plants.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 **2**: 849-857.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY: **Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol.** *Nature Biotechnol* 2007 **25**:1307-1313.

- Marasas WFO, Jaskiewicz K, Venter FS, van Schalkwyk DJ: ***Fusarium moniliforme* contamination of maize in esophageal cancer areas in Transkei.** *South Afr. Med. J.* 1988 **74**: 110-114.
- Marasas WFO, Kallerman S, Gelderblom WCA, Coetzer JAW, Thiel PG, van der Lugt JJ. **Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*.** *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1988 **55**: 197-203.
- Martinez J, Tuschl T: **RISC is a 5' phosphomonoester producing RNA endonuclease.** *Genes Dev.* 2004 **18**: 975-980.
- Martín-Pinto P, Pajares J, Díez J: **Pathogenicity of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium oxysporum* on *Pinus nigra* seedlings in northwest Spain.** *For. Path.* 2008 **38**: 78-82.
- Meirelles, M.C.A., Corrêa, B., Fischman, O., *et al.*: **Leucoencefalomalacia (LEME) no Brasil. Aspectos epizootiológicos e micotoxicológicos dos surtos ocorridos nos anos de 1988 a 1990.** *Rev Microbiol* 1991 **22**: 316.
- Mendes, MAS, Lima PMMP, Fonseca JNL, Santos MF: **Erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa utilizando termo e quimioterapia.** *Fitopatologia Brasileira* 2001 **26**:148-152.
- Merrill Jr AH, Sullards MC, Wang E, Voss KA, Riley RT: **Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins.** *Environ. Health Persp.* 2001 **109**:283-289.
- Meyer V: **Genetic engineering of filamentous fungi progress, obstacles and future trends.** *Biotechnol Advanc* 2008, **26**:177-185.
- Ming L, Jiang S, Youqun W, Gouqin L: **Post-transcriptional gene silencing signal could move rapidly and bidirectionally in grafted *Arabidopsis thaliana*** *Chinese Science Bull.* 2006 **51**: 313-319.
- Mlotshwa S, Voinnet O, Mette MF, Matzke M, Vaucheret H, Ding SW, Pruss, G, Vance V B: **RNA silencing and the mobile silencing signal.** *Plant Cell* 2002 **14**: 289-301.
- Moriwaki A, Ueno M, Arase S, Kihara J: **RNA-mediated gene silencing in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*.** *FEMS Microbiol Lett* 2007 **269**:85-89.

- Nakayashiki H, Hanada S, Nguyen BQ, Kadotani N, Tosa Y, Mayama S: **RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi.** *Fungal Genet Biol* 2005 **42**:275-283.
- Namekawa SH, Iwabata K, Sugawara H, Hamada FN, Koshiyama A, Chiku H, Kamada T, Sakaguchi K: **Knockdown of LIM15/DMC1 in the mushroom *Coprinus cinereus* by double-stranded RNA-mediated gene silencing.** *Microbiology* 2005 **151**:3669-3678.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R: **Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans.** *Plant Cell* 1990 **2**:279–289.
- Nganje EW, Tiapo N M, Wilson WW: **Economic impact of scab with alternative risk management strategy: the case of crop quality insurance in barley.** *Agrib. Appl. Economics* 2002 **498**.
- Nicolas FE, de Haro JP, Torres-Martinez S, Ruiz-Vazquez RM: **Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects.** *Fungal Genet Biol* 2007 **44**:504-516.
- Nunes ACS, Vianna GR, Cuneo F, Amaya-Farfan J, Capdeville G, Rech EL, Aragão FJL: **RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content.** *Planta* 2006 **224**:125-132.
- Oren L, Ezrati S, Cohen D, Sharon A: **Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate.** *Appl Environ Microbiology* 2003 **69**:1695-1701.
- Orsi, R.B., Corrêa, B., Pozzi, C.R., *et al.*: **Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize.** *J Stored Prod Res.* 2000 **36**: 75-87.
- Oyekan PO: **Occurrence of cowpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* in Nigeria.** *Plant Disease Reporter* 1977 **59**:488-490.
- Pak J, Fire A: **Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*.** *Science* 2007 **315**: 241-244.

- Palauqui J-C, Elmayan T, Dorlhac de Borne F, Cr  t   P, Charles C, Vaucheret H: **Frequencies, timing and spatial patterns of co-suppression of nitrate reductase and nitrite reductase in transgenic tobacco plants.** *Plant. Physiol.* 1996 **112**: 1447-1456.
- Palauqui J-C, Elmayan T, Pollien J-M, Vaucheret H: **Systemic acquired silencing: transgene-specific pos-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions.** *The EMBO J* 1997 **16**: 4738-4745.
- Pamphile JA, da Rocha CLMSC, Azevedo JL: **Co-transformation of a tropical maize endophytic isolate of *Fusarium verticillioides* (synonym *F. moniliforme*) with *gusA* and *nia* genes.** *Genet Mol Biol* 2004 **27**:253-258.
- Parry W: **The incidence of *Fusarium* spp. in stem bases of selected crops of winter wheat in the Midlands, UK,** *Plant Pathology* 1990 **39**:619–622.
- Paulauqui JC, Balzergue S: **Activation of systemic acquired silencing by localised introduction of DNA.** *Curr. Biol.* 1999 **9**: 59-66.
- Pimentel D, Zuniga R, Morrison D: **Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the U.S.** *Ecol Econ* 2005 **52**:273-288.
- Poltronieri, L.S., Trindade, D.R. & Silva, J.F: **Principais Doenças do Caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp. no Par   e Recomendaes de Controle.** Bel  m. EMBRAPA-CPATU. 1994
- Pooggin MM, Shivaprasad PV, Veluthambi K, Hohn T: **RNAi targeting of DNA virus in plants.** *Nat. Biotechnol.* 2003 **21**:131-132.
- Powell PA, Stark DM, Sanders PR, Beachy RN: **Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1989 **86**: 6949-6952.
- Pozzi CR, Corr  a B, Gambale W, et al.: **Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interation, abiotic factors and mycotoxins occurence.** *Food Addit Contam* 1995 **12**: 313-319.
- Quillis J, Meynard D, Vila L, Avil  s FX, Guiderdoni E, San Segundo B: **A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice.** *Plant Biotechnol. J* 2007 **5**:537-553.

- Raaijmakers JM, Paulitz CT, Steinberg C, Alabouvette C, Moenne-Loccoz Y :**The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms.** *Plant and Soil* 2009 **321**: 341-361.
- Ragazzi A, Moricca S, Dellavalle I, Mancini F: **Infection of cotton by *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* as affected by water stress.** *Phytoparasitica* 1995 **23**:315-321.
- Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F: **RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse.** *Nature* 2006 **441**:469-474.
- Rathaiah Y: **Spore germination and mode of cotton infection by *Ramularia areola*** *Phytopathology* 1977 **67**: 351-357
- Rodriguez AT, Ramirez MA, Cárdenas RM, Hernández NA, Velazquez MG, Bautista S: **Induction of defense response of *Oryza sativa* L against *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. by treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan** *Pest Bioch Physiol* 2007 **89**: 206-215.
- Romano, N and Macino G: **Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences** *Mol Microbiol* 1992 **6**:3343–3353.
- Roney JK, Khatibi PA, Westwood JH: **Cross-Species translocation of mRNA from host plants into the parasitic plant dodder** *Plant Physiology* 2007 **143**:1037-1043.
- Rossman AY: **The impact of invasive fungi on agricultural ecosystems in the United States.** *Biol. Invasions* 2009 **11**:97-107.
- Salgado MO, Schwartz HF, Brick MA, Pastor Corrales MA: **Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* in tepary beans (*Phaseolus acutifolius*)** *Plant Dis* 1994 **78**: 357-360.
- Sambrook J, Russell DW: **Southern Hybridization.** In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Volume 1.* 3rd edition. Edited by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York: 2001 **6**:33-6.64.
- Schjoth JE, Tronsmo AM, Sundheim L: **Resistance to *Fusarium verticillioides* in 20 Zambian Maize Hybrids.** *J. Phytopathology* 2008 **156**:470-479.

- Schneider RW, Hollier CA, Whitam HK, Palm ME, McKemy JM, Hernandez JRL, DeVries-Paterson R: **First Report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States.** *Plant Dis* 2005 **89**:774–774.
- Schwach F, Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC: **An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal.** *Plant Physiol.* 2005 **138**: 1842-1852.
- Scorza R, Callahn A, Levy L, Damsteegt V, Webb K, Ravelonandro M: **Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene.** *Transgenic Research* 2001 10: 201-209.
- Silva-Mann R, Salgado KCC, Vieira MGGC, Machado JC: Variabilidade genética de isolado de complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculações em plantas. *Fitopatologia Brasileira*, 2002 27: 27-32.
- Sotomayor IA, Purdy LH, Trese AT: **Infection of sugarcane leaves by *Puccinia melanocephala*** *Phytopathol* 1983 **73**:695-699.
- Souza AJ, Mendes BMJ, Filho FAAM: **Gene silencing: concepts, applications, and perspectives in wood plants.** *Sci. Agric.* 2007 **64**: 645-656.
- Steeves RM, Todd TC, Essig JS, Trick HN: **Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction.** *Funct Plant Biol* 2006 **33**:991-999.
- Steffenson BJ, Wilcoxson RD, Roelfs AP: **Inheritance of resistance to *Puccinia graminis* f. sp. *Secalis* in Barley** *Plant Dis* 1984 68:762-763.
- Steinkellner S, Mammerler R, Vierheilig H: **Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates.** *J Plant Inter* 2005 **1**:23-30.
- Sydenham EW, Gelderblom WCA, Thiel PG, *et al.*: **Evidence for the natural occurrence of Fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn.** *J Agric Food Chem* 1990 **38**: 285-290.
- Tabara H, Grishok A, Mello CC: **RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence.** *Science* 1998 **282**:430-431.

- Timmons L, Fire A: **Specific interference by ingested dsRNA.** *Nature* 1998 **395**:854.
- Tolia NH, Joshua-Tor L: **Slicer and the Argonautes.** *Nat Chem Biol.* 2006 **3**:36-43.
- Tomilov AA, Tomilova NB, Wroblewski T, Michelmore R, Yoder JI: **Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants.** *Plant J* 2008 **56**:389-397.
- Vastenhouw NL, Brunschwig K, Okihara KL, Muller F, Tijsterman M, Plasterk RH: **Gene expression: long-term gene silencing by RNAi.** *Nature* 2006 **442**:882.
- Voinnet O, Baulcombe DC: **Systemic signalling in gene silencing.** *Nature* 1997 **389**:553.
- Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC: **Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA.** *Cell* 1998 **95**: 177-187.
- Wang MB, Abbot DC, Waterhouse PM: **A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus.** 2000 *Mol Plant Pathol.* **1**: 341-350.
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB: **Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 **95**:13959-13964.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA *et al*: **Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants.** *Plant J* 2001 **27**:581-590.
- Wilson WM, Molodowitc C, Hunter CP: **Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1.** *Science* 2002 **295**: 2456-2459.
- Xei Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC: **Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants.** *Public Library of Science Biology* 2004 **2**:0642-0652.
- Yamada O, Ikeda R, Ohkita Y, Hayashi R, Sakamoto K, Akita O: **Gene silencing by RNA interference in the koji mold *Aspergillus oryzae*.** *Biosc, Biotechnol, Biochem* 2007 **71**:138-144.
- Yang Y, Sherwood TA, Hiebert CP, Polston JE: **Use of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) Rep gene sequences to engineer TYLCV resistance in tomato.** *Phytopathology* 2004 **94**:490-496.



- Yoo B-C, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, Haywood V, Archer-Evans S, Lee YM, Lough TJ, Lucas WJ: **A systemic small RNA signaling system in plants.** *Plant cell* 2004 **16**:1979–2000.
- Yoshizawa T, Yamashita A, Luo Y: **Fumonisin occurrence in corn from high-risk and low-risk areas for human esophageal cancer in China.** *Appl. Environ Microbiol.* 1994 **60**: 110-114.