



Proteção da oliveira contra vírus através do desenvolvimento de OMMV como vetor de silenciamento

Carla Varanda^{1*}, Patrick Materatski¹, André Albuquerque¹, Maria Doroteia Campos¹, Mariana Patanita¹ & Maria Rosário Félix²

¹MED – Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal, carlavaranda@uevora.pt

²MED – Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento & Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal.

Resumo

O silenciamento de genes induzido por vírus (Virus induced gene silencing - VIGS) permite o silenciamento específico de genes que podem ser inseridos, total ou parcialmente, num vetor viral que é de seguida inoculado em plantas. Estas plantas, irão reconhecer a sequência introduzida como estranha, destruindo-a. Adicionalmente, os mecanismos de defesa da planta ficam a reconhecer todas essas sequências de RNA homólogo existente na planta. Vários vírus de plantas têm sido usados como vetores VIGS, no entanto, a sua difícil manipulação e o seu número reduzido de hospedeiros, limita o seu uso. O Alphanecrovirus *Olive mild mosaic virus* (OMMV), isolado de oliveira, tem características que o colocam como um vetor muito promissor. O seu pequeno genoma facilita a sua manipulação e o vasto leque de hospedeiros permite a sua aplicação a um elevado número de plantas incluindo a oliveira.

Um vetor baseado em OMMV foi desenvolvido no âmbito do projeto TOMVIRPROTECT. Um clone infeccioso de OMMV (pUC_OMMVFL5) foi modificado para obter uma estirpe assintomática. Uma única mutação no nt18 (C para A) da proteína de movimento p6, uma proteína supressora de silenciamento, originou um codão STOP, resultando no knockout do gene. O OMMVp6 mutante foi de seguida manipulado para transportar o gene repórter GFP, e inoculado em plantas de *Nicotiana benthamiana* 16C onde não causou sintomas visíveis e onde a acumulação viral foi idêntica à de OMMV 'wild type'. A acumulação relativa de RNAm de GFP em plantas 16C foi a mais baixa quando a GFP foi colocada na direção antisense e na extremidade 3' do OMMVp6 mutante. Foi ainda inserido um local de restrição múltiplo nesta região para facilitar a introdução de sequências de genes a serem silenciados. Estas transformações permitiram obter um vetor de OMMV-VIGS, que se pretende que fique disponível para controlo de doenças virais em oliveira e também noutras plantas.

Este trabalho foi financiado pela UE através do Fundo de Desenvolvimento Regional Europeu, ALENTEJO2020 e ALGARVE2020 e FCT pelo projeto ALT20-03-0145-FEDER-028263 e PTDC/ASP-PLA/28263/2017 e pelo projeto ALT20-03-0145-FEDER-028266 e PTDC/ASP-PLA/28266/2017.

Palavras-chave – Proteção de plantas, VIGS