

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**USO DE PLASMÍDEOS VEGETAIS PARA TRANSFERIR RESISTÊNCIA À
Venturia inaequalis EM CULTIVARES DE MACIEIRA (*Malus × domestica*)**

ROBERTA CUSIN

Orientador: Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin

Coorientador: Dr. Luis Fernando Revers

DISSERTAÇÃO

PORTO ALEGRE

MARÇO DE 2016

ROBERTA CUSIN

**USO DE PLASMÍDEOS VEGETAIS PARA TRANSFERIR RESISTÊNCIA À
Venturia inaequalis EM CULTIVARES DE MACIEIRA (*Malus × domestica*)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin

Coorientador: Dr. Luis Fernando Revers

PORTO ALEGRE

MARÇO DE 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Márcia M. A. N. Margis-Pinheiro.

Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof.^a. Dr.^a. Janette Palma Fett

Instituto de Biociências, Departamento de Botânica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dr. Diogo Denardi Porto

Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi Árido
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

INSTITUIÇÕES E FONTE FINANCIADORA

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal, pertencente ao Departamento de Botânica e ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, e no Laboratório de Genética Molecular Vegetal, no Centro Técnico da EMBRAPA Uva e Vinho. Recebeu auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante. ”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação só foi possível graças à ajuda de algumas pessoas.

Gostaria de fazer um agradecimento em especial ao meu orientador, Felipe Maraschin, pela oportunidade, confiança depositada em mim e no meu trabalho, além da paciência, dedicação e ética profissional.

Àqueles que estiveram ao meu lado diariamente no Laboratório de Fisiologia Vegetal, por todas as incansáveis perguntas técnicas e de localização em Porto Alegre, além das conversas filosóficas no horário de almoço. Em especial à Ciba, Cabelo, Judeu (Felipe) e Mona (Fernanda), pela paciência as inúmeras perguntas e amizade. A todos que me ofereceram pouso para eu poder ir comemorar conquistas, aniversários ou pelo simples prazer de tomar uma boa cerveja, em especial a Ciba, Márcia e Janieli. Aos ICs João Carlos Nogueira e Isadora Bianchin pela companhia e auxílio na bancada. A Isa, obrigada pela ‘querideza’ e amizade. Ao Elmo Cardoso por sua eficiência e dedicação. Aos professores Arthur e Janette sempre dispostos a esclarecer dúvidas.

Ao meu co-orientador, Luís Fernando Revers, por trabalharmos novamente juntos, pela estrutura financeira e física que tornou esse trabalho possível. Aos colegas que já conviveram comigo durante minha iniciação científica no Laboratório de Genética Molecular Vegetal, principalmente a Caru, Vanessa e Vítor pela paciência, auxílio nesse projeto e amizade. Aos pesquisadores Ana Beatriz Czermainski, Henrique Pessoa dos Santos, João Caetano Fioravanço, Paulo Ricardo Dias de Oliveira e Sílvio André Meirelles Alves. Aos analistas Bruna Carla Agustini e Daniel Santos Gros por estarem sempre dispostos a ajudar. Ao assistente Heitor Corbelini por manter as plantas vivas e colaborar com o manejo das plantas. Ao corcunda do conhecimento (Diogo), se não fosse pelo teu incentivo, não teria seguido a vida acadêmica.

Aos amigos de sempre, com quem tenho a sorte de conviver e me incentivaram nessa etapa da minha vida.

À família Peter que prontamente me acolheu e ofereceu uma estadia. Meu muito obrigada a tia Carmen, tio Beto, e aos irmãos mais novos Matheus, Raphael e a pequena grande Bruna Maria.

Aos meus pais, Noeli e Roberto, em especial ao meu irmão (Robson), pelo apoio e amor incondicional. Aos sogros do meu irmão, Nira e Toninho, e a minha cunhada (Jana), pelas inúmeras marmitas, palavras de incentivo e carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	07
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	08
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 A cultura da macieira	13
1.2 À sarna da macieira	14
1.2.1 Agente causal – <i>Venturia inaequalis</i>	14
1.2.2 Sintomas	17
1.2.3 Interação entre <i>Venturia inaequalis</i> e <i>Malus spp</i>	18
1.2.4 Controle da sarna da macieira	19
1.2.5 Formas de resistência a <i>V. Inaequalis</i>	19
1.3 Caracterização do gene de resistência à sarna da macieira	20
1.4 Plataforma TraitUp™ IL-60	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 NEW BIOTECHNOLOGICAL TOOLS TO ACCELERATE SCAB RESISTANCE TRAIT TRANSFER TO APPLE	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
5 RESULTADOS	47
5.1 Amplificação do gene <i>Vf2</i> e clonagem no vetor de expressão <i>pIR</i>	47
5.2 O DNA dos plasmídeos vegetais é mantido e detectado sistemicamente em tecidos de macieiras tratadas	49
5.3 Plantas de macieira tratadas com <i>pIR-Vf2</i> apresentam níveis aumentados de expressão do gene recombinante	53
5.4 Sinais de conídios de <i>V. inaequalis</i> em plantas de macieira	55
5.5 Macieiras de Fuji e Gala expressando <i>Vf2</i> apresentam uma redução na severidade da sarna	57
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

LISTA DE ABREVIATURAS

% - percentagem

3' - extremidade 3' -hidroxila de DNA ou RNA

5' - extremidade 5' -fosfato de DNA ou RNA

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico complementar (do inglês, *complementary deoxyribonucleic acid*)

DNase – Desoxirribunoclease (do inglês, *deoxyribonuclease*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)

dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados (do inglês, *deoxyribonucleotide triphosphates*)

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

LB – Luria Bertani

MDH - Malato Desidrogenase (do inglês, *malate dehydrogenase*)

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MuLV RT - Transcriptase Reversa Moloney Murine Leukemia Virus (do inglês, *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*)

pb – par (es) de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)

pH – Potencial Hidrogeniônico

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)

RT-qPCR - Reação em Cadeira da DNA Polimerase de forma quantitativa precedida de Transcrição Reversa (do inglês, *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RS – Rio Grande do Sul

TMp1 – Fator de transcrição com Domínio de Repetição do tipo TMp1 (do inglês, *Type 1 membrane protein like*)

Tris-HCl – Trisaminometano-ácido clorídrico

TYLCV (do inglês, *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*)

Vf – Gene Venturia floribunda de Malus floribunda 821

WD40 - Fator de Transcrição com Domínio de Repetição do tipo WD40 (do inglês, *transcription factor WD40-like repeat domain*)

WT – tipo - selvagem (do inglês, *wild-type*)

LISTA DE TABELAS

Tabela I Interações entre espécies de <i>Malus</i> e <i>V. inaequalis</i> em folhas destacadas após 30 dias de inoculação de esporos.....	57
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 Ciclo de vida de <i>Venturia inaequalis</i> , agente causal da sarna da Macieira	16
Figura 02 Frutos da cultivar Gala com lesões severas da sarna da macieira no pomar localizado na Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado, Vacaria – RS.....	18
Figura 03 Administração do DNA contendo a construção <i>pIR-Vf2</i> juntamente com o plasmídeo <i>helper</i> , diretamente no caule da macieira com o auxílio de uma agulha hipodérmica.....	42
Figura 04 Amplificação do gene <i>Vf2</i> de DNA genômico de <i>Malus floribunda</i> por PCR.....	48
Figura 05 Triagem dos clones recombinantes dos plasmídeos pGEM®-T Easy contendo o produto de amplificação.....	49
Figura 06 Triagem dos clones recombinantes da miniprep de <i>E.coli</i> TOP10 transformada com o vetor de expressão pIR contendo a sequência de <i>Vf2</i> por PCR.....	49
Figura 07 DNA plasmidial diferentes clones com o vetor de expressão pIR contendo a sequência de <i>Vf2</i> digerido com a enzima <i>BglIII</i>	50
Figura 08 Detecção do plasmídeo de expressão pIR por <i>nested-PCR</i> em plantas de macieira ‘Fuji Suprema’ após 15 dias do tratamento com <i>pIR-Vf2</i> mais o plasmídeo <i>helper</i>	51
Figura 09 Detecção do plasmídeo de expressão pIR por <i>nested-PCR</i> em plantas de macieira ‘Maxi Gala’ após 15 dias do tratamento com <i>pIR-Vf2</i> mais o plasmídeo <i>helper</i>	51
Figura 10 Detecção do plasmídeo de expressão pIR por <i>nested-PCR</i> em plantas de macieira ‘Fuji Suprema’ após 30 dias do tratamento com <i>pIR-Vf2</i> mais o plasmídeo <i>helper</i>	52
Figura 11 Detecção do plasmídeo de expressão pIR por <i>nested-PCR</i> em plantas de macieira ‘Fuji Suprema’ após 30 dias do tratamento com <i>pIR-Vf2</i> mais o plasmídeo <i>helper</i>	52
Figura 12 Detecção do plasmídeo de expressão pIR por <i>nested-PCR</i> em plantas de macieira ‘Fuji Suprema’ após 30 dias do tratamento com <i>pIR-Vf2</i> mais o plasmídeo <i>helper</i>	53
Figura 13 Detecção do plasmídeo de expressão pIR por <i>nested-PCR</i> em plantas de macieira ‘Maxi Gala’ após 30 dias do tratamento com <i>pIR-Vf2</i> mais o plasmídeo <i>helper</i>	53
Figura 14 Detecção do plasmídeo de expressão pIR por <i>nested-PCR</i> em plantas de macieira ‘Maxi Gala’ após 30 dias do tratamento com <i>pIR-Vf2</i> mais o plasmídeo <i>helper</i>	54
Figura 15 Detecção do plasmídeo de expressão pIR por <i>nested-PCR</i> em plantas de macieira ‘Maxi Gala’ após 30 dias do tratamento com <i>pIR-Vf2</i> mais o plasmídeo <i>helper</i>	54
Figura 16 Análise do acúmulo de transcritos do gene <i>Vf2</i> na cultivar Maxi Gala após 8 meses do tratamento com <i>pIR-Vf2</i> mais o plasmídeo <i>helper</i> e desafiadas com esporos de <i>V. inaequalis</i>	55
Figura 17 Análise do acúmulo de transcritos do gene <i>Vf2</i> na cultivar Fuji Suprema após 8 meses do tratamento com <i>pIR-Vf2</i> mais o plasmídeo <i>helper</i> e desafiadas com esporos de <i>V. inaequalis</i>	56

Figura 18 Sintomas observados em folhas destacadas após 30 dias de inoculação com suspensão de conídios de <i>V. inaequalis</i>	57
Figura 19 Severidade da infecção por <i>V. inaequalis</i> em folhas de plantas de diferentes genótipos de macieiras mantidas em vasos 30 dias após da inoculação de esporos.....	58
Figura 20 Interação entre espécies de <i>Malus</i> e isolado de <i>V. inaequalis</i> , plantas em vasos após 30 dias de inoculação com suspensão de conídios.....	59
Figura 21 Visualização da presença de conídios da interação entre espécies de <i>Malus</i> e isolado de <i>V. inaequalis</i> em plantas em vasos após 30 dias de inoculação com suspensão de conídios.....	59

RESUMO

A macieira (*Malus × domestica*) possui importância mundial entre as frutíferas de clima temperado, e o Brasil se destaca entre os maiores produtores mundiais de maçã. À sarna da macieira, causada pelo fungo ascomiceto *Venturia inaequalis*, é uma das principais doenças nessa cultura. As duas cultivares mais consumidas no Brasil, Fuji e Gala, são altamente suscetíveis à sarna. O gene *Vf2*, derivado do clone 821 da espécie silvestre *Malus floribunda*, é capaz de conferir resistência à doença. O processo de melhoramento genético da macieira e a introgressão de novos genes derivados de germoplasma é um processo demorado e difícil devido ao longo tempo de geração das plantas e à autoincompatibilidade à autopolinização em *Malus*. Historicamente a introgressão recombinante de genes em vegetais baseou-se na transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Porém, novas técnicas estão sendo estabelecidas e vem revolucionando o campo da genômica funcional em plantas como a utilização de DNA episomal em plasmídeos vegetais derivados de vírus. Estes vetores não se integram ao genoma da planta hospedeira e não são herdáveis. Os vetores consistem de vírus modificados capazes de espalhar-se por todos os tecidos da planta tratada sem causar doença e levando à expressão de genes de interesse sem a necessidade de obtenção de plantas transgênicas. Este trabalho teve como objetivo transferir a resistência a *V. inaequalis*, conferida pelo gene *Vf2*, para as cultivares de macieira Fuji e Gala, utilizando-se plasmídeos vegetais baseado nos vírus TYLCV (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*). O gene de resistência *Vf2* derivado de *Malus floribunda* 821 foi clonado nos vetores de expressão e injetado em plantas de macieira das cultivares Maxi Gala e Fuji Suprema. O DNA plasmidial foi detectado sistemicamente nas plantas tratadas e este se manteve estável durante os 8 meses de testes. A expressão do gene *Vf2* foi quantificada por RT-qPCR e diversas plantas apresentaram níveis elevados de expressão deste gene de resistência. Estas plantas foram desafiadas com esporos de *V. inaequalis* e a maioria das plantas tratadas apresentou fenótipo resistente à sarna. A introgressão recombinante baseada em plasmídeos vegetais demonstrou ser eficaz em transferir material genético de forma sistêmica nas duas cultivares de macieira testadas. O vetor plasmidial foi detectado nas plantas tratadas durante todo o período (8 meses) avaliado neste estudo, e a expressão do gene de resistência foi detectada em diversos indivíduos. Nosso estudo reforça a aplicabilidade desta técnica em plantas lenhosas perenes e abre a possibilidade para a introgressão rápida de outras características de interesse derivadas da expressão heteróloga de genes com potencial biotecnológico.

ABSTRACT

Apple (*Malus x domestica*) is an important crop among temperate fruit trees, and Brazil features among the world's biggest apple producers. The apple scab, caused by the ascomycete fungus *Venturia inaequalis*, is a major disease of the culture. The two most consumed cultivars in Brazil, Fuji and Gala, are highly susceptible to apple scab. The *Vf* gene, derived from clone 821 of the wild species *Malus floribunda*, is capable of conferring resistance to the scab disease. The genetic improvement process of apple by introgression of new genes derived from germplasm is lengthy due to long generation time and self-incompatibility. Historically the recombinant introgression of genes in plants has been based on genetic transformation employing *Agrobacterium tumefaciens*. However, new techniques have been developed and are revolutionizing plant functional genomics such as virus-derived plant episomal plasmids. These vectors do not integrate in to the host plant genome and are not inheritable. The vectors consist of a modified virus capable of spreading to all tissues of the treated plant without causing disease and leading to the systemic expression of the gene of interest without the need of obtaining transgenic plants. This work aimed to transfer the resistance against *V. inaequalis*, granted by the *Vf2* gene, to Fuji and Gala apple susceptible cultivars, by using plant plasmids based on TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl virus). The resistance gene *Vf2* derived from *Malus floribunda* 821 was cloned on expression vectors and injected to Maxi Gala and Fuji Suprema plants. The plasmid DNA was systemically detected on treated plants and remained stable for at least 8 months. The expression of the *Vf* gene was quantified by RT-qPCR and several plants presented high levels of *Vf2* expression. These plants were challenged by spores of *V. inaequalis* and the majority of the treated plants displayed scab resistant phenotypes. The *Vf2* introgression based on plant plasmids was shown to be effective on transferring genetic material systemically to the apple cultivars tested. The plasmids were detected on treated plants during the whole evaluated time of this study (8 months), and the resistance gene expression was detected on several individuals. Our study reinforces the applicability of such technique in woody perennial plants and gives the possibility for fast introgression of other characteristics of interest dependent on genes with diverse biotechnological potential.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cultura da macieira

A macieira pertence à família Rosaceae, subfamília Pomoideae e gênero *Malus*. A macieira cultivada é denominada *Malus x domestica* Borkhausen, é uma frutífera lenhosa, decídua, de clima temperado, muito adaptável a diferentes climas, desde trópicos a altas latitudes. A Ásia central é considerada o centro de diversidade e dispersão deste gênero (Petri, 2006).

A macieira possui características típicas de árvores frutíferas de clima temperado. Possui um longo período de juvenilidade sendo, em média, de três a quatro anos até o início da produção de frutos. A planta tem como característica o porte pequeno a médio e caducifolia. Todos os brotos têm origem nas gemas, que podem estar dispostas ao longo dos ramos longos (maiores que 20 cm) ou ramos curtos, brindilas (entre 5 e 20 cm) e esporões (até 5 cm). Quanto à posição, estes podem ser apicais, na ponta dos ramos, ou laterais, na axila da folha. As flores se dispõem em inflorescências hermafroditas, com reprodução predominantemente alógama, onde ocorre fecundação cruzada entre plantas diferentes. A autoincompatibilidade faz com que seja necessária a polinização cruzada, a qual é realizada por insetos. Devido a estas características, pomares comerciais devem conter uma proporção de cultivar polinizadora, além da presença de insetos vetores de pólen para garantirem a produção de frutos. O fruto é um pomo variável em tamanho, coloração da epiderme, forma, textura e sabor da polpa (Petri *et al.*, 2006).

A frutificação e a produção estão associadas ao desenvolvimento adequado de gemas, que depende, entre outros fatores, de condições climáticas adequadas para superação da dormência (Petri *et al.*, 2006). Temperaturas baixas contínuas nos meses de inverno são fundamentais para que a planta inicie um novo ciclo vegetativo na primavera, com brotação e floração normais (Horvath *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 1987; Petri *et al.*, 2006). Além das baixas temperaturas no inverno, as condições climáticas na primavera influenciam na produção, como geadas tardias e temperaturas baixas que podem afetar negativamente o desenvolvimento dos frutos (Petri *et al.*, 2006).

A macieira é uma das frutíferas mais cultivadas mundialmente e, economicamente, é a quarta mais importante ficando atrás de citrus, uva e banana. O Brasil encontra-se entre os vinte maiores produtores mundiais de maçã (FAO, 2015). Segundo a Associação Brasileira dos Produtores de Maçã (2015), a produção de maçã na safra 2013/2014, foi de 1,16 milhões de toneladas. A região sul do país é responsável pela maior parte da produção nacional, sendo o estado de Santa Catarina o maior produtor com 52,6%, seguido pelo Rio Grande do Sul

responsável por 43,9% da produção, e Paraná com 3,5% (ABPM, 2015). A produção é concentrada em poucas cultivares, sendo que na safra 2009/2010, as cultivares Gala, Fuji e clones de seus mutantes somáticos responderam por 94,6% da produção do país (Fioravanzo *et al.*, 2010).

A maioria das espécies *Malus* sp. é de fácil hibridização, o que pode explicar a contribuição de espécies europeias e asiáticas para a evolução das cultivares atuais (MacHardy *et al.* 2001). A macieira apresenta 17 cromossomos haplóides, sendo que a maioria das espécies cultivadas é diplóide, embora haja algumas exceções de espécies triplóides e tetraplóides (Petri *et al.*, 2006).

1.2 À sarna da macieira

À sarna da macieira, causada pelo fungo ascomiceto *Venturia inaequalis* (Cke.) G. Wint. é uma das principais doenças nos países produtores, sendo a mais importante em clima temperado e úmido (MacHardy, 1996; Jha *et al.*, 2009; Bus *et al.*, 2011). Os sintomas são bastante típicos e se manifestam nas folhas, flores, ramos, pedúnculos e frutos. Quando a infecção ocorre nas folhas, se manifesta através de manchas verde-oliva e quando manifestada nos frutos, provoca rachadura, deformação e sua queda prematura. Tais danos causam a redução do vigor das plantas e depreciação do valor comercial das maçãs. Em regiões onde a primavera e o verão apresentam alta umidade e temperatura amena, como ocorre no Sul do Brasil, essa doença pode causar perdas de até 100% na produção dos pomares (MacHardy, 1996; Petri *et al.*, 2006; Boneti e Katsurayama, 2013).

1.2.1 Agente causal – *Venturia inaequalis*

Venturia inaequalis (Cke.) Wint. é o agente causador da sarna da macieira. É um fungo ascomiceto filamentosso pertencente à família Venturiaceae, cuja fase anamorfa corresponde à *Spilocaea pomi* Fr (MacHardy, 1996; Boneti *et al.*, 2001; Beck *et al.*, 2005). O gênero *Venturia* consiste principalmente de espécies fitopatogênicas que atacam importantes frutíferas com valor comercial, e possui 52 espécies associadas com as fases anamorfias *Spilocaea*, *Fusicladium* e *Cladosporium*. A separação do gênero é baseada em critérios morfológicos e sua identificação é auxiliada pela especificidade em relação ao hospedeiro exibida em cada espécie (Sivansén, 1977; Jha, 2009).

O fungo produz uma estrutura reprodutiva de formato globoso, denominada de pseudotécio, nas folhas velhas caídas sobre o solo. Os pseudotécios podem estar agrupados ou dispersos, medem 90-160 μm de diâmetro, são ligeiramente papilados no ostíolo e com setas medindo 25-75 μm . Os ascos, 50 a 100 por pseudotécio, são longos, cilíndricos, bitunicados, medem 55 a 75 x 6 a 12 μm e contêm oito ascósporos. Os ascósporos são septados na terça parte superior, hialinos quando novos e castanho-claros quando maduros. A parte superior apresenta um formato cônico e a inferior arredondada. O tamanho desigual das duas células deu origem ao nome do fungo. Na sua fase anamorfa, apresenta micélio hialino quando jovem, o qual escurece com o passar do tempo formando um estroma subcuticular ou intraepidermal. Os conidióforos, formados a partir do estroma, são curtos, eretos, intumescidos na base e de cor castanha. Apenas um conídio (12 a 22 x 6 a 9 μm) é formado na ponta de cada conidióforo. Durante a primavera, os conídios são produzidos nas lesões, sobre a superfície das folhas e frutos (Figura 1; Boneti *et al.*, 2001; Petri *et al.*, 2006).

Venturia inaequalis é um fungo hemibiotrófico e possui um ciclo de vida caracterizado por duas fases distintas: fase saprófita ou sexuada, a qual ocorre no outono e inverno, período de dormência da macieira, em folhas caídas sobre o solo. A fase parasitária ou assexuada ocorre na primavera e verão, período vegetativo da macieira (Figura 1). Vários ciclos de infecções (primário e secundário) podem ocorrer durante a mesma estação na mesma planta (MacHardy *et al.*, 2001; Browen *et al.*, 2011).

No outono ocorre a queda natural das folhas e a morte celular. Nessa fase o micélio penetra profundamente os tecidos do hospedeiro e começa o processo de formação dos pseudotécios. O fungo é tipicamente heterotático e assim, o anterídio e ascogônio precisam ser originários de indivíduos distintos (Jha *et al.*, 2009). O pseudotécio é formado durante o período do outono e inverno com temperatura ideal de 4 °C. Em temperaturas superiores a 15 °C observou-se a não formação do pseudotécio. Além disso, a ausência de umidade também é um fator limitante na formação dos pseudotécios (Petri *et al.*, 2006).

No final do inverno e início da primavera a infecção primária é iniciada por ascósporos (esporos sexuais) que são liberados por precipitação de pseudotécios com temperaturas ideais de 16 a 18 °C, não ocorrendo em temperaturas superiores a 24 °C. O amadurecimento dos pseudotécios e ascósporos é de forma intermitente (James e Sutton, 1982; Boneti *et al.*, 2001). Os ascósporos maduros são liberados e disseminados, principalmente, em períodos chuvosos durante o dia (MacHardy *et al.*, 2001; Stensvand *et al.*, 2009).

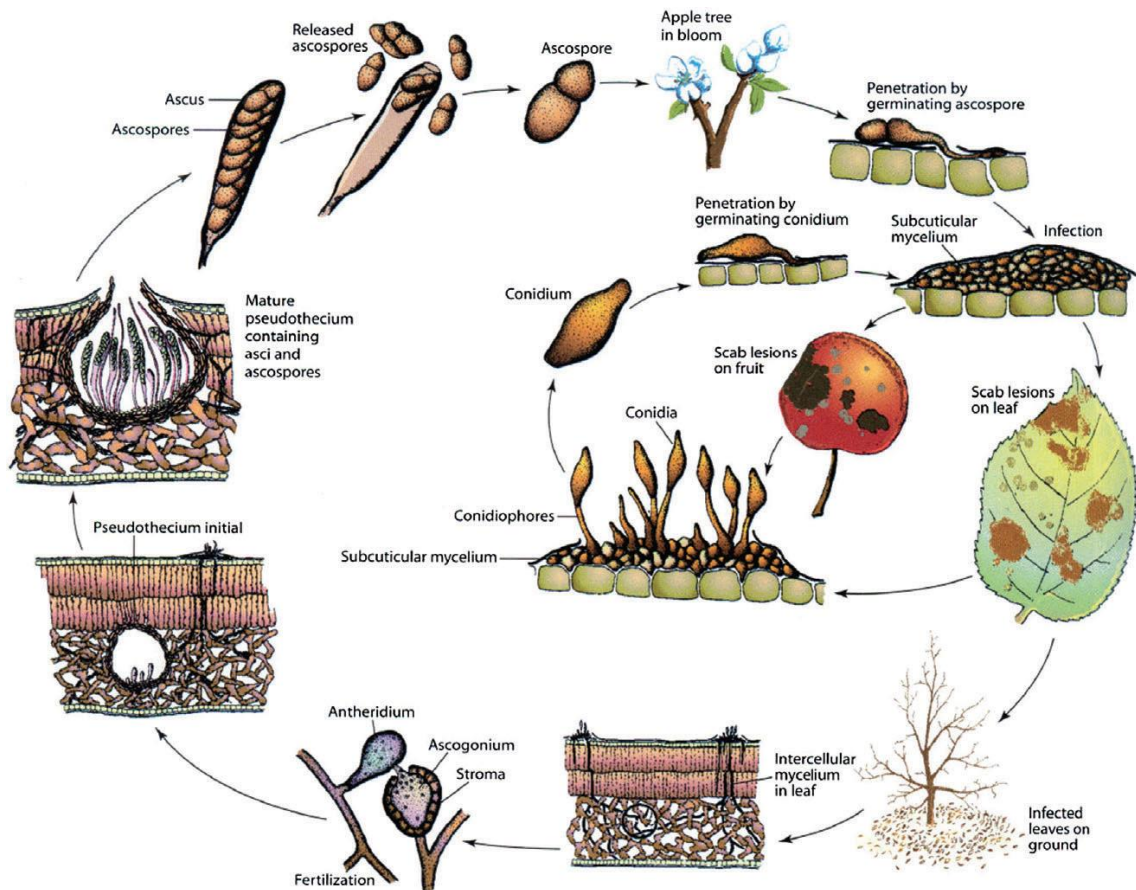


Figura 1: Ciclo de vida de *Venturia inaequalis*, agente causal da sarna da Macieira (Browen *et al.*, 2011).

Os ascósporos se fixam na superfície hidrofóbica da folha e germinam através da produção do tubo germinativo, e em sua extremidade há a formação de um apressório. Este se fixa firmemente na superfície do hospedeiro e produz uma hifa de penetração delgada, a qual perfura a cutícula e a parede externa das células da epiderme das folhas e frutos, e se estabelece subcuticularmente e de forma ramificada. Cerca de 9 a 17 dias após, é produzido sob a cutícula um grande número de conídios, os quais, por pressão, provocam o rompimento das células e, então, surgem as lesões típicas da sarna. A expansão máxima das lesões ocorre a 19 °C, sendo que pouca expansão é observada abaixo de 0 °C ou acima de 26 °C. A produção de conídios só ocorre quando a umidade relativa do ar é maior que 60% (Jones e Sutton, 1984; Petri *et al.*, 2006).

Durante a fase vegetativa podem ocorrer vários ciclos da doença os quais dependem do número de períodos de infecção e da presença de tecido suscetível do hospedeiro. Segundo Mills (1944) o período de umidade e a temperatura estão diretamente relacionados à severidade da infecção.

Os conídios são os responsáveis pela infecção secundária. A água é o principal fator de disseminação do patógeno, pois provoca o inchamento dos conidióforos e a imediata liberação dos conídios. Estes são carregados pelos respingos de água e pelo vento para outras partes das plantas onde, havendo água livre, começam a germinar e penetrar nos tecidos de modo similar ao dos ascósporos (Petri *et al.*, 2006; Boneti *et al.*, 2001). A suscetibilidade das folhas e frutos diminui com o aumento da idade, adquirindo resitência ontogênica (Schwabe *et al.*, 1984; Xu e Robinson, 2005).

1.2.2 Sintomas

Os sintomas da sarna da macieira são bastante típicos e manifestam-se principalmente na parte aérea da planta, incluindo folhas, pecíolos, pedúnculos, flores, brotos jovens e frutos. As lesões inicialmente possuem a coloração olivácea e irregular e logo após, devido à produção de conídios, tornam-se cinza com a superfície aveludada. Em seguida, as lesões passam a cor preto-metálica e podem ser levemente elevadas. Geralmente, as primeiras lesões são vistas na face abaxial das folhas expandidas, porém, uma vez abertas, a face adaxial também se torna vulnerável à infecção. (MacHardy, 2001; Petri *et al.*, 2006). As lesões possuem forma circular e isoladas ou podem coalescer, espalhando-se por toda a superfície foliar. Quando a infecção é severa, podem afetar o pecíolo, causando a queda precoce das folhas. Nos frutos pequenos a infecção provoca rachadura, deformação, além da sua queda prematura (Figura 2). Os frutos em fase de maturação apresentam lesões circulares e coloração escura. Nesta fase, uma vez infectados, as lesões continuam a se desenvolver durante o período de armazenagem na câmara frigorífica. Além disso, quando os pedicelos são infectados, pode haver a queda dos frutos em desenvolvimento, resultando na diminuição da produção. Quando atingem a maturidade, se tornam mais resistentes e as lesões se desenvolvem mais lentamente, e muitas vezes não são visíveis no momento do armazenamento. Além disso, a infecção pode causar desfolhação por dois ou três anos consecutivos e resultar em plantas enfraquecidas, mais suscetíveis a insetos e outras doenças. A redução na qualidade dos frutos e produtividade dos pomares se torna a maior perda econômica para os produtores, pois leva a depreciação do seu valor comercial (Jha *et al.*, 2009; Petri *et al.*, 2006).



Figura 2: Frutos da cultivar Gala com lesões severas da sarna da macieira no pomar localizado na Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado, Vacaria – RS. Foto: Dr. Paulo Ricardo Dias de Oliveira.

1.2.3 Interação entre *Venturia inaequalis* e *Malus spp.*

A interação entre *V. inaequalis* e *Malus* foi relatada primeiramente por Nusbaum e Keitt (1938). A germinação dos conídios e ascósporos frequentemente ocorre na extremidade apical da planta, quando a folha possui um filete d'água e temperatura favorável. Os esporos se fixam e germinam através de um tubo germinativo que adere a cutícula pela mucilagem, a qual é composta de proteínas e carboidratos (Smereka *et al.*, 1988; Schumacher *et al.*, 2008). Em sua extremidade ocorre a formação de um apressório e sua parede não é muito melanizada, embora possua um anel de melanina em sua base. A penetração não ocorre de maneira mecânica, mas sim pela hidrólise enzimática da cutícula (Steiner e Oerke, 2007; Smereka *et al.*, 1988). Uma vez que a cutícula é penetrada, ocorre a formação de hifas subcuticularmente (Kucheryava *et al.*, 2008). *V. inaequalis* parece ter se adaptado para colonizar o espaço apoplástico subcuticular na fase biotrófica de crescimento. O hospedeiro não sofre danos durante o desenvolvimento do fungo no estroma, quando ocorre o rompimento da cutícula. Os danos parecem ocorrer na fase de esporulação nas células epidérmicas do mesófilo foliar que sofrem um esgotamento progressivo dos plastídeos e citoplasma, com um aumento da vacuolização. Esse processo leva à necrose, que é possivelmente efetuada pela degradação parcial da parede celular no final do ciclo de infecção (Nusbaum e Keitt, 1938; Valsangiacomo e Gessler, 1988; Machardy, 1996).

1.2.4 Controle da sarna da macieira

A maioria das cultivares de macieira comerciais apresenta algum nível de suscetibilidade à sarna. O uso de fungicidas ainda se constitui no principal método de controle. Os fungicidas podem ser aplicados sistematicamente seguindo o calendário com base na fenologia da planta. As aplicações iniciam-se na fase de brotação da macieira, posteriormente, as pulverizações de misturas de fungicidas são repetidas nos estádios da planta sem folhas, início da floração, queda de pétalas e frutificação efetiva. A partir deste estágio, geralmente, as pulverizações são realizadas com fungicidas protetores a cada 15 dias até o final de dezembro, e a cada 21 dias a partir de janeiro até final de fevereiro. Além deste, outro sistema bastante utilizado é seguindo a fenologia da macieira, a liberação de ascósporos e a ocorrência dos períodos de infecção (Petri *et al.*, 2006). Segundo Szkolnick (1981), para a utilização do sistema, deve-se levar em conta a ação ou atividade do fungicida sobre o desenvolvimento da sarna, sendo classificada como: atividade pré-infecção (ação protetora); atividade pós-infecção (ação curativa); atividade pré-sintoma (ação curativa) e atividade pós-sintoma (ação erradicante). No Brasil, as pulverizações são realizadas em grandes volumes, com um gasto aproximado de 1.300 a 1.500L/ha de calda (Petri *et al.*, 2006).

Para diminuir a quantidade de aplicações de fungicidas, o método ideal de controle da sarna da macieira ainda é a adoção de cultivares resistentes. Atualmente já existem no mercado várias cultivares resistentes obtidas através do melhoramento genético. Entretanto, a maioria das cultivares resistentes pertence a variedades que não apresentam as características agrônômicas desejadas pelos consumidores brasileiros.

1.2.5 Formas de resistência a *V. inaequalis*

A suscetibilidade geralmente está associada com o crescimento de um patógeno em um hospedeiro. No entanto, com *V. inaequalis*, as lesões nas folhas de macieira atingem um raio de no máximo 2cm a partir do ponto de infecção (MacHardy, 1996). E isso ocorre pela expressão da resistência ontogênica, ou seja, de acordo com o estágio de desenvolvimento dos frutos e folhas há uma maior ou menor resistência ao patógeno. As lesões visíveis em folhas totalmente expandidas são o resultado da infecção quando a folha ainda é jovem, não totalmente expandida. Quando a folha se torna totalmente expandida, a resistência ontogênica começa a se expressar, levando a inibição da infecção ou o crescimento micelial (MacHardy, 1996). Com

isso, espera-se que em folhas totalmente expandidas não haja o aparecimento de novas lesões no outono. Entretanto, tem se observado um número considerável de lesões de sarna durante o outono, que podem ser resultado de infecções inibidas, ou também de novas infecções (Kohl e Kollar, 1994).

Os conídios de *V. inaequalis* podem infectar a superfície das folhas de macieira em qualquer idade devido ao crescimento micelial em folhas senescentes. Em folhas jovens, o crescimento do micélio é mais rápido e os sintomas são visíveis antes das folhas maduras. Já em folhas totalmente expandidas, o micélio cresce lentamente e em quantidade insuficiente para apresentar sintomas visíveis, embora algumas destas lesões possam produzir conídios. Ou seja, a resistência ontogênica não impede completamente que os conídios infectem ou penetrem nas folhas (Li e Xu, 2002).

Já é bem estabelecido que a interação entre *V. inaequalis* e macieira ocorre em conformidade com o conceito de gene-por-gene (Flor, 1971; Bus *et al.*, 2005; 2011). Neste cenário, a defesa é ativada pela percepção da planta à ação do patógeno e é mediada por genes de resistência (*R*) que reconhecem patógenos que possuam um gene correspondente de avirulência (*avr*). Contudo, se a planta ou o patógeno não apresentarem estes genes correspondentes, a susceptibilidade da planta à infecção ocorre à medida que as respostas de defesa não são ativadas em tempo ou intensidade necessárias (Vlot *et al.*, 2009).

A especialização fisiológica de *V. inaequalis* vem sendo estudada há muitos anos e um sistema de diferenciação e denominação das raças foi desenvolvido para facilitar a obtenção e a apresentação destas informações (Shay e Williams, 1956; Bus *et al.*, 2011). As raças fisiológicas são um tipo de especialização intra-específica, em que os isolados com virulência diferencial atacam somente alguns acessos da espécie hospedeira (Flor, 1971). Até o momento são conhecidas oito raças fisiológicas, denominadas raças 1 a 8, sendo que, no Brasil, se tem conhecimento apenas da raça 1 (Schenato *et al.*, 2008).

1.3 Caracterização do gene de resistência à sarna da macieira

Para identificar o gene responsável pela resistência à sarna da macieira foi utilizada uma abordagem de clonagem baseada em mapas determinado pela distância física entre dois marcadores próximos e foi realizada utilizando uma biblioteca de cromossomo artificial bacteriano para a cultivar Florina (Patocchi *et al.*, 1999). Esta técnica possibilitou a obtenção de uma sequência contínua que abrange a região genômica entre o *Vf* e os marcadores (Patocchi *et al.*, 1999; Vinatzer *et al.*, 1998). Vinatzer *et al.* (2001) identificou um grupo de quatro genes do tipo

receptor-like com homologia a família de genes do tomateiro associado a resistência à *Cladosporium fulvum*. Estes genes foram denominados *HcrVf1*, *HcrVf2*, *HcrVf3* e *HcrVf4*. A estrutura da sequência de aminoácidos codificadas por estes genes contem um domínio extracelular de repetição rica em leucina (LLR) e um domínio transmembrana com um elevado nível de dissemelhança na região de LLR. A transcrição dos genes *HcrVf1*, *HcrVf2* e *HcrVf4* é constitutiva e completa, exceto para *HcrVf3* que não é funcional e sua sequência é truncada. Esses mesmos genes foram identificados na região de resistência da espécie silvestre *M. floribunda* 821 e são denominados *Vf1*, *Vf2*, *Vf3* e *Vf4* (Xu e Korban, 2002).

Estudos de perfis de expressão diferencial foram realizados entre os quatro parálogos (Barbieri *et al*, 2003; Belfanti *et al*, 2004), além de ensaios com transformação genética (Joshi, 2010; Szankowski *et al*, 2009; Malnoy *et al*, 2008). Com base nesses estudos o gene *Vf1* e *Vf4* não apresentam desempenhar qualquer função de resistência à sarna da macieira, enquanto que *Vf2* proporciona um grau variável de resistência, embora seja semelhante a resistência encontrada em *M. floribunda*. Além disso, o gene é expresso constitutivamente em plantas transgênicas sob o controle das sequências do seu próprio promotor, semelhante a cultivares obtidas pelo melhoramento clássico. O gene *Vf2* reconhece todas as raças da sarna da macieira exceto a 6 e 7 (Joshi, 2011; Silfverberg *et al* 2005). Portanto, o gene *Vf2* em plantas transformadas possui funções semelhantes as cultivares obtidas pelo melhoramento clássico e a cascata de mecanismos de resistência presente nas cultivares suscetíveis permanece intacta e funcional. Entretanto, os mecanismos de resistência de *Vf2* ainda não são compreendidos e ainda nenhuma via de defesa foi identificada (Gessler e Pertoto, 2012).

1.4 Plataforma TraitUp™ IL-60

A plataforma TraitUP™ é um sistema transiente não transgênico comercializado pela empresa Morflora Inc. Esse sistema de expressão é denominado IL-60 derivado do *Tomato Yellow Leaf Curls Virus* (TYLCV), um geminivírus de DNA de fita simples com grande variedade de hospedeiros (Peretz *et al*, 2007). Este sistema é baseado no vírus modificado em sua forma desarmada que impede a produção do DNA de fita simples e assim o capsídeo viral não é formado e a planta não apresenta os sintomas da doença. Este sistema consiste em dois plasmídeos vegetais não herdáveis, o *helper* (p1470) e de expressão (pIR). O plasmídeo p1470 contem os genes do vírus que permitem a mobilidade pela planta e o plasmídeo pIR contem uma região intergênica (IR) que funciona como origem de replicação eucariótica além de agir como um promotor bidirecional que permite a expressão do gene de interesse. A inoculação

dos plasmídeos vegetais é realizada de forma mecânica, sendo aplicados diretamente na planta. Os plasmídeos propagam-se nas células vegetais e distribuem-se pela planta progressivamente pelo floema (Gover *et al*, 2014) levando à expressão constitutiva e sistêmica do gene de interesse por toda a planta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Aplicar a técnica de expressão utilizando a plataforma TraitUP™ derivada do vírus TYLCV para a obtenção de plantas de macieira (*Malus × domestica*) das cultivares Fuji e Gala resistentes à sarna através da superexpressão do gene *Vf2* de *Malus floribunda* 821.

2.2 Objetivos Específicos

- Revisar a literatura referente às técnicas biotecnológicas aplicadas ao melhoramento da macieira visando maior resistência à sarna da macieira.
- Clonar o gene *Vf2* derivado de *Malus floribunda* 821 e gerar construções para sua expressão nos plasmídeos TraitUP™.
- Inocular mudas das cultivares de macieira Fuji Suprema e Maxi Gala com vetores de expressão contendo o gene *Vf2*.
- Detectar a presença sistêmica dos plasmídeos nas plantas de macieira.
- Confirmar a eficácia dos plasmídeos vegetais em expressar o gene *Vf2* e conferir a resistência à sarna nas cultivares analisadas.
- Testar a patogenicidade do fungo *Venturia inaequalis* nas plantas obtidas.

**3 NEW BIOTECHNOLOGICAL TOOLS TO ACCELERATE SCAB RESISTANCE
TRAIT TRANSFER TO APPLE**

Manuscrito submetido ao periódico 'Genetics and Molecular Biology'

Review Article

Title

New Biotechnological Tools to Accelerate Scab Resistance Trait Transfer to Apple

Authors

Roberta Cusin¹, Luis Fernando Revers² and Felipe dos Santos Maraschin^{1*}

¹Plant Physiology Laboratory, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Brazil. E-mail: betacusin@gmail.com; felipe.maraschin@ufrgs.br

²Laboratory of Plant Molecular Genetics, Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Bento Gonçalves, Brazil. E-mail: luis.revers@embrapa.br

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: felipe.maraschin@ufrgs.br

Abstract

The apple is a fruit crop cultivated worldwide. Apple orchards are exposed to a diverse set of environmental and biological factors that affect the productivity and sustainability of the culture. Many of the efforts and costs for apple production rely on reducing the incidence of fungal diseases, and one of the main diseases is apple scab caused by the fungus *Venturia inaequalis*. The economic impact of scab on apple productivity has guided many breeding programs to search for cultivars resistant to apple scab. Introgression from wild relatives has been successful to some extent, and genetic engineering for resistant cultivars has even been employed. This review presents the techniques used to the present time to obtain pathogen-resistant apple cultivars and introduces new biotechnological approaches based on plant plasmids that show promising results for delivering genetic traits with a short-term perspective.

Keywords: *Malus*, *Venturia inaequalis*, biotic stress, transformation.

1. Introduction

The cultivated apple belongs to the Rosaceae family, the Maloideae subfamily, and the farmed apple tree is known as *Malus x domestica* Borkhausen (Harris et al., 2002). Such culture is susceptible to several pathogens, and their control is achieved mainly through chemical control. However, their inadequate or excessive use may contaminate the environment and harm human health. Furthermore, prolonged use of these products may result in selection pressure of the pathogenic agent, inducing the appearance of resistant isolates.

Plants possess natural defenses against a diverse range of pathogens. The *Malus* genus has coevolved with its pathogens, and many accessions harbor resistance genes that are exploited for introgression from wild relatives in apple breeding programs (Kumar et al., 2010; Laurens et al., 2011). The breeding of apples resistant to scab is a genetically-based strategy. Scab is the most important disease in terms of economic cost in apple orchards worldwide. *V. inaequalis* develops in the fallen leaves of apple trees. The infection starts in the spring and early summer. The pathogenic phase starts with the germination of ascospores (sexual spores), which serve as the primary source of inoculum. Conidia (asexual spores) serve as a source for secondary infection. Several cycles of conidial production and secondary infections occur within a single apple growing season (MacHardy et al., 2001). Scab causes deformation in the shape and size of the fruits, leaves, and premature fall of the fruit. The breeding programs follow, in general, a common strategy, which establishes a series of backcrossings between resistant hybrids and susceptible commercial cultivars. Usually, the source of resistance genes comes from sexually compatible apple wild relatives. This process is very time-consuming and demands several generations to recover near isogenic lines of high commercial value expressing the desired trait. In the apple, self-incompatibility turns breeding into an even more difficult endeavor as the elite varieties might not be recovered by crossing. As a result, strategies able to directly transfer traits to elite cultivated varieties would drastically accelerate the process.

2. The genetics of scab resistance

The *V. inaequalis*-*Malus* interaction has been known for a long time (Boone and Keitt; Williams and Shay, 1957). Since the early days of apple resistance breeding, several sources of resistance genes have been described in the apple germplasms (Bus et al., 2011).

The interaction between *V. inaequalis* and the *Malus* *Vg*, *Vf*, and *Vh8* genes occurs in accordance to the gene-for-gene concept (Flor, 1971; Bus et al., 2005; 2011). In this regard, the

Vf of *Malus floribunda* was the first gene to successfully undergo the process of introgression in *Malus × domestica*. The *Vf* locus has been widely adopted in the improvement programs toward the resistance against the apple tree scab (Crosby et al., 1992; Xu and Korban, 2002).

A cluster of four receptor-like sequences has been identified at the *Vf* locus, and these sequences are homologs to the *Cf* resistance genes from tomato. Three of the *Vf* genes, designated *Vfa1*, *Vfa2*, and *Vfa4*, have intact ORFs, whereas *Vfa3* is truncated and considered a pseudogene (Xu and Korban, 2002). The overexpression of the *Hcrvf2* (*Vfa2*) gene, under the control of the constitutive promoter CaMV35S, was sufficient to confer scab resistance to a susceptible apple cultivar Gala (Belfanti et al., 2004). However, this resistance is specific to *V. inaequalis* races 1 to 5, but not toward race 6 (Jha et al., 2009). It was also shown that when the *Vfa2* gene was expressed under the control of its own promoter, it conferred partial resistance to *V. inaequalis* in Galaxy and McIntosh cultivars (Xu and Korban, 2002). In addition, the *Vfa1* gene is capable of conferring partial resistance in susceptible cultivars races 1 to 5. This shows that these two genes are involved in resistance to *V. inaequalis*, while the *Vfa4* gene is not involved in resistance (Malnoy et al., 2008).

Breeding programs have extensively studied resistance genes against apple scab worldwide. A new naming system was proposed based on the international standard *Arabidopsis* genes. The names of major *R* genes start with *R* and contain an abbreviation of the pathogen *V. inaequalis* to give the locus general prefix *Rvi*. To date, 17 genes have been described: the *Vg* (*Rvi1*) was identified in the cultivar Golden Delicious; *Vh2* (*Rvi2*) in TSR34T15; *Vh3* (*Rvi3*) in Geneva; *Vh4*, *Vx* and *Vr1* (*Rvi4*) in TSR33T239; *Vm* (*Rvi5*) in 9-AR2T196; *Vf* (*Rvi6*) and *Vfh* (*Rvi7*) in *Malus floribunda*; *Vh8* (*Rvi8*) in *M. sieversii*; *Vdg* (*Rvi9*) in K2; *Va* (*Rvi10*) in A723–6^b; *Vbj* (*Rvi11*) in *M. baccata jackii*; *Vb* (*Rvi12*) in Hansen's *baccata*; *Vd* (*Rvi13*) in Durello di Forlì; *Vdr1* (*Rvi14*) in Dulmener Rosenapfel^b; *Vr2* (*Rvi15*) in GMAL 2473; *Vmis* (*Rvi16*) in MIS op 93.051 G07–098^b, and *Val* (*Rvi17*) in Antonovka APF22^b [7] (Bus et al., 2011).

3. Transformation and genetic modification of apple

Traditional apple breeding is a slow process, because of the long juvenile phase and high degree of genetic heterozygosity present in this perennial fruit tree. For the breeding of almost all scab-resistant cultivars, the focus has been mainly on the *Vf* gene (Gessler and Pertot, 2012). Once scab resistance still primarily relies on *Vf*, genes from other sources will be needed to overcome resistance breakdown over time. Alongside the classical breeding programs, in the past decades, several apple genetic modification strategies have been developed for obtaining

scab-resistant varieties. Recent advances in genomics have allowed apple genetic transformation to become a promising technology for the acceleration of development of elite cultivars of apple (Gessler and Patocchi, 2012).

The resistance gene *HcrVf2/Rvi6* was transferred by *Agrobacterium tumefaciens* to susceptible apple cultivars (Barbieri et al., 2003; Belfanti et al., 2004; Silfverberg-Dilworth et al., 2005; Malnoy et al., 2008), and further attempts even led to the attainment of cisgenic resistant plants carrying *HcrVf2/Rvi6* (Joshi et al., 2011; Vanblaere et al., 2011, 2014) and even not carrying any foreign DNA nor selection markers (Krens et al., 2015). Several other scab resistance genes have been mapped; however, only *Vr2/Rvi15* (Bus et al., 2011) has been functionally characterized and conferred scab resistance to the 'Gala' cultivar (Shouten et al., 2014).

Although these approaches have successfully delivered the introgression of the *Vf* gene, the sole use of *Vf* in scab-resistance breeding programs and in GM plants is not advisable. The appearance of new virulent fungal races is continuous in a perennial orchard, and pyramiding diverse disease resistance mechanisms could help to improve disease management strategy. As stated by Gessler and Pertot (2012), the major bottleneck for new resistance breeding is the lack of cloned resistance genes in *Malus*. From the publication of the first draft genome of apple in 2010 (Velasco et al., 2010), there is still much work remaining to associate resistance phenotypes to linkage groups, and finally to cloned resistance genes.

Many efforts have focused on the utilization of genes from other source species in order to confer more broad resistance traits not dependent on pathogen race recognition. Some attempts in this direction have been reported using heterologous genes, known for their antifungal activity, such as genes from the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* (formerly *T. harzianum*). This fungus produces many chitinolytic enzymes including endochitinase, which randomly cleaves chitin, a major component of the fungal cell wall. One *Trichoderma atroviride* endochitinase encoded by the *ech42* gene inhibits the germination of spores and hyphae elongation. One study obtained several transgenic lines of the scab-susceptible apple McIntosh cultivar with varying expression levels of the *ech42* gene (Bolar et al., 2000). Some transgenic lines showed an increased resistance *V. inaequalis* with constitutive expression of fungal endochitinase. However, these lines with high endochitinase activity displayed reduced plant vigor. Similar results were also observed when the *ech42* gene was introduced in Galaxy and Ariane apple cultivars alone or co-transformed with the *T. atroviridae* exochitinase *nag70* (Bolar et al., 2001). This reduction in plant vigor seems to be related to the high lignin content and higher peroxidase and glucanase activities in the transgenic lines (Faize et al., 2003).

The antifungal wheat protein puroinduline B (*pinB*), a member of plant lipid transfer proteins (LTPs), was expressed in Ariane (an apple cultivar carrying *Vf*), which is resistant to races 1 - 5 *V. inaequalis*, and Galaxy, which is susceptible to all races. In these experiments, both Galaxy and Ariane *pinB* overexpressors displayed enhanced resistance to scab (Faize et al., 2004). This suggests that the combination of diverse resistance strategies can improve the field performance of these plants where they are exposed to a wide diversity of pathogens. Besides apple scab, genes conferring resistance to fire blight (Liu et al., 2001; Borejsza-Wysocka et al., 2007; Malnoy et al., 2007; Brogginini et al., 2014), *Alternaria* blotch (Fan et al., 2011), and powdery mildew (James et al., 2004; Caffier and Parisi, 2007; Chen et al., 2012) have been described, and many more can be readily tested in transient assays with virus-derived vectors instead of generating apple transgenic plants for testing each gene.

To advance the selection of new apple cultivars, another challenge is to shorten the long duration of the apple tree juvenility. This juvenile phase can last between 4 and 10 years. The first fast cycle breeding program using the effective introgression of *BpMADS4*, a flowering gene from European silver birch (*Betula pendula* Roth.) (Flachowsky et al., 2007), resulted in an early flowering phenotype in 'Pinova' (Flachowsky et al., 2011), 'Gala', 'Mitchgla Gala', and 'Santana' (Weigl et al., 2015) cultivars. Besides, silencing of *MdTFL1* gene expression inhibits vegetative growth and accelerates flower development (Flachowsky et al., 2012). The transformation and plant regeneration process is a lengthy and costly process, usually with a low efficiency rate, but many efforts have made it feasible in apple, with a large set of transgenic lines described (Aldwiinckle and Malnoy, 2009). Commercial apple varieties are difficult to breed with new characteristics, as each time one introduces a new trait by crossing, a completely new genotype with new characteristics will be generated. Self-incompatibility in the apple does not allow simple backcrossings, and time-consuming pseudo-backcrossings lead to a delay in trait delivery. Consequently, biotechnological tools able to transfer resistance into already-cultivated cultivars would be an excellent opportunity to accelerate resistance breeding.

Moreover, if not a single gene (single trait) but several have to be crossed, or several genes for a single trait to achieve durable resistance, then the hurdles to breed such a multigenic combination into apple by conventional breeding becomes a nearly impossible task.

4. Technological strategies using transient virus

An alternative method to achieve genetic transformation and transgenic plants for trait delivery relies on plant viruses. Apple latent spherical virus (ALSV) is an infectious plant virus

capable of spreading through infected cells without inducing any diseases. Initially used for experiments for VIGS (Virus-Induced Gene Silencing) in herbaceous plants, the ALSV vector is capable of sustaining uniform silencing phenotypes and their persistency for several months (Igarashi et al., 2009). Apple seedlings were inoculated with *rbcS*-ALSV, and the phenotype of systemic silencing persisted for more than three months in most infected plants (Sasaki et al., 2011). Thus, the VIGS system using ALSV vectors can induce both VIGS and gene overexpression in apple seedlings as efficiently and persistently as in herbaceous plants (Yamagishi et al., 2014). Furthermore, ALSV has been modified to express genes to confer desirable traits such as early flowering (Sasaki et al., 2011; Yamagishi et al., 2011). Apple trees have a long juvenile life, turning genetic analysis into a very time-consuming process and delaying the development of new varieties through conventional breeding. A construct of a modified ALSV vector (*ALSV-AtFT/MdTFL1-1*) designed to express the *Arabidopsis thaliana* florigen protein FLOWERING LOCUS T (*AtFT*) and suppress the expression of TERMINAL FLOWER 1 (*MdTFL1-1*) was delivered by biolistic inoculation to germinated apple seeds where it was able to reduce the flowering period to approximately 1 year. In addition, it was verified that the ALSV vector was not transmitted to the majority of the successive progenies (Yamagishi et al., 2014). This technique might have a major impact on the acceleration of breeding programs, as it does not involve the genetic modification of the host plant and allows both overexpression and silencing of trait genes. One of the major drawbacks of this system is the use of a full-length infectious virus that needs to be maintained and propagated in host plants. The insert size limitation is usually related to viral genomes' capacity and, besides, the method of administration relies on biolistics of the mature viral RNA, which can be methodologically laborious.

5. New perspectives: Plant episomal plasmids

During the past decade, many developments have occurred in the plant biotechnology field. For perennial plants, one of the most interesting and overlooked has been the expression system based on episomal plant plasmids. The system, called IL-60, is derived from the Tomato Yellow Leaf Curls Virus (TYLCV), a monopartite ssDNA geminivirus with a broad host range (Peretz et al., 2007). IL-60 is based on a modified virus that can be mechanically administered to plants and has all of the symptom-causing ORFs removed or mutated to render a dsDNA plasmid able to be replicated in plant cells as an episomal plasmid. The viral regions essential for gene expression and cell-to-cell movement are maintained, and specific trait genes can be directly introduced into plants. The IL-60 plasmids will replicate, spread to other tissues, and

eventually express the trait gene throughout the plant body in a stable manner for the full life cycle of the treated plant, and many species are compatible, including woody fruit trees such as grapevine, citrus, and olive. As observed for the ASLV vectors (Yamagishi et al., 2014), the TYLCV-derived plasmids are not heritable, and the progeny will be devoid of the plasmid DNA. Further development of the system allowed the expression of a full bacterial operon in tomato plants (Peretz et al., 2007). The construction was somehow processed from a polycistronic RNA, and the metabolite pyrrolnitrin synthesized from the 4 bacterial genes introduced was detected by HPLC in the treated plants. The tomato plants able to synthesize the antifungal pyrrolnitrin displayed disease resistance to *Rhizoctonia solani*. The system has been updated, and only minimal regions of the TYLCV genome, essential for the maintenance and movement of the plasmids, were kept, resulting in two plasmids named pIR and p1470 (Gover et al., 2014). An Israeli company named Morflora (<http://www.moreflora.com/>) retains a patent for the use of the IL-60 plasmids by the name of TraitUP™.

This technique was already successfully tested in apple with transient assays for the characterization of Malus COP1 orthologs (Li et al., 2012), which opens an alternative for the functional analysis of apple genes in a homologous system. In our hands, we have performed successful preliminary tests using apple plants and the IL-60 plasmids for expression of reporter genes such as GFP. Apple plants from the Gala cultivar treated with pIR-GFP plus p1470 displayed a broad, stable, and strong GFP expression that spread through all tissues progressively and remained stable even six months after treatment with the plasmid DNA (Figure 1).

One exciting new possibility for genome editing and trait introgression came to be after the discovery of CRISPRs/Cas9 (Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013) nucleases, which need only to be transiently expressed to create site-specific double strand breaks (DSBs). Plant episomal plasmids can be engineered to deliver these tailored nucleases to plants as described for *Agrobacterium* binary vectors (Kumar and Jain, 2014; Baltes et al., 2014; Ali et al. 2015), and gene-specific modifications can be obtained without creating a transgenic plant. Recently, successful targeted mutagenesis has been obtained in plants with DNA-free preassembled CRISPR-Cas9 (Woo et al. 2015), which would avoid the generation of transgenic cells and accelerate product development. A significant increase in the availability of genomic information for fruit species expands this possibility among many cultures, and a feasible expression system is essential for the application of these techniques (Yin et al., 2015). Many relevant traits in apples are dependent on loss-of-function mutations, such as ripening (Dandekar et al., 2004), self-incompatibility (Broothaerts et al., 2004), allergenicity (Gilissen et al., 2005), and fire blight resistance (Borejsza-Wysocka et al., 2004), among many others (Bulley et al., 2007).

The new developments achieved in the recent past years have opened exciting new possibilities for fast trait delivery in woody fruit species. Besides genetic transformation, which has been very successful in apple despite the hurdles of plant regeneration, easier, faster, and readily approachable new options are available for breeders worldwide. The long juvenile cycles, the large population screens, the high-throughput phenotyping/genotyping, and successive crossings are still essential to any breeding program, but we can accelerate and facilitate the process with the technologies that are just waiting to be exploited. These episomal expression systems, based on modified viruses, may enable the expression of stable traits that can be introduced by treating scions prior to grafting using elite genotypes bypassing the backcrossing events to recover the original genetic background. Concerns regarding biosafety and transgene escapes are still to be assessed, but due to the lack of heritability of the episomal DNA, this control might be easier than pollen-mobile genetic contamination derived from genetically modified plants.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq and Embrapa SEG 12/2012 - Prioridades do Portfólio Mudanças Climáticas, Project 02.12.12.003.00.00.

References

- Aldwiinckle H and Malnoy M (2009) Plant Regeneration and Transformation in the Rosaceae. *Transgenic Plant J* 3:1-39.
- Ali Z, Abul-faraj A et al. (2015) Efficient Virus-Mediated Genome Editing in Plants Using the CRISPR/Cas9 System. *Mol Plant* 8:1288-1291.
- Baltes NJ, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins PA and Voytas DF (2014) DNA Replicons for Plant Genome Engineering. *Plant Cell* 26:151-163.
- Barbieri M, Belfanti E et al. (2003) Progress of Map-based Cloning of the *Vf*-resistance Gene and Functional Verification: Preliminary Results from Expression Studies in Transformed Apple. *Hort Science* 38:329-331.
- Belfanti E, Silfverberg-Dilworth E et al. (2004) The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:886-890.

- Bolar JP, Norelli JL, Wong KW, Hayes CK, Harman GE and Aldwinckle HS (2000) Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* 90:72-77.
- Bolar JP, Norelli JL, Harman GE, Brown SK and Aldwinckle HS (2001) Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the atherogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res* 10:533-543.
- Boone DM and Keitt GW (1957) *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. XII. Genes controlling pathogenicity of wild-type lines. *Phytopathology* 47:403-409.
- Borejsza-Wysocka EE, Malnoy M, Meng X, Bonasera JM, Nissinen RM, Kim JF, Beer SV and Aldwinckle HS (2004) Silencing of apple proteins that interact with DspE, a pathogenicity effector from *Erwinia amylovora*, as a strategy to increase resistance to fire blight. *Acta Hort* 663:469-474.
- Borejsza-Wysocka EE, Malnoy M, Kim WS, Geider K, Beer SV and Aldwinckle HS (2007) Expression of *Phi-Ea1h* phage depolymerase gene with constitutive and inducible promoters, translation enhancer and signal sequence in transgenic apple plants increases resistance to fire blight. *Acta Hort* 738:273-276.
- Broggini GA, Wöhner T et al. (2014) Engineering fire blight resistance into the apple cultivar 'Gala' using the *FB_MR5* CC-NBS-LRR resistance gene of *Malus x robusta* 5. *Plant Biotechnol J* 12:728-733.
- Broothaerts W, Keulemans J and Van Nerum I (2004) Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing. *Plant Cell Rep* 22:497-501.
- Bulley SM, Malnoy M, Atkinson RG and Aldwinckle HS (2007) Transformed Apples: Traits of Significance to Growers and Consumers. *Transgenic Plant J* 1:267-279.
- Bus VG, Laurens FN, van de Weg WE, Rusholme RL, Rikkerink EH, Gardiner SE, Bassett HC, Kodde LP and Plummer KM (2005) The *Vh8* locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the *Vh2* locus in *Malus pumila* R12740-7A. *New Phytol* 166:1035-1049.
- Bus VG, Rikkerink EH, Caffier V, Durel CE and Plummer KM (2011) Revision of the Nomenclature of the Differential Host-Pathogen Interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annu Rev Phytopathol* 49:391-413.

- Caffier V and Parisi L (2007) Development of apple powdery mildew on sources of resistance to *Podosphaera leucotricha*, exposed to an inoculum virulent against the major resistance gene *Pl-2*. *Plant Breeding* 126:319-322.
- Chen XK, Zhang JY, Zhang Z, Du XL, Du BB and Qu SC (2012) Overexpressing *MhNPR1* in transgenic Fuji apples enhances resistance to apple powdery mildew. *Mol Biol Rep* 39:8083-8089.
- Cong L, Ran FA et al. (2013) Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339:819-823.
- Crosby JA, Janick J, Pecknold PC, Korban SS, O'Connon PA, Ries SM, Goffreda J and Voordeckers A (1992) Breeding apples for scab resistance: 1945-1990. *Fruit Varieties Journal* 46:145-166.
- Dandekar AM, Teo G, Defilippi BG, Uratsu SL, Passey AJ, Kadel AA, Stow JR, Colgan RJ and James DJ (2004) Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Research* 13:373-384.
- Faize M, Malnoy M, Dupuis F, Chevalier M, Parisi L and Chevreau E (2003) Chitinases of *Trichoderma atroviride* Induce Scab Resistance and Some Metabolic Changes in Two Cultivars of Apple. *Phytopathology* 93:1496-1504.
- Faize M, Sourice S, Dupuis F, Parisi L, Gautier MF and Chevreau E (2004) Expression of wheat puroindoline-b reduces scab susceptibility in transgenic apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Science* 167:347-354.
- Fan H, Wang F, Gao H, Wang L, Xu J and Zhao Z (2011) Pathogen-induced *MdWRKY1* in 'Qinguan' Apple Enhances Disease Resistance. *J Plant Biol* 54:150-158.
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9:275-296.
- Gessler C and Patocchi A (2007) Recombinant DNA Technology in Apple. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 107:113-132.
- Gessler C and Pertot I (2012) *Vf* scab resistance of *Malus*. *Trees* 26:95-108.
- Gilissen LJ, Bolhaar ST et al. (2005) Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *J Allergy Clin Immunol* 115:354-369.

- Gover O, Peretz Y, Mozes-Koch R, Maori E, Rabinowitch HD and Sela I (2014) Only minimal regions of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) are required for replication, expression and movement. *Arch Virol* 159:2263-2274.
- Harris SA, Robinson JP and Juniper BE (2002) Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics* 18:426-430.
- Igarashi A, Yamagata K et al. (2009) Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. *Virology* 386:407-416.
- James CM, Clarke JB and Evans KM (2004) Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene *Pl-d* in apple. *Theor Appl Genet* 110:175-181.
- Jha G, Thakur K and Thakur P (2009) The *Venturia* Apple Pathosystem: Pathogenicity Mechanisms and Plant Defense Responses. *J Biomed Biotechnol.* 2009:1-10.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E (2012) A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337:816-821.
- Joshi SG, Schaart JG, Groenwold R, Jacobsen E, Schouten HJ and Krens FA (2011) Functional analysis and expression profiling of *HcrVf1* and *HcrVf2* for development scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Mol Biol* 75:579-591.
- Krens FA, Schaart JG, van der Burgh AM, Tinnenbroek-Capel IE, Groenwold R, Kodde LP, Brogгинi GA, Gessler C and Schouten HJ (2015) Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance. *Front Plant Sci* 6:1-11.
- Kumar S, Volz R, Alspach P and Bus V (2010) Development of a recurrent apple breeding programme in New Zealand: a synthesis of results, and a proposed revised breeding strategy. *Euphytica* 173:207–222.
- Kumar V and Jain M (2014) The CRISPR–Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. *J Exp Bot* 66:47-57.
- Laurens F, Durel CE, Patocchi A, Peil A, Salvi S, Tartarini S, Velasco R and van de Weg E (2011) Review on apple genetics and breeding programmes and presentation of a new European initiative to increase fruit breeding efficiency. *J Fruit Sci* 27:102–107.

- Li YY, Mao K, Zhao C, Zhao XY, Zhang HL, Shu HR and Hao YJ (2012) *MdCOP1* Ubiquitin E3 Ligases Interact with *MdMYB1* to Regulate Light-Induced Anthocyanin Biosynthesis and Red Fruit Coloration in Apple. *Plant Physio* 160:1011-1022.
- Liu Q, Ingersoll J, Owens L, Salih L, Meng R and Hammerschlag F (2001) Response of transgenic Royal Gala apple (*Malus × domestica* Borkh.) shoots carrying a modified ce-cropin *MB39* gene, to *Erwinia amylovora* .
- MacHardy WE, Gadoury DM and Gessler C (2001) Parasitic and Biological Fitness of *Venturia inaequalis*: Relationship to Disease Management Strategies. *Plant Disease* 85:1036-1052.
- Malnoy M, Jin Q, Borejsza-Wysocka EE, He SY and Aldwinckle HS (2007) Overexpression of the Apple *MpNPR1* Gene Confers Increased Disease Resistance in *Malus × domestica*. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:1568–1580.
- Malnoy M, Xu M, Borejsza-Wysocka E, Korban SS and Aldwinckle HS (2008) Two receptor-like genes, *Vfa1* and *Vfa2*, confer resistance to the fungal pathogen *Venturia inaequalis* inciting apple scab disease. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 448–458.
- Mozes-Koch R, Gover O, Tanne E, Peretz Y, Maori E, Chernin L and Sela I (2012) Expression of an Entire Bacterial Operon in Plants. *Plant Physiol* 158:1883-1892.
- Nagamangala Kanchiswamy C, Sargent DJ, Velasco R, Maffei ME and Malnoy M (2015) Looking forward to genetically edited fruit crops. *Trends Biotechnol* 33:62-64.
- Peretz Y, Mozes-Koch R, Akad F, Tanne E, Czosnek H and Sela I (2007) A Universal Expression/Silencing Vector in Plants. *Plant Physiol* 145:1251-1263.
- Sasaki S, Yamagishi N and Yoshikawa N (2011) Efficient virus-induced gene silencing in apple, pear and Japanese pear using *Apple latente spherical virus* vectors. *Plant Methods* 7:1-11.
- Silfverberg-Dilworth E, Besse S, Paris R, Belfanti E, Tartarini S, Sansavini S, Patocchi A and Gessler C (2005) Identification of functional apple scab resistance gene promoters. *Theor Appl Genet* 110:1119-1126.
- Vanblaere T, Flachowsky H, Gessler C and Broggin GA (2014) Molecular characterization of cisgenic lines of apple ‘Gala’ carrying the *Rvi6* scab resistance gene. *Plant Biotechnol J* 12: 2-9.

- Vanblaere T, Szankowski I, Schaart J, Schouten H, Flachowsky H, Broggin GA and Gessler C (2011) The development of cisgenic apple plant, *J Biotechnol* 154:304-311.
- Velasco R, Zharkikh A et al. (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nat Genet* 42:833-841.
- Vinatzner BA, Patocchi A, Gianfranceschi L, Tartarini S, Zhang HB, Gessler C and Sansavini S (2001) Apple Contains Receptor-like Genes Homologous to the *Cladosporium fulvum* Resistance Gene Family of Tomato with a Cluster of Genes Cosegregating with *Vf* Apple Scab Resistance. *Mol Plant Microbe Interact.* 14:508-515.
- Williams EB and Shay JR (1957) The relationship of genes for pathogenicity and certain other characters in *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint *Genetics* 42:704-711.
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S and Kim JS (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISP-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 33:1162-1164.
- Xu M and Korban SS (2002) A cluster of four receptor-like genes resides in the *Vf* Locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics* 162:1995-2006.
- Yamagishi N, Sasaki S, Yamagata K, Komori S, Nagase M, Wada M, Yamamoto T and Yoshikawa N (2011) Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana FT* gene using the *Apple latent spherical virus* vector. *Plant Mol Biol* 75:193-204.
- Yamagishi N, Kishigami R and Yoshikawa N (2014) Reduced generation time of apple seedlings to within a year by means of a plant virus vector: a new plant-breeding technique with no transmission of genetic modification to the next generation. *Plant Biotechnol J* 12:60-68.
- Yin K, Han T, Liu G, Chen T, Wang Y, Yu AY and Liu Y (2015) A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep* 5:14926.

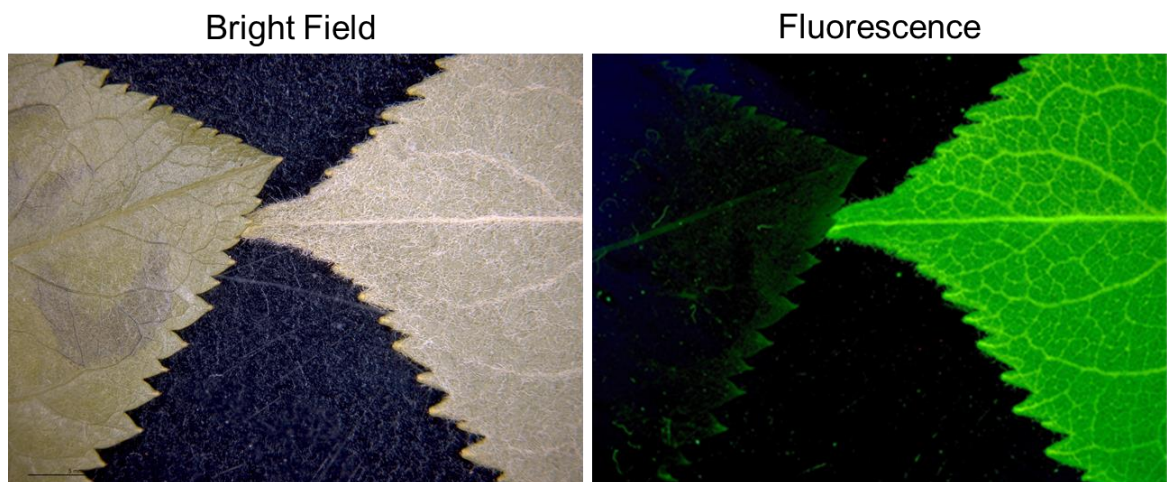


Figure 1: Bright Field (left panel) and Fluorescence (Right Panel) showing GFP expression on leaves from apple plants treated with the IL-60 plant plasmids pIR-GFP and p1470. Leaves from treated grafted buds, six months after the DNA treatment. Comparison of fluorescence between an untreated control leaf (left) and a GFP-expressing plant (right).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A macieira (*Malus × domestica*) possui importância mundial entre as frutíferas de clima temperado, e o Brasil se destaca entre os maiores produtores mundiais de maçã. À sarna da macieira, causada pelo fungo ascomiceto *Venturia inaequalis*, é uma das principais doenças nessa cultura. As duas cultivares mais consumidas no Brasil, Fuji e Gala, são altamente suscetíveis à sarna. O gene *Vf*, derivado do clone 821 da espécie silvestre *Malus floribunda*, é capaz de conferir resistência à doença e tem sido amplamente empregado nos programas de melhoramento. O uso de plasmídeos vegetais para inserir o gene de resistência à sarna da macieira é uma alternativa para inserir genes de interesse. O sistema de expressão é denominado IL-60 derivado do *Tomato Yellow Leaf Curls Virus* (TYLCV) registrado como TraitUP™ pela Morflora Inc. Este sistema consiste em um vírus modificado incapaz de causar sintomas a planta e leva à superexpressão sistêmica e constitutiva de genes recombinantes.

4.1 Isolamento do gene *Vf2* e clonagem no vetor de expressão

Para o isolamento da região codificadora do gene *Vf2*, um produto de 2942 pares de base foi amplificado por PCR com os iniciadores *Vf2* F (5' CACCGTCGACATGGAGAGAACCATGAGAGTTGTT 3', sítio *Sall* sublinhado) e *Vf2* R (5' ATGCATCTAGACATATTCAACAATTACATGATACA 3', sítio *NsiI* sublinhado) a partir do DNA genômico de *Malus floribunda* 821. A reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 10 ng em um 1 µL DNA, 5 µL de Tampão 10X, 0,5 µL de mistura de dNTPs (25mM), 1 µL do iniciador direto e 1 µL para o reverso (10mM), 1 µL *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent Technologies®) e 40,5 µL de água ultrapura (Life Technologies®). A etapa de amplificação constituiu-se de 5 minutos a 95 °C para a ativação da enzima, seguidos de 40 ciclos de: (1) desnaturação a 95 °C por 15 segundos, (2) 30 segundos a 57 °C para anelamento dos iniciadores, e (3) 3 minutos a 72 °C para extensão das fitas. A visualização do produto de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

O produto obtido foi purificado do gel de agarose com o Kit *PureLink® PCR Purification* (Invitrogen) e ligado no vetor de clonagem *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega), segundo as instruções do fabricante. A reação de ligação contendo o vetor de clonagem e o produto amplificado foi inserida em células termocompetentes de *Escherichia coli* TOP 10. Após o choque térmico, as células foram transferidas para meio de cultura SOC, onde permaneceram durante 1 h a 37°C. Para a multiplicação e a seleção de células

recombinantes, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura LB, ágar e ampicilina (100 µg/mL) e incubadas por 16 h a 37 °C. As células recombinantes selecionadas foram incubadas em meio LB líquido contendo a mesma concentração de ampicilina sob agitação por 16 h a 37 °C. A extração de DNA plasmidial foi realizada com o *PureLink®Plasmid Miniprep* (Invitrogen). A construção obtida foi validada por sequenciamento e digestão com a enzima *BamHI* (Invitrogen), visualizado em eletroforese por gel de agarose 1%.

Para a transferência do gene de interesse para o plasmídeo de expressão *pIR* (Gover et al., 2014), o vetor pGEM®-T Easy contendo o inserto obtido anteriormente foi clivado com enzimas de restrição *Sall* e *NsiI* (Invitrogen). E o vetor de expressão *pIR* foi clivado com as enzimas de restrição *XhoI* e *NsiI*, a fim de proporcionar extremidades coesivas entre o vetor e o fragmento. O produto da reação de clivagem foi submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da linearização do vetor e liberação do fragmento de interesse. O produto obtido a partir do gel de agarose foi purificado com o Kit *PureLink® PCR Purification* (Invitrogen). Este produto contendo o gene *Vf2* foi ligado no vetor de expressão *pIR*, nas mesmas condições utilizadas anteriormente. A reação de ligação foi inserida em células termocompetentes de *Escherichia coli* TOP 10 nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Estas células foram inoculadas em placas de Petri contendo LB, ágar e canamicina (50 µg/mL), incubadas por 16 h a 37 °C. As células recombinantes selecionadas foram incubadas em meio LB líquido contendo a mesma concentração de canamicina sob agitação por 16 h a 37 °C. A extração de DNA plasmidial foi realizada com o *PureLink®Plasmid Miniprep* (Invitrogen). A construção *pIRVf2* obtida foi validada por digestão com a enzima *BglIII* (Invitrogen), visualizado em eletroforese por gel de agarose 1%. Clones positivos foram confirmados por sequenciamento. A região IR (*Intergenic Region*) do plasmídeo *pIR* funciona como um promotor constitutivo em células vegetais (Peretz et al. 2007) levando à expressão de genes clonados adjacientemente à esta sequência.

4.2 Material vegetal

Foram utilizadas 60 plantas de macieira da cultivar Fuji Suprema e 60 de Maxi Gala oriundas do jardim clonal de matrizes de pomáceas com sanidade superior da Embrapa Uva e Vinho. Estas plantas foram plantadas sobre o porta-enxerto Maruba com aproximadamente um ano de idade. O porta-enxerto Maruba é um dos mais utilizados em enxertia no Sul do Brasil, resulta em alta produtividade e tamanho dos frutos, além de possuir boa resistência à podridão do colo e pulgão-lanífero. Cinco plantas de *Malus floribunda* 821 e Monalisa foram utilizadas

como controle resistente, naturalmente portadoras do gene *Vf2*, e cinco plantas de Maxi Gala e Fuji Suprema como controle suscetível, não tratadas com os plasmídeos vegetais. Todas as plantas foram mantidas em vasos em casa de vegetação com temperatura $23\text{ °C} \pm 2^\circ$ e 60% de umidade relativa, localizada na Embrapa Uva e Vinho, na cidade Bento Gonçalves – RS.

4.3 Tratamento das plantas com os plasmídeos vegetais

A administração do DNA nas plantas foi realizada em uma proporção de 1:1, ou seja, uma solução em água destilada contendo 1 μg de plasmídeo *helper* (*p1470*) e 1 μg do plasmídeo de expressão pIR em um volume final de 20 μL . A injeção foi realizada diretamente no caule de cada planta, com o auxílio de uma seringa hipodérmica. O tecido vascular foi perfurado e a solução de DNA foi injetada e absorvida pelo tecido vascular da planta (Figura 3). A construção contendo o gene *Vf2* (*pIR-Vf2*) juntamente com o plasmídeo *helper* (*p1470*, Gover *et al.*, 2014) foi injetada em 45 plantas da cultivar Fuji Suprema e 45 para Maxi Gala. Como controle, 15 plantas de ‘Fuji Suprema’ e 15 para ‘Maxi Gala’ receberam os plasmídeos pIR vazio (sem o gene *Vf2*) junto com o plasmídeo *helper* (*p1470*). As injeções foram realizadas em abril de 2015.



Figura 3: Administração do DNA contendo a construção *pIR-Vf2* juntamente com o plasmídeo *helper*, diretamente no caule da macieira com o auxílio de uma agulha hipodérmica. Foto: Patrícia Picolotto

4.4 Amostragem do material vegetal

O material vegetal utilizado para as extrações de DNA genômico e RNA foi obtido de folhas de cada planta das cultivares Maxi Gala, Fuji Suprema, Monalisa e *M. floribunda*, 15, 30 e 240 dias após a data da injeção com os plasmídeos vegetais. Todo o material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio (N₂) líquido e posteriormente armazenado no ultra-freezer (-80 °C).

4.5 Extração de DNA genômico

O DNA genômico das folhas coletadas, após 15 e 30 dias do tratamento com os plasmídeos vegetais, foi extraído pelo protocolo modificado de Lodhi e colaboradores (1994) e Lefort e Douglas (1999) adaptado para escala de purificação em tubos de microcentrífuga de 1,5 e 2,0 mL. A integridade e quantidade de DNA foram monitoradas por eletroforese em gel de agarose (1%) seguida de quantificação espectrofotométrica. O DNA genômico purificado foi armazenado a -20 °C até a utilização.

4.6 Detecção do DNA plasmidial em tecidos vegetais por Nested-PCR

Para a detecção dos vetores e do gene *Vf2* foram projetados pares específicos de iniciadores utilizando-se o programa VectorNTI 10.3.0 (Invitrogen) os quais foram analisados quanto a sua estabilidade de estrutura secundária no programa OligoAnalyzer IDT (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). A especificidade dos iniciadores foi determinada através de buscas por *BLAST* entre os modelos gênicos preditos no genoma da macieira (Velasco *et al.*, 2010). Os iniciadores *Vf2RT* (5'CAATCAACTTACAGGACAACCTCC 3') e *p28Rev* (5'TGACCATGATTACGCCAAGCTACG 3'), foram usados na PCR inicial, objetivando a amplificação de um produto primário de 2000 pares de bases; os iniciadores *Vf2RTendF* (5'CTAGTTTTTGGGGTATGGTTGC3') e *Vf2RTendR* (5'GAAAGATCCATGCCTTTTACGA3') foram usados na *nested-PCR*, objetivando a amplificação de um produto secundário interno de 115 pares de bases.

A PCR inicial foi realizada com Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®) em um volume final de 20 µL contendo aproximadamente 200 ng de DNA molde e os *primers*

Vf2RT e p28Rev segundo as recomendações do fabricante. A etapa de amplificação constituiu-se de 3 minutos a 94 °C para ativação da enzima, seguidos de 40 ciclos de: (1) desnaturação a 94°C por 15 segundos, (2) 30 segundos a 50 °C para anelamento dos iniciadores, e (3) 3 minutos a 72 °C para extensão das fitas. Para a *nested-PCR*, 1µl de solução da PCR inicial foi utilizado como DNA molde com os *primers* Vf2RTendF e Vf2RTendR, as demais condições foram iguais. A visualização dos produtos de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

4.7 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Amostras de RNA total foram extraídas a partir das folhas das cultivares Maxi Gala, Fuji Select, Monalisa e *M. floribunda*, 10 meses após o tratamento com os plasmídeos vegetais e antes da inoculação de esporos de *V. inaequalis*, utilizando o protocolo modificado de Zeng e Yang (2002), adaptado para escala de purificação em tubos de microcentrífuga para 2,0 mL.

A contaminação com DNA presente nas amostras de RNA total foi removida utilizando-se o kit comercial *TURBO DNA-free*[®] (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. Para tal, uma alíquota de 9,55 µL de RNA total (4µg) foi tratada com 1 µL de DNase (*Deoxyribonuclease*; 2 U/µL) em uma reação contendo 1,2 µL Tampão 10x (200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM MgCl₂ (cloreto de magnésio), 0,25 µL RNase OUT (Inibidor de RNases; 40 U/µL) para remoção de DNA genômico. Essa reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente foi adicionado 2 µL de DNase Inactivation Reagent para inativação da DNase. A próxima etapa consistiu na incubação das reações a temperatura ambiente por 5 minutos, com aplicação de agitação manual. As reações foram centrifugadas a 10.000 g durante 1 minuto e 30 segundos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

A síntese das fitas do cDNA foi realizada com o kit comercial *GeneAmp*[®] *PCR Core* (Life Technologies[®]) seguindo as instruções do fabricante. Para tal, em tubos de microcentrífuga de 0,2 mL, foram misturados 2 µL GeneAmp[®] 10X PCR Buffer, 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 8 µL de mistura de dNTPs (*deoxyribonucleotide triphosphates*; 10 mM), 1 µL de inibidor de RNase (20 U/ul), 1 µL de MuLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*), 1 µL de oligod (T) e 3 µL de RNA tratado (1 µg) com DNase. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente submetidos ao termociclador nas seguintes condições: 65 °C por 15 minutos e 4 °C por 2 minutos, apenas com o oligod (T) e RNA. Em seguida, adicionou-se o restante dos reagentes e foi submetido ao termociclador nas seguintes condições: 37 °C por 30 minutos e 95 °C por 5 minutos. O cDNA

concentrado foi diluído em água ultrapura (Life Technologies®) para a concentração de 1:100 e armazenado a -20 °C até sua utilização.

4.8 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Para a determinação do acúmulo de transcritos por RT-qPCR, foram projetados os iniciadores VF_RT_Fw_1A (5' - GCACTTTGATCTTTCAAGTAATTC 3') e VF_RT_Rv_1B (5' - CGTTAGCATTTTGAGTTGACCA 3') objetivando a amplificação de um produto de 105 pares de bases do cDNA de *Vf2*. As reações foram realizadas no aparelho StepOnePlus® Real-Time PCR System (Life Technologies), com placas de 96 poços, utilizando a quantificação por fluorescência de SYBR®-Green (1:10.000; Life Technologies®). Cada amostra biológica foi analisada em quatro replicatas técnicas. A amplificação seguiu: 10 minutos a 95 °C para ativação da enzima, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e 60 segundos a 60 °C para anelamento dos iniciadores e extensão das fitas. Ao final, foi realizada a curva de dissociação entre as temperaturas de 60 a 95 °C. As reações de RT-qPCR foram realizadas em um volume final de 20 µL, constituído por 10 µL do cDNA diluído 100x, 6,83 µL de água Milli-Q, 2 µL de Tampão PCR 10x, 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,1 µL de dNTP's (10 mM), 0,4 µL do par de iniciadores (10 µM), 0,02 µL de SYBR Green (1:10.000) e 0,05 µL de Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µL, Invitrogen). A especificidade dos iniciadores foi avaliada pela presença de pico único na curva de dissociação, produto único de amplificação em eletroforese em gel de agarose e sequenciamento do produto de amplificação. A estabilidade dos genes referência foi calculada pelo software geNorm versão 3.4 (Vandesompele et al., 2002). A expressão relativa foi calculada pelo método de Pfaffl (2001) em função dos genes referência MDH (Malate Dehydrogenase) e Tmp1 (Type 1 membrane protein like) (Perini et al., 2014). A estimativa da eficiência foi avaliada utilizando o software LinRegPCR versão 2016.0.

4.9 Produção do inóculo de *Venturia inaequalis*

Folhas e frutos com lesões de sarna em 'Gala' foram coletadas em pomares clonais da Estação Experimental de Fruticultura Embrapa Uva e Vinho localizado na cidade de Vacaria - RS. Apenas os locais das folhas que apresentavam lesões foram cortados, colocados em um béquer contendo água destilada esterilizada e solução de Tween (0,001%). A solução contendo as lesões das folhas foi submetida à lavadora ultra-sônica digital (Sanders Medical – SoniClean

2 PS) por 10 minutos para a liberação dos esporos. A solução foi coada com o auxílio de um tecido *voil* para outro béquer. A concentração da suspensão conidial foi estimada em 3×10^5 conídios mL^{-1} em câmara de Neubauer. Em uma segunda tentativa de inoculação das plantas a concentração da suspensão conidial foi ajustada para $4,5 \times 10^6$.

4.10 Inoculação de conídios de *Venturia inaequalis* em folhas destacadas e plantas em vasos

A inoculação foi feita com base em protocolo anteriormente descrito (Schenato *et al*, 2007) com algumas modificações. A inoculação dos conídios foi realizada logo em seguida ao seu preparo. Para a inoculação em folhas destacadas, uma folha não totalmente expandida foi coletada. A amostragem consistiu em folhas das cultivares Fuji Suprema e Maxi Gala tratadas com *pIR-Vf2*, também foram coletadas dez folhas para ambas cultivares tratadas com *pIR* vazio (controle), três folhas para Fuji Suprema e Maxi Gala do tipo selvagem (testemunhas suscetíveis) e três folhas para Monalisa e *M. floribunda* (testemunhas resistentes). Imediatamente após a coleta, as folhas tiveram o extremo distal do pecíolo envolvido por algodão umedecido em água destilada esterilizada e foram colocadas em placas de Petri (uma por placa) contendo 15 mL de meio ágar-água (10 g.L^{-1}). A inoculação da suspensão conidial a 3×10^5 conídios mL^{-1} foi realizada por aspersão com um pulverizador manual até o gotejamento. Uma folha de cada cultivar foi igualmente aspergida com água destilada esterilizada e mantida como testemunha. As placas foram vedadas e armazenadas em câmaras BOD (Biologic Oxygen Demand) da marca Eletrolab, modelo EL202, a $17 \text{ }^\circ\text{C}$, no escuro, por 48 h. Após este período mantiveram-se armazenadas em BOD a $19 \text{ }^\circ\text{C}$, com fotoperíodo controlado de 18h. Este ensaio foi repetido em novas folhas coletadas e com uma nova suspensão conidial a $4,5 \times 10^6$. A amostragem consistiu no delineamento mencionado anteriormente. A inoculação foi feita com o auxílio de uma micropipeta colocando-se duas gotas de $10 \mu\text{l}$ cada, sobre cada folha. Uma folha de cada cultivar foi igualmente gotejada com água destilada esterilizada e mantida como testemunha.

A inoculação em plantas em vasos foi realizada nas cultivares Fuji Suprema e Maxi Gala tratadas com *pIR-Vf2*, além de dez plantas para ambas cultivares tratadas com *pIR* vazio (controle), três plantas para cada cultivar, Fuji Suprema e Maxi Gala do tipo selvagem (testemunhas suscetíveis), Monalisa e *M. floribunda* (testemunhas resistentes). A inoculação da suspensão conidial a 3×10^5 conídios mL^{-1} foi realizada em todas as folhas da planta por aspersão com um pulverizador manual até o gotejamento. Para cada cultivar, uma planta foi igualmente aspergida com água destilada e mantida como testemunha. Como não havia umidificador na casa de vegetação, depois da inoculação, foi envolto um saco plástico transparente molhado

com água destilada em cada planta com o objetivo de manter alta umidade na planta durante 48h. Após este período foi retirado o saco plástico. A temperatura da casa de vegetação variou entre 23-26 °C. Este ensaio foi repetido nas mesmas plantas com uma nova suspensão conidial a $4,5 \times 10^6$ e consistiu no mesmo delineamento mencionado anteriormente. As plantas em vasos foram transportadas para outro compartimento da casa de vegetação, o qual possuía dois climatizadores (Joape). Após a inoculação, foi colocado um sombrite acima das plantas, para diminuir a entrada de luminosidade na casa de vegetação. No período de 48 h a casa de vegetação manteve a umidade relativa do ar em 90-100%, e temperatura de 18-23 °C. O sombrite foi removido após 48h, a umidade do ar foi diminuída para 60%, e a temperatura mantida em 23 ± 2 °C.

4.11 Avaliação fenotípica dos sintomas da sarna

Os sintomas das folhas destacadas e das plantas em vasos foram registrados aos seis, nove, 12, 20 e 30 dias após a inoculação com a suspensão conidial. A avaliação consistiu em presença ou ausência de sinais de infecção e sua severidade quando presente. Essa avaliação foi baseada conforme modelo descrito por Schenato (2007), modificado. A severidade foi estimada em relação ao número total de folhas com o número total de folhas com sinais de infecção. Além disso, foram registrados sintomas como clorose, necrose, ausência ou presença de sinais de infecção.

Para a avaliação do processo de infecção seguiu-se o protocolo Blanchet *et al.* (2012). Para tal, foram cortados discos foliares de todas as folhas destacadas e uma folha de cada planta em vaso, as quais foram incubadas a -20 °C por 1 h para paralisar o processo de infecção. Os discos foliares foram imersos em solução de etanol e ácido acético (3:1) durante 2h a 40°C. Após a descoloração, as estruturas do fungo foram coradas com azul de metileno (0.1%) durante 5 minutos e transferidos para a solução de fucsina ácida (0,2%) durante 5 minutos e em seguida lavados com água destilada. A fotodocumentação da presença de micélio e conídios foi realizada em microscópio óptico Leica DMR com câmera AxionCam HRc com o *software* Zen Lite 2012.

5 RESULTADOS

5.1 Amplificação do gene *Vf2* e clonagem no vetor de expressão pIR

A região codificadora completa de *Vf2* foi amplificada com sucesso a partir do DNA genômico de *Malus floribunda*. O gene não possui íntrons e tem aproximadamente 3000 pb o que possibilitou a sua amplificação direta a partir do DNA genômico (Figura 4).

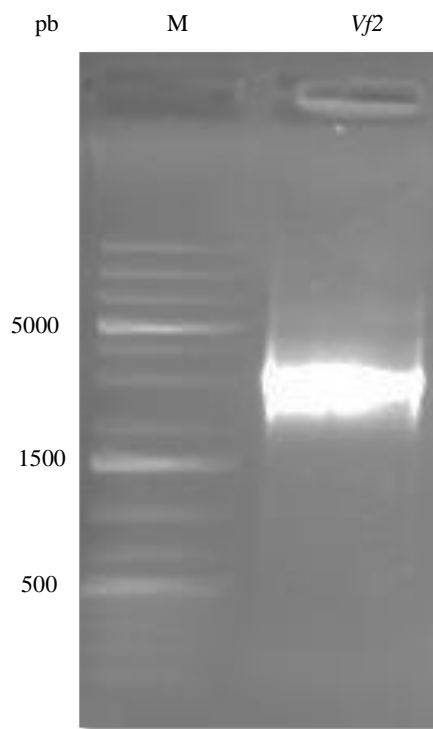


Figura 4: Amplificação do gene *Vf2* de DNA genômico de *Malus floribunda* por PCR. O gene não possui íntrons e tem aproximadamente 3000pb. M: marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); *Vf2*: produto de PCR utilizando DNA genômico de *M. floribunda*. Gel de agarose 0,8%.

O produto correspondente ao gene *Vf2* foi ligado no vetor *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega), com a utilização da enzima T4 DNA ligase. A triagem dos clones recombinantes foi realizada pela clivagem com a enzima *Bam*HI, que libera dois fragmentos com os tamanhos esperados de 5828 pb e 367 pb. Este padrão de digestão ocorre apenas para o gene *Vf2* e não para os demais genes *Vf* (*Vf1*, *Vf3* e *Vf4*) cujas sequências genômicas são muito similares a *Vf2*. Os clones 11 e 16 apresentaram os fragmentos esperados para o inserto, porém quando sequenciados, apenas o clone 11 apresentou a sequência correta de *Vf2* (Figura 5).

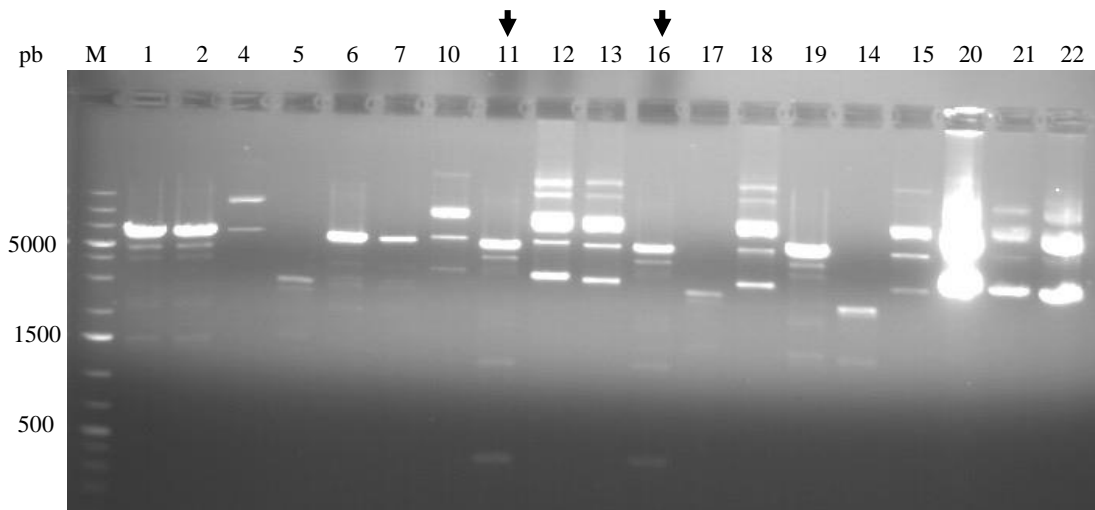


Figura 5: Triagem dos clones recombinantes dos plasmídeos pGEM®-T Easy contendo o produto de amplificação. O DNA plasmidial de 19 diferentes clones foi digerido com a enzima *Bam*HI e analisado por eletroforese em gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); 1-19: plasmídeos pGEM®-T Easy contendo a sequência *Vf* clivados com a enzima de restrição *Bam*HI; 20-22: plasmídeo de clonagem pGEM®-T Easy íntegro. Gel de agarose 1%. As setas indicam os clones que apresentam o padrão de digestão esperado para pGEM-T- *Vf*2.

O fragmento contendo o gene *Vf*2 foi subclonado no vetor de expressão pIR utilizando-se sítios de *Sal*I/*Nsi*I presentes nos *primers*. A triagem inicial de confirmação do inserto no vetor de expressão foi por PCR de colônia utilizando os mesmos iniciadores específicos para a amplificação do gene *Vf*2. Devido à ocorrência de muitos falsos-positivos foi necessária uma triagem de aproximadamente 100 colônias. Destas, 4 clones apresentaram o fragmento de aproximadamente 3000pb na PCR usando os iniciadores específicos para a sequência de *Vf*2 (Figura 6). Estes mesmos clones apresentaram o padrão esperado após a digestão com a enzima *Bg*III com a liberação de 3 fragmentos (3391, 1587 e 1217pb) (Figura 7).

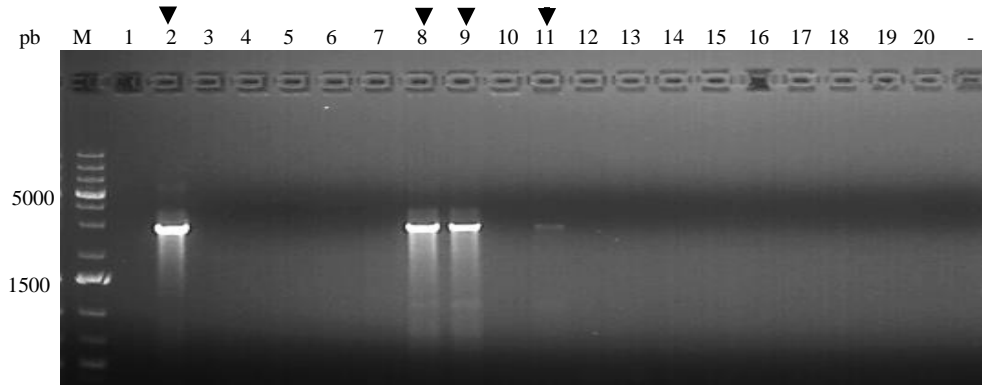


Figura 6: Triagem dos clones recombinantes da miniprep de *E.coli* TOP10 transformada com o vetor de expressão pIR contendo a sequência de *Vf2* por PCR. M: marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); 1-20: produtos da PCR contendo o gene *Vf2* no vetor de expressão pIR; (-): controle negativo da reação. Gel de agarose 1%. As setas indicam o fragmento de aproximadamente 300 pb.

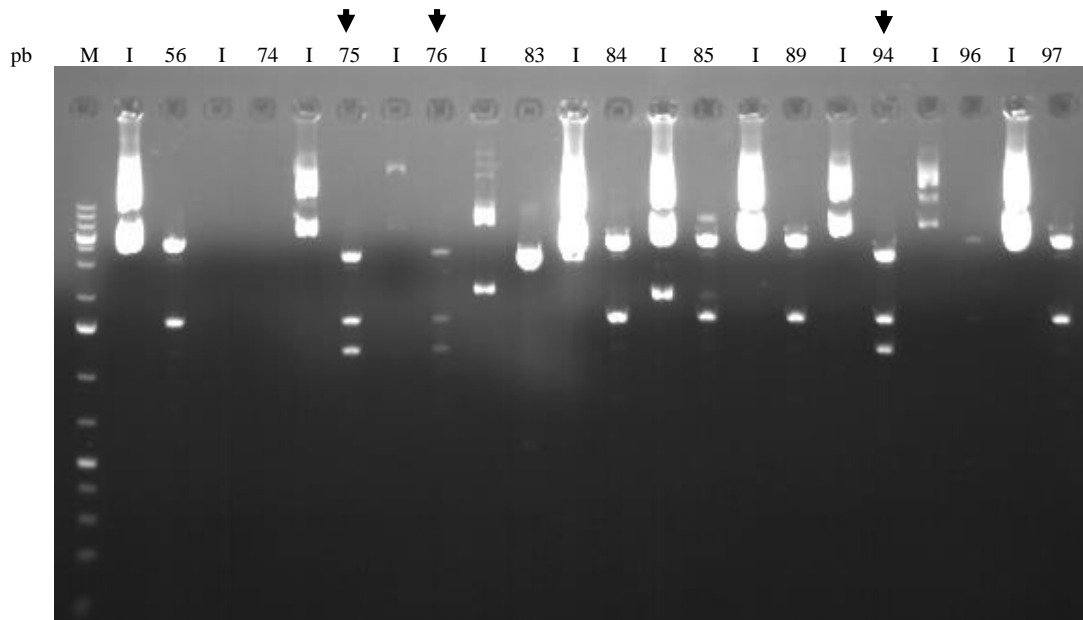


Figura 7: DNA plasmidial de diferentes clones com o vetor de expressão pIR contendo a sequência de *Vf2* digerido com a enzima *BglIII* e analisado por eletroforese em gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); I: plasmídeo de clonagem pIR íntegro; 56-97 plasmídeos pIR contendo a sequência *Vf* clivados com a enzima de restrição *BglIII*. As setas indicam os clones que apresentam o padrão de digestão esperado para pIR-*Vf2*.

5.2 O DNA dos plasmídeos vegetais é mantido e detectado sistemicamente em tecidos de macieiras tratadas

A detecção do DNA dos plasmídeos vegetais nos tecidos das plantas tratadas foi dificultada pela baixa concentração destas moléculas no DNA total extraído das plantas. Para uma maior sensibilidade de detecção foi adotada uma estratégia de amplificação por *nested-*

PCR onde a amplificação do DNA plasmidial é feita em duas etapas. A PCR inicial não foi capaz de apresentar de amplificar nenhum produto além do controle positivo de 2000 pb. Os produtos dessa reação foram usados como molde para a *nested-PCR* a qual gera um produto de 115 pb. Folhas de ‘Fuji Suprema’ e ‘Maxi Gala’ coletadas 15 dias após o tratamento com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper* (*p1470*) foram analisadas. Na cultivar Fuji Suprema, dentre 15 plantas analisadas, o plasmídeo de expressão foi detectado em 11 plantas (Figura 8). ‘Maxi gala’ teve 13 plantas analisadas e foram detectadas seis plantas positivas para o plasmídeo de expressão (Figura 9).

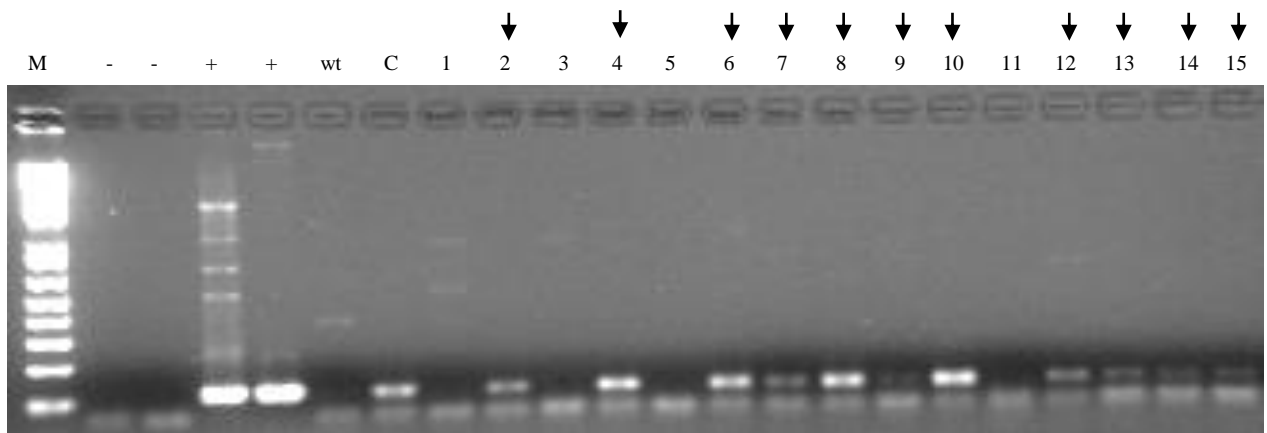


Figura 8: Detecção do plasmídeo de expressão *pIR-Vf2* por *nested-PCR* em plantas de macieira ‘Fuji Suprema’ após 15 dias do tratamento com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. (M) marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); (-) controle negativo da PCR; (+) controle positivo da PCR; (wt) planta tipo selvagem; (c) planta controle, plasmídeo vazio (sem o gene); 1-15: plantas ‘Fuji Suprema’ tratadas com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. As setas indicam as plantas com o produto esperado.

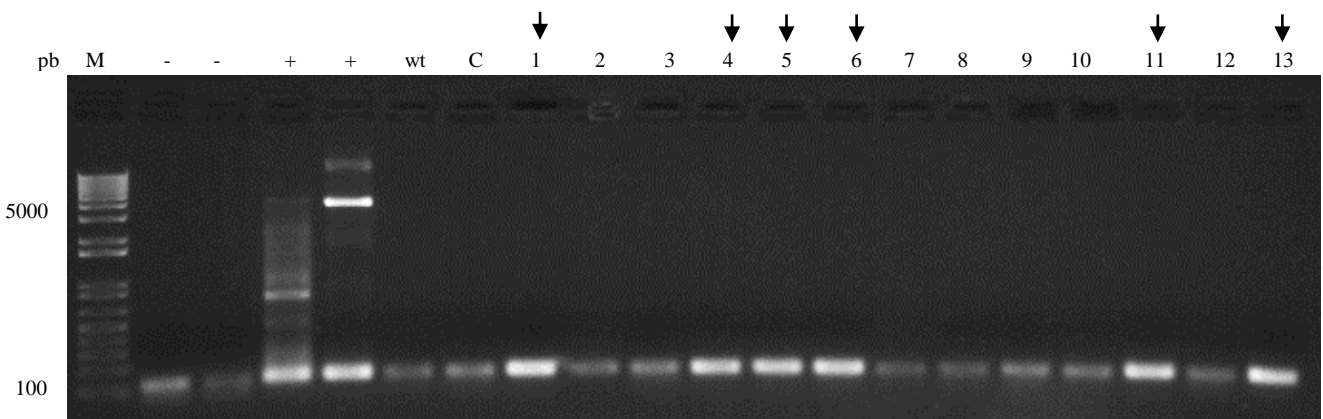


Figura 9: Detecção do plasmídeo de expressão *pIR-Vf2* por *nested-PCR* em plantas de macieira ‘Maxi Gala’ após 15 dias do tratamento com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. (M) marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); (-) controle negativo da PCR; (+) controle positivo da PCR; (wt) planta tipo selvagem; (c) planta controle, plasmídeo vazio (sem o gene); 1-13: plantas ‘Maxi Gala’ tratadas com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. As setas indicam as plantas com o produto esperado.

Para avaliar a estabilidade da presença do plasmídeo de expressão, foram analisadas folhas de ambas as cultivades 30 dias após o tratamento. A cultivar Fuji Suprema teve 45 plantas analisadas e o plasmídeo de expressão foi detectado em 30 plantas (Figuras 10, 11 e 12). ‘Maxi gala’ teve 45 plantas analisadas e foram detectadas 20 plantas positivas para o plasmídeo de expressão (Figuras 13, 14 e 15).

A técnica *nested-PCR* é mais sensível que a PCR convencional, e por este motivo permitiu detectar o DNA plasmidial em ambas as cultivares, Fuji Suprema e Maxi Gala. Estes resultados mostram que o tratamento nas plantas com os plasmídeos vegetais foi eficaz e o DNA exógeno permanece estável nas plantas.

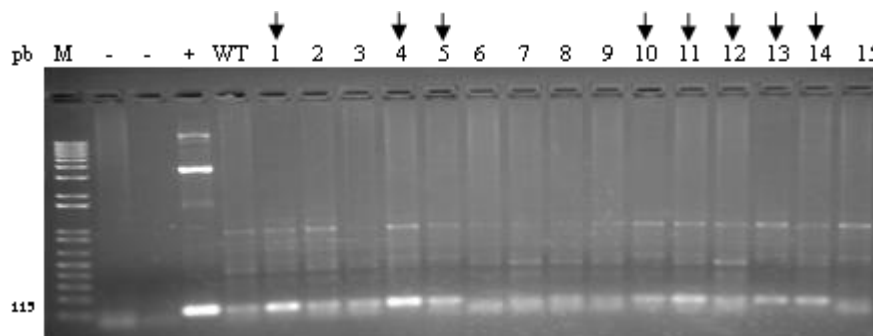


Figura 10: Detecção do plasmídeo de expressão *pIR-Vf2* por *nested-PCR* em plantas de macieira ‘Fuji Suprema’ após 30 dias do tratamento com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. (M) marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); (+) controle positivo da PCR; (wt) planta tipo selvagem; (c) planta controle, plasmídeo vazio (sem o gene); 1-15: plantas ‘Fuji Suprema’ tratadas com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. As setas indicam as plantas com o produto esperado.

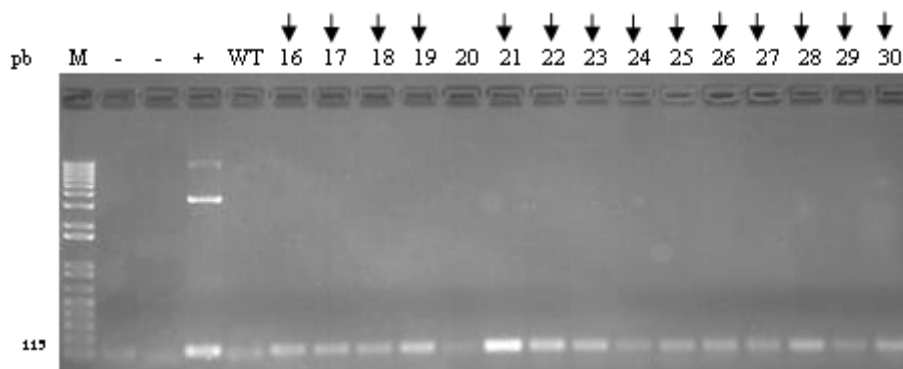


Figura 11: Detecção do plasmídeo de expressão *pIR-Vf2* por *nested-PCR* em plantas de macieira ‘Fuji Suprema’ após 30 dias do tratamento com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. (M) marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); (+) controle positivo da PCR; (wt) planta tipo selvagem; (c) planta controle, plasmídeo vazio (sem o gene); 16-30: plantas ‘Fuji Suprema’ tratadas com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. As setas indicam as plantas com o produto esperado.

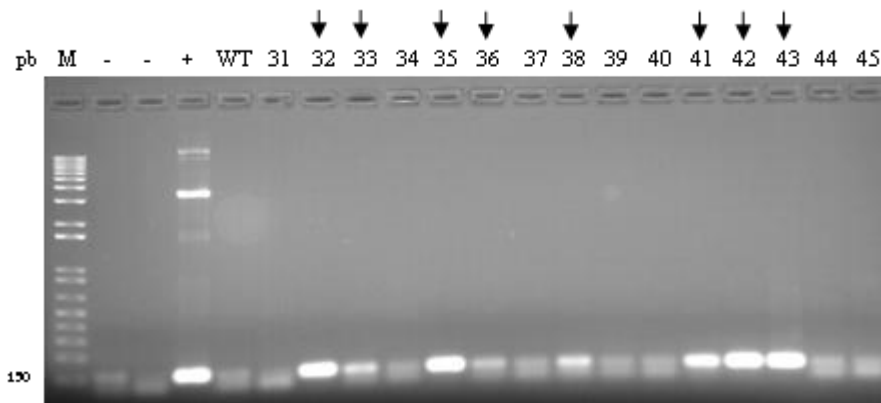


Figura 12: Detecção do plasmídeo de expressão *pIR-Vf2* por *nested-PCR* em plantas de macieira ‘Fuji Suprema’ após 30 dias do tratamento com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. (M) marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); (+) controle positivo da PCR; (wt) planta tipo selvagem; (c) planta controle, plasmídeo vazio (sem o gene); 31-45: plantas ‘Fuji Suprema’ tratadas com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. As setas indicam as plantas com o produto esperado.

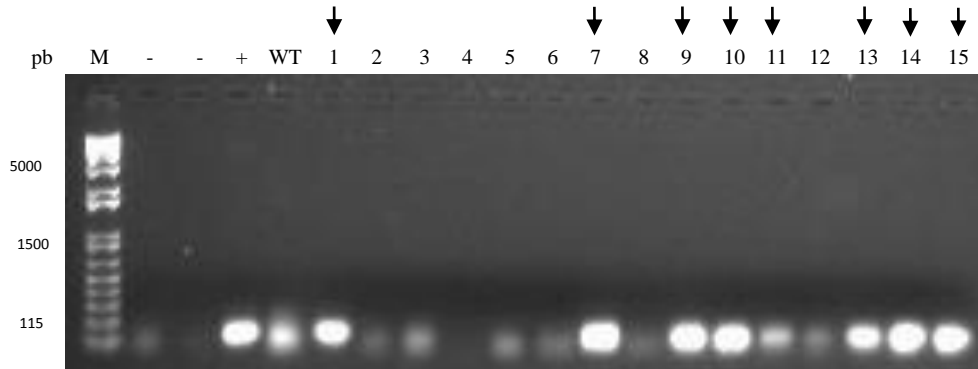


Figura 13: Detecção do plasmídeo de expressão *pIR-Vf2* por *nested-PCR* em plantas de macieira ‘Maxi Gala’ após 30 dias do tratamento com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. (M) marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); (+) controle positivo da PCR; (wt) planta tipo selvagem; (c) planta controle, plasmídeo vazio (sem o gene); 1-15: plantas ‘Maxi Gala’ tratadas com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. As setas indicam as plantas com o produto esperado.



Figura 14: Detecção do plasmídeo de expressão *pIR-Vf2* por *nested-PCR* em plantas de macieira ‘Maxi Gala’ após 30 dias do tratamento com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. (M) marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); (+) controle positivo da PCR; (wt) planta tipo selvagem; (c) planta controle, plasmídeo vazio (sem o gene); 16-30: plantas ‘Maxi Gala’ tratadas com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. As setas indicam as plantas com o produto esperado.

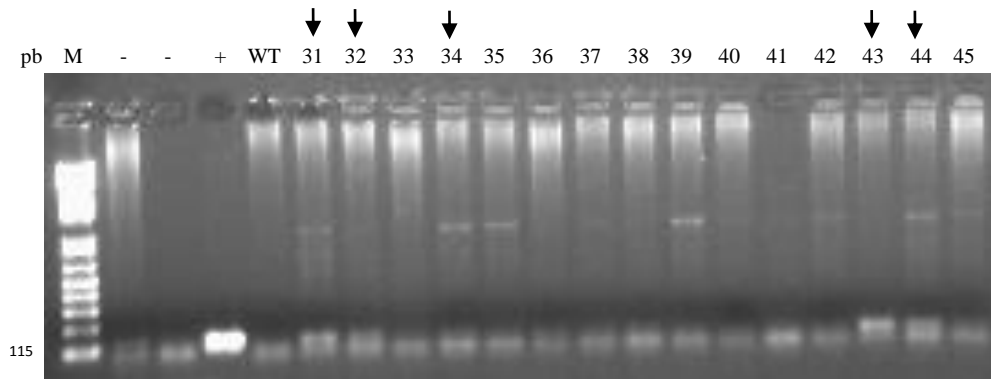


Figura 15: Detecção do plasmídeo de expressão *pIR-Vf2* por *nested-PCR* em plantas de macieira ‘Maxi Gala’ após 30 dias do tratamento com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. (M) marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); (+) controle positivo da PCR; (wt) planta tipo selvagem; (-) planta controle, plasmídeo vazio (sem o gene); 31-45: plantas ‘Maxi Gala’ tratadas com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. As setas indicam as plantas com o produto esperado.

5.3 Plantas de macieira tratadas com *pIR-Vf2* apresentam níveis aumentados de expressão do gene recombinante

Os níveis de expressão do gene *Vf2* nas cultivares ‘Fuji Suprema e ‘Maxi Gala’ foi analisado pela técnica da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Os dados de expressão foram normalizados com a expressão de dois genes referência descritos para folhas de macieira, *MDH* e *TMp1* (Perini et al., 2014). A estabilidade dos genes referência foi calculada no *software* geNorm. Em ambas as cultivares os valores $V2 / 3$ foram inferiores a 0,15 (o valor de cut-off recomendado pelos autores geNorm), embora esses valores tenham variado entre as cultivares. A expressão do gene referência *MDH* apresentou menor variação entre as cultivares. A expressão relativa foi calculada pelo método de Pfaffl (2001) em função do gene referência *MDH* e o gene *Vf2*. A eficiência dos genes foi calculada usando o *software* LinRegPCR, 96% e 91%, respectivamente.

A expressão dos transcritos nas plantas superexpressando *Vf2* foi maior que a observada nas plantas controle (Figura 16 e 17). O número de plantas avaliadas variou nesse ensaio em comparação com os demais, devido à ausência de material vegetal para coleta em algumas plantas. A cultivar Maxi Gala apresentou maior número de plantas superexpressando o gene de resistência em comparação com ‘Fuji Suprema’. A amostra do tipo selvagem para ‘Fuji Suprema’ apresentou expressão similar à planta resistente Monalisa, o que pode ser consequência de uma possível contaminação durante o manuseio das amostras. A média da expressão de *Vf2* foi maior nas plantas tratadas com *pIR-Vf2* no que nas plantas controle.

Também é evidente que a expressão das plantas superexpressando *Vf2* é maior em relação às demais plantas (Figura 16 e 17). Embora a variação das médias da expressão tenha variado entre as amostras de cada cultivar, os genes de referência *MDH* e *TMp1* apresentaram maior estabilidade para a cultivar Maxi Gala. Em contrapartida, para Fuji Suprema o gene *TMp1* apresentou maior variação e instabilidade, com base nisso, a expressão relativa foi calculada apenas com um gene referência, o *MDH*.

A partir destes resultados podemos observar que a maioria das plantas tratadas com *pIR-Vf2* apresentou maiores níveis de expressão do gene *Vf2* do que nas plantas controle tratadas apenas com o plasmídeo vazio *pIR*. Dentro de uma ampla variação da expressão do gene de interesse, algumas plantas apresentaram níveis altíssimos de expressão de *Vf2* em relação a seus controles, chegando a 43 vezes o nível do controle para ‘Maxi Gala’ e 27 vezes o nível do controle para ‘Fuji Suprema’. Os valores médios da expressão de *Vf2* dentre todas as plantas tratadas mostraram um aumento de 8,3 vezes para Maxi Gala e de 9,4 vezes para Fuji Suprema.

Estes resultados mostram que o tratamento nas plantas com os plasmídeos vegetais foi eficaz em conferir altos níveis de expressão do gene *Vf2* em macieira. O gene introduzido permanece com expressão estável e as plantas tratadas apresentam níveis elevados do transcrito de *Vf2* mesmo após 10 meses do tratamento em ambas cultivares.

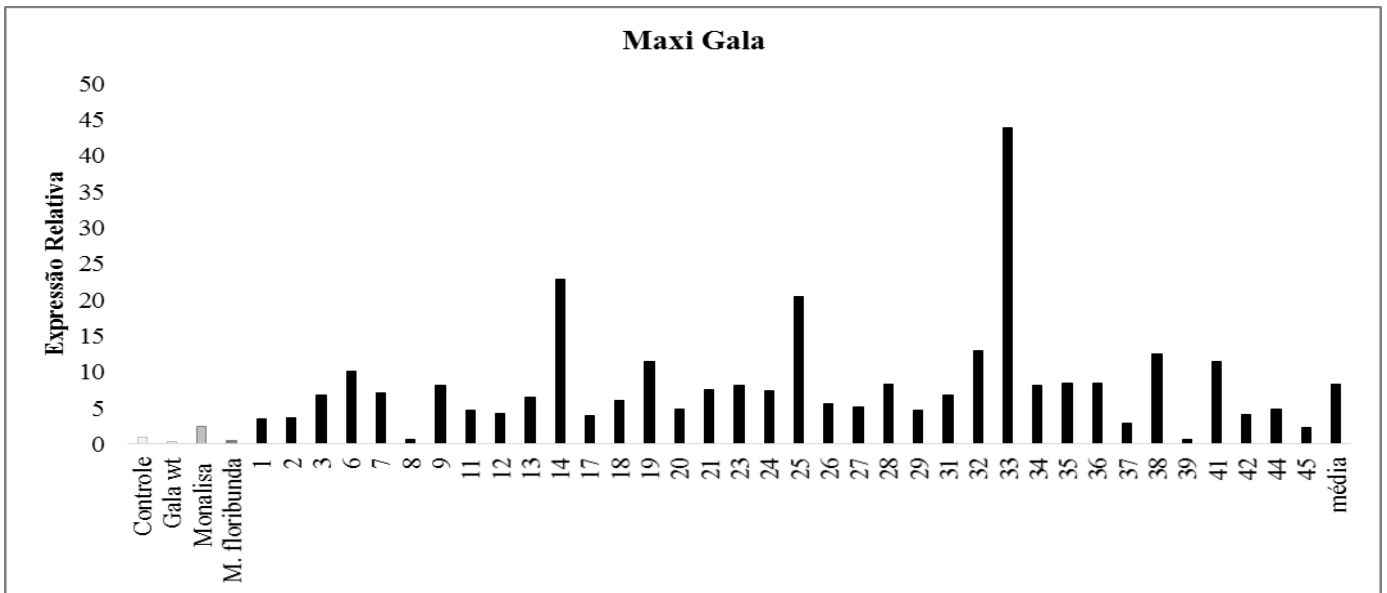


Figura 16: Análise do acúmulo de transcritos do gene *Vf2* na cultivar Maxi Gala 8 meses após o tratamento com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. A expressão relativa foi calculada pelo método do Pfaffl (2001). As barras brancas indicam os controles sem o tratamento com *pIR-Vf2*; barras cinza: cultivares selvagens portadoras do gene *Vf2*; barras pretas: plantas tratadas com *pIR-Vf2* superexpressando *Vf2*. A média entre todas as plantas tratadas com *pIR-Vf2* é mostrada à extrema direita do gráfico.

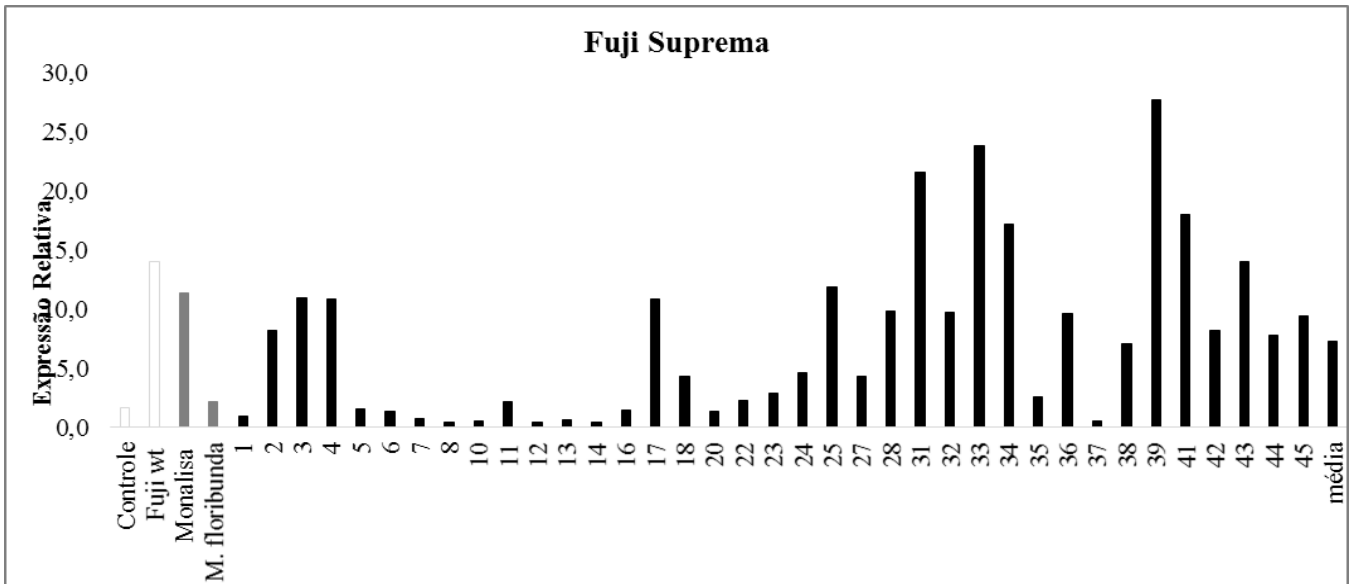


Figura 17: Análise do acúmulo de transcritos do gene *Vf2* na cultivar Fuji Suprema 8 meses após o tratamento com *pIR-Vf2* mais o plasmídeo *helper*. A expressão relativa foi calculada pelo método do Pfaffl (2001). As barras brancas indicam os controles sem o tratamento com *pIR-Vf2* ; barras cinza: cultivares selvagens portadoras do gene *Vf2*; barras pretas: plantas tratadas com *pIR-Vf2* superexpressando *Vf2*. A média entre todas as plantas tratadas com *pIR-Vf2* é mostrada à extrema direita do gráfico.

5.4 Sinais de conídios de *V. inaequalis* em plantas de macieira

A inoculação por aspersão e gotejamento em folhas destacadas não resultou no crescimento de *V. inaequalis* tanto nas plantas superexpressando *Vf2* como nas suscetíveis (Tabela D). Algumas folhas não apresentaram qualquer sinal de infecção independentemente do tratamento ou genótipo (Figura 18 A e D). A maioria das folhas, em ambas formas de inoculação, apresentaram alguns sinais de pontuações e clorose (Figura 18B, C e E), enquanto que algumas folhas tiveram sinais de necrose independente da cultivar e tratamento. Tanto as folhas das cultivares suscetíveis quanto resistentes não apresentaram sinais de infecção (Figura 18 E-H). Este resultado sugere que o inóculo utilizado não foi adequado e o experimento foi inconclusivo.

Tabela I: Interações entre espécies de *Malus* e *V. inaequalis* em folhas destacadas após 30 dias de inoculação de esporos.

Cultivar	Ausência de sinais / sintomas (%)	Pontuações (%)	Clorose (%)	Necrose (%)
Fuji wt	30	-	10	10
Gala wt	40	10	-	10
Fuji controle	40	10	30	10
Gala controle	50	10	20	20
Fuji <i>pIR-Vf2</i>	48	13	26	13
Gala <i>pIR-Vf2</i>	30	22	32	16

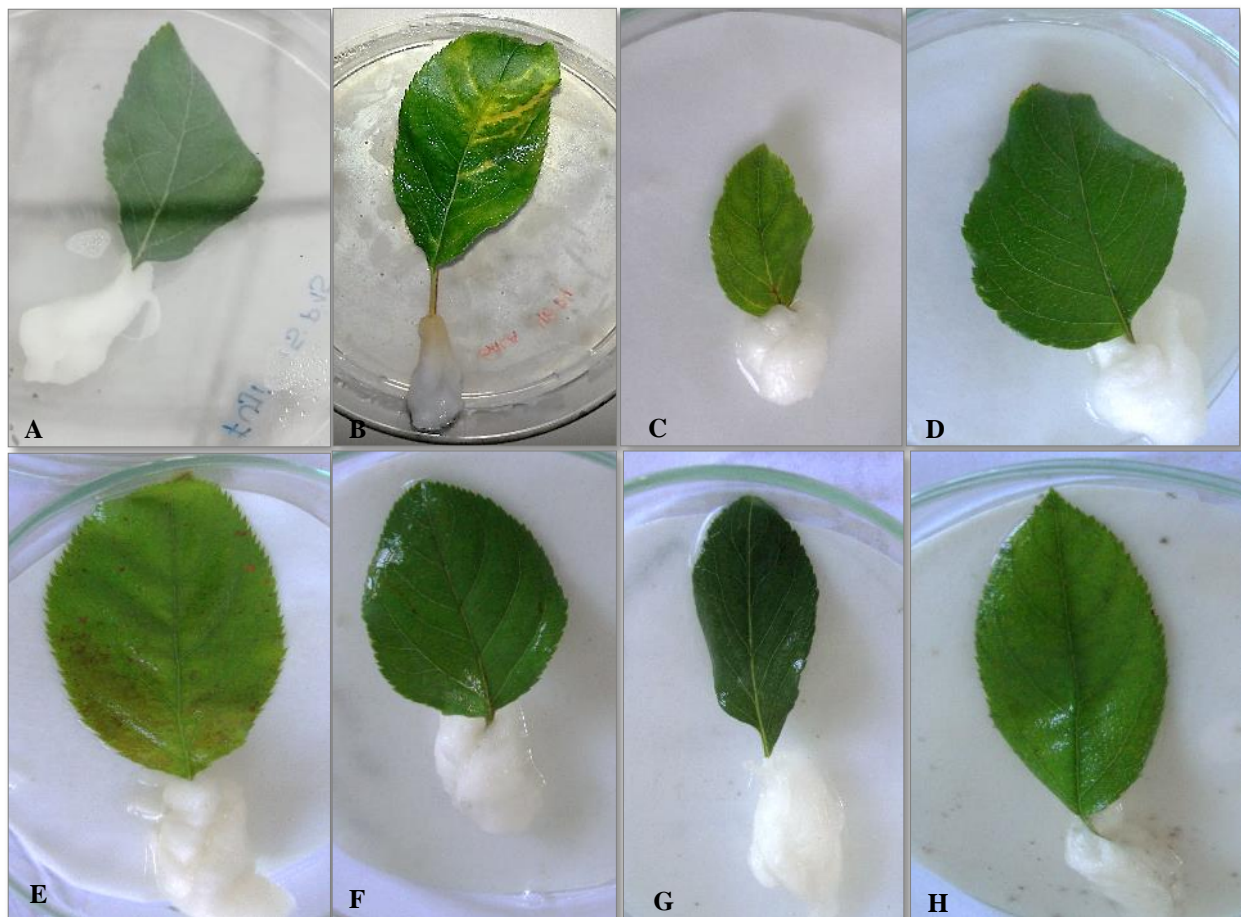


Figura 18: Sintomas observados em folhas destacadas após 30 dias de inoculação com suspensão de conídios de *V. inaequalis*. (A) e (B) folhas de Fuji Suprema e Maxi Gala, respectivamente, tratadas com *pIR-Vf2* em meio ágar-água em placa de Petri; (C) e (D) folha Maxi Gala e Fuji Suprema tratada com *pIR-Vf2* com papel umedecido em placa de Petri; (E) e (F) folha Maxi Gala e Fuji Suprema tipo selvagem (controle suscetível) com papel umedecido em placa de Petri; (G) e (H) folha de Monalisa e *M. floribunda* tipo selvagem (controle resistente) com papel umedecido em placa de Petri.

5.5 Macieiras de Fuji e Gala expressando Vf2 apresentam uma redução na severidade da sarna

As plantas mantidas em vasos tratadas com suspensão de conídios apresentaram sintomas de infecção pela sarna da macieira 30 dias após a inoculação. As plantas do tipo selvagem ‘Fuji Suprema’ e ‘Maxi Gala’ apresentaram sintomas em suas folhas (Figura 19 e 20 A-B) e a presença de conídios de *V. inaequalis* foi confirmada por microscopia ótica (Figura 21 A e B). As plantas testemunhas resistentes não apresentaram sinais de infecção. Curiosamente, o controle de ‘Maxi Gala’, inoculado com o plasmídeo pIR vazio, apresentou baixa severidade da doença (Figura 19). As plantas testemunhas suscetíveis inoculadas com água não apresentaram sintomas de infecção (Figuras 20 C e 21 C). Entretanto, somente algumas das plantas superexpressando Vf2 apresentaram sinais de infecção. Dentre 36 plantas da cultivar ‘Maxi Gala’ que foram inoculadas com esporos, apenas três plantas apresentaram sintomas em suas folhas. Já em ‘Fuji Suprema’, de um total de 37 plantas inoculadas com suspensão conidial apenas sete apresentaram sintomas de infecção (Figura 19). Embora não consigamos correlacionar os níveis de expressão obtidos com a porcentagem de severidade da doença. Este resultado indica que os plasmídeos vegetais utilizados podem ser utilizados para a rápida transferência de genes de interesse para macieira e conferir resistência às plantas tratadas.

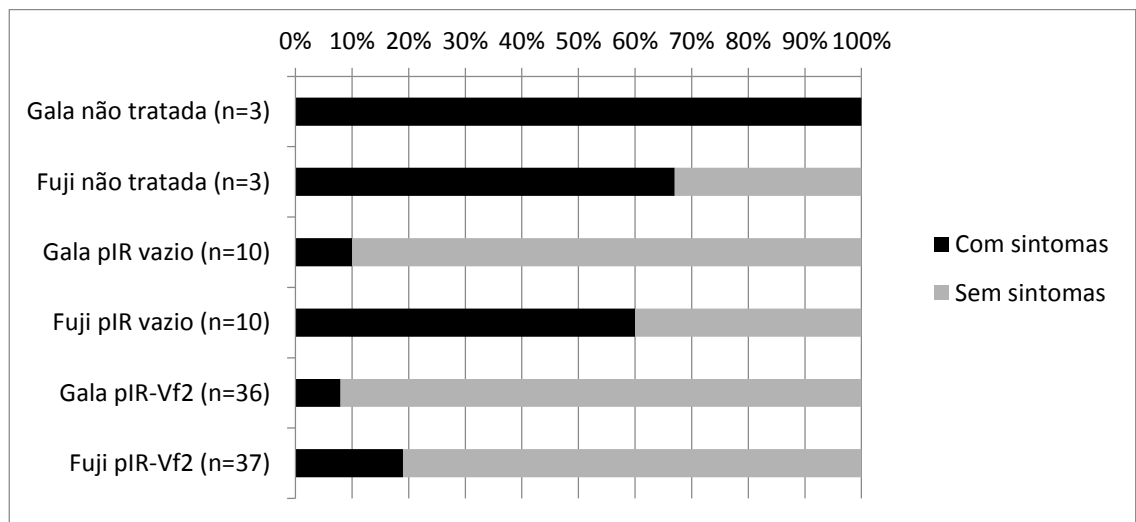


Figura 19: Severidade da infecção por *V. inaequalis* em folhas de plantas de diferentes genótipos de macieiras mantidas em vasos 30 dias após da inoculação de esporos. A porcentagem indica a média entre o número total de folhas da planta com o número total de folhas com o aparecimento de sintomas de infecção.

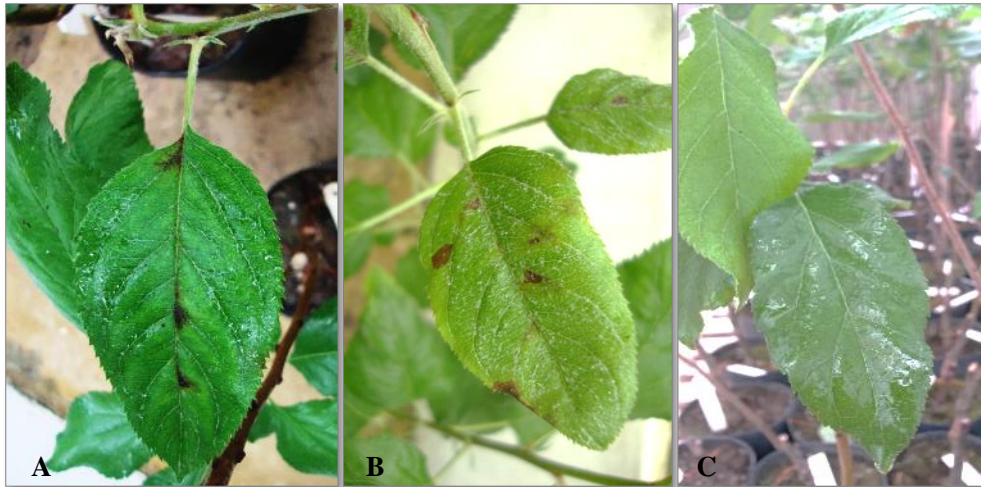


Figura 20: Interação entre espécies de *Malus* e isolado de *V. inaequalis*. Plantas em vasos após 30 dias de inoculação com suspensão de conídios. (A) e (B) folha de 'Maxi Gala' e 'Fuji Suprema' (testemunha suscetível) com sintomas de infecção de *V. inaequalis*; (C) folha de 'Maxi Gala' inoculada apenas com água destilada (testemunha suscetível).

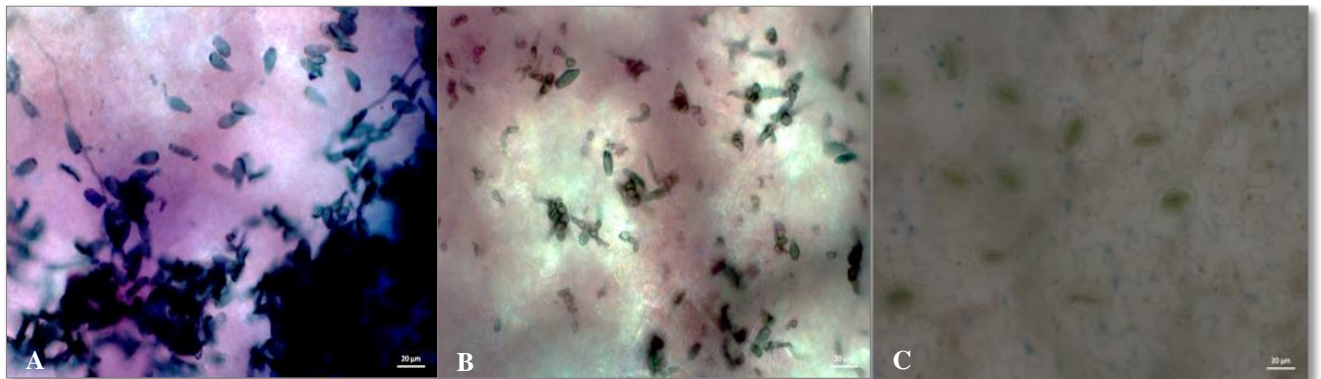


Figura 21: Visualização da presença de conídios da interação entre espécies de *Malus* e isolado de *V. inaequalis* em plantas em vasos após 30 dias de inoculação com suspensão de conídios. (A) e (B) presença de conídios de *V. inaequalis* em 'Maxi Gala' e 'Fuji Suprema' com sintomas de infecção; (C) 'Maxi Gala' inoculada apenas com água destilada (testemunha suscetível). A escala corresponde a 20 µm.

6 DISCUSSÃO

O *locus Vf*, que confere resistência à sarna da macieira, foi identificado na espécie silvestre *Malus floribunda* clone 821 (Williams *et al.*, 1966). O *locus Vf* contém um *cluster* de 4 genes (*Vf1-Vf4*) cujas sequências foram identificadas e apresentaram alta similaridade entre si (Williams *et al.*, 1966; Xu and Korban, 2002; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2005). Diversos trabalhos demonstraram a eficácia dos genes *Vf* em conferir resistência à sarna quando introgrididos por cruzamentos ou através de transformação genética (Barbieri *et al.*, 2003; Belfanti *et al.*, 2004; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2005; Malnoy *et al.*, 2008).

Neste trabalho, nos propusemos a testar a capacidade de plasmídeos vegetais derivados de vírus em servir como ferramenta biotecnológica para acelerar a transferência da resistência à sarna em cultivares suscetíveis amplamente cultivadas no Brasil.

De posse da construção de expressão, no verão de 2015 foram tratadas inúmeras plantas das cultivares Fuji Suprema e Maxi Gala. Uma de nossas maiores dificuldades foi a detecção confiável dos plasmídeos vegetais nos tecidos das plantas tratadas. Este problema já foi observado anteriormente (Miri Lapidot, Morflora Israel LTD., comunicação pessoal) e supostamente deve-se à baixa concentração do DNA plasmidial nos tecidos vegetais. Para contornar este problema, por sugestão dos pesquisadores da Morflora Israel LTD, optamos pela detecção através da *Nested-PCR*. Esta técnica, de alta sensibilidade para detectar DNA, permitiu-nos diagnosticar a presença do DNA plasmidial nas cultivares Fuji Suprema e Maxi Gala tratadas com estes plasmídeos. Estes resultados mostram que os plasmídeos vegetais são detectáveis sistemicamente após 15 dias (figura 8 e 9), e 30 dias (figuras 10-16) em plantas tratadas. Em tomateiro foi demonstrado a presença do DNA plasmidial após três dias de tratamento com os plasmídeos vegetais, sendo mantidos até o final do ciclo da planta, enquanto que em outras espécies só foi possível detectar após três semanas (Peretz *et al.*, 2007). As construções contendo o plasmídeo de expressão pIR são estáveis em células vegetais (Gover *et al.*, 2014). Entretanto, as construções são móveis no corpo da planta somente com a administração de ambos plasmídeos juntos, pIR e *helper*. A origem de replicação presente no plasmídeo pIR funciona como um promotor bidirecional constitutivo. Em nosso estudo optamos por não utilizar nenhuma sequência reguladora adicional à sequência IR. Em nossos experimentos, o nível de expressão em plantas de macieira tratadas para ambas cultivares foi maior em comparação com plantas controle (gráfico 1 e 2). A variação dos genes referências entre as cultivares pode ser explicada por se tratarem de genótipos diferentes. Um estudo de perfis de expressão gênica selecionou os melhores genes

de referência em diferentes tecidos de macieira. Este estudo demonstrou que, *MDH*, *TMp1*, *WD40*, *SAND* e *THFS* apresentaram melhor estabilidade em ‘Royal Gala’ (Perini *et al.*, 2014). Com isso, mais estudos de expressão gênica são necessários para testar os demais genes de referência da literatura e verificar sua estabilidade na cultivar Fuji Suprema.

O promotor baseado na região intergênica (IR) do TYLCV presente no plasmídeo de expressão (Gover *et al.* 2014) pode não ter sido a opção mais eficaz na garantia de superexpressão mais consistente. Trabalhos que superexpressaram *Vf2* em macieira através de transformação genética obtiveram altos níveis de expressão do transgene com a utilização dos promotores CaMV35S (Belfanti *et al.*, 2004), do promotor dos próprios genes *Vf* (Malnoy *et al.*, 2008; Szankowski *et al.*, 2009) e da subunidade menor da rubisco da macieira (Joshi *et al.*, 2011). Uma abordagem utilizando combinações alternativas de promotores controlando a expressão de *Vf2* poderá produzir plantas com expressão mais estável e elevada.

O crescimento de *V. inaequalis* em meio de cultura é relativamente lento quando comparado a outros patógenos de macieira como *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* (Leben and Keitt, 1948). Condições como temperatura, pH, luminosidade e qualidade das folhas com lesões de sarna podem influenciar na virulência do fungo (Schenato, 2007). A baixa virulência do inóculo produzido neste estudo pode ter influenciado a ausência de lesões em folhas testemunhas de cultivares suscetíveis. Apesar dos ensaios *in vitro* não terem funcionado como esperado, o ensaio *in vivo* foi eficaz, apresentando sinais de infecção e esporulação em folhas testemunhas suscetíveis. A maioria das plantas superexpressando *Vf2* apresentou ausência de sinais de infecção da sarna da macieira, enquanto que praticamente todas as plantas testemunhas suscetíveis apresentaram sintomas de infecção. Estudos similares com cultivares suscetíveis já haviam sido realizados, embora tenham utilizados outras abordagens, como a introgressão do gene *Vf2* por *Agrobacterium tumefaciens* (Barbieri *et al.*, 2003; Belfanti *et al.*, 2004; Silberberg-Dilworth *et al.*, 2005; Malnoy *et al.*, 2008) ou cisgenia (Joshi *et al.*, 2011; Vanblaere *et al.*, 2011, 2014; Krens *et al.*, 2015). Este ensaio mostrou que o gene *Vf2* é funcional nas plantas tratadas e apresenta a mesma resistência presente em cultivares com *Vf* introgridido por cruzamentos, como é o caso de Monalisa, utilizada neste estudo. Nossos resultados corroboram a hipótese de que a expressão ectópica de *Vf2* utilizando-se plasmídeos vegetais é funcional da mesma forma que em plantas obtidas pelo melhoramento clássico ou por transgenia (Barbieri *et al.*, 2003; Belfanti *et al.*, 2004; Szankowski *et al.*, 2009; Joshi *et al.*, 2011; Gessler e Pertot, 2012).

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, os plasmídeos vegetais foram detectados nos tecidos de macieira de forma sistêmica após 15 e 30 dias do tratamento com o DNA plasmidial. Além disso, a superexpressão do gene *Vf2* foi observada 8 meses após o tratamento com os plasmídeos vegetais. Portanto, os plasmídeos vegetais podem ser utilizados como uma alternativa para a rápida transferência de genes de interesse para macieira e conferir resistência à agentes patogênicos.

REFERÊNCIAS

- ABPM. Associação Brasileira dos Produtores de Maçã. Disponível em: <http://www.abpm.org.br/>. Acesso em: dezembro/2015.
- Barbieri M *et al.* (2003) Progress of map-based cloning of the *Vf* resistance gene and functional verification: preliminary results from expression studies in transformed apple. *HortScience* 38(3):329–331.
- Belfanti E *et al.* (2004) Gala apple transformed with the putative scab resistance gene *HcrVf2*. *Acta Horti* 663(1):453–456.
- Blanchet F, Sanhueza RMV and Spolti P (2012) Resistência parcial de cultivares de macieira a *Venturia Inaequalis*. *Tropical Plant Pathology* 37:291-297.
- Boneti JI, Katsurayama Y and Sanhueza RMV (2001) Manejo da Sarna na Produção Integrada de Maçã. Circular Técnica, 30. Bento Gonçalves: EMBRAPA 1-20.
- Boneti JI and Katsurayama Y (2013) Situação atual do manejo da sarna da macieira (*Venturia inaequalis*) no Brasil. *Revista Cultivar - Hortaliças e Frutas* 79:20-22.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>. Acesso em: dezembro/2015.
- Fioravanço C, Girardi CL, Czermainski ABC, Silva GA, Nachtigall GR and Oliveira PRD (2010) Cultura da macieira no Rio Grande do Sul: análise situacional e descrição varietal. *Embrapa Uva e Vinho* 2:10-60 (Documentos, 71).
- Gessler C and Pertot I (2012) *Vf* Scab resistance of *Malus* Trees 26:95-108.
- Gover O, Peretz Y, Mozes-Koch R, Maori E, Rabinowitch HD and Sela I (2014) Only minimal regions of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) are required for replication, expression and movement. *Arch Virol* 159:2263-2274.
- Horvath DP, Anderson JV, Chao WS and Foley ME (2003) Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science* 8:534-540.
- James JR and Sutton TB (1982) Environmental factors influencing pseudothecial development and ascospores maturation of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 72:1073-1080.
- Jha G, Thakur K and Thakur P (2009) The *Venturia* Apple Pathosystem: Pathogenicity Mechanisms and Plant Defense Responses. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009:1-10.
- Joshi SG, Schaart JG, Groenwold R, Jacobsen E, Schouten HJ and Krens FA (2011) Functional analysis and expression profiling of *HcrVf1* and *HcrVf2* for development of scab resistant cis-genic and intragenic apples. *Plant Mol Biol* 75:579–591.

- Joshi SG, Schaart JG, Groenwold R, Jacobsen E, Schouten HJ and Krens FA (2011) Functional analysis and expression profiling of *HcrVf1* and *HcrVf2* for development of scab resistant cis-genic and intragenic apples. *Plant Mol Biol* 75:579–591.
- Kucheryava N *et al.* (2008) Two novel *Venturia inaequalis* genes induced upon morphogenetic differentiation during infection and *in vitro* growth on cellphane. *Fungal Genet Biol* 45:1329-1339.
- Lang GA, Early JD, Martin GC and Darnell RL (1987) Endo-, Para-, and Ecodormancy: Physiological Terminology and Classification for Dormancy Research. *HortScience* 22:371-377.
- Lefort F, Douglas GC (1999) An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus*, and *Quercus*. *Annals of Forest Science* 56:259-263.
- Lodhi MA, Guang-Ning Y, Weeden NF and Reisch BI (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:6-13.
- Lu B and Xu X (2002) Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves. *Journal of Phytopathology* 150:687-691.
- Machardy WE (1996) Apple scab: biology, epidemiology and management. *Phytopathological* 1-545.
- Machardy WE, Gadoury DM and Gessler C (2001) Parasitic and Biological Fitness of *Venturia inaequalis*: Relationship to Disease Management Strategies. *Plant Disease* 85:1036-1052.
- Malnoy M, Xu ML, Borejsza-Wysocka E, Korban SS and Aldwinckle HS (2008) Two receptor-like genes, *Vfa1* and *Vfa2*, confer resistance to the fungal pathogen *Venturia inaequalis* inciting apple scab disease. *Mol Plant Microbe Interact* 21:448–458.
- Mills WD (1944) Efficient use of sulfur dusts and sprays during raining to control apple scab. *Cornell Ex. Bull* 630:1-4.
- Nusbaum CJ and Keitt GW (1938) A cytological study of *Venturia inaequalis* on apple leaves. *Journal of Agricultural Research* 56:595-618.
- Parisi L, Lespinasse Y, Guillaumes J and Kruger J (1993) A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. *Phytopathology* 83:533-537.
- Patocchi A, Vinatzer BA, Gianfranceschi L, Tartarini S, Zhang HB, Sansavini S and Gessler C (1999) Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple scab resistance gene *Vf*. *Mol Gen Genet* 262:884–891.
- Perini P, Pasquali G, Margis-Pinheiro M, Oliveira PRD and Revers LF (2014) Reference genes for transcriptional analysis of flowering and fruit ripening stages in apple (*Malus x domestica* Borkh.) *Mol Breeding* 34:829-842.

- Petri JL, Palladini LA and Pola AC (2006) A cultura da macieira. Florianópolis, In: EPAGRI 261-297.
- Peretz Y, Mozes-Koch R, Akad F, Tanne E, Czosnek H and Sela I (2007) A Universal Expression/Silencing Vector in Plants. *Plant Physiol* 145:1251-1263.
- Szankowski I, Waidmann S, Degenhardt J, Patocchi A, Paris R, Silfverberg-Dilworth E, Brogini G and Gessler C (2009) Highly scab-resistant transgenic apple lines achieved by introgression of *HcrVf2* controlled by different native promoter lengths. *Tree Genet Genomes* 5:349–358.
- Stensvand A, Eikemo H, Seem RC and Gadoury DM (2009) Ascospore release by *Venturia inaequalis* during periods of extended daylight and low temperature at Nordic latitudes. *Eur J Plant Pathol* 125:173–178.
- Sivansen A (1977) The taxonomy and pathology of *Venturia* species. Vaduz, Liechtenstein: Bibliotheca Mycologica 1-138.
- Schenato PA, Aldebenito-Sanhueza RM and Duarte V (2008) Determinação da presença da raça 1 de *Venturia inaequalis* no Sul do Brasil. *Tropical Plant Pathology* 33:281-287.
- Schumacher CFA, Steiner U, Dehne H-W and Oerke, E-C (2008) Localized adhesion of nongerminated *Venturia inaequalis* conidia to leaves and artificial surfaces. *Phytopathology* 98:760–768.
- Silfverberg-Dilworth E, Besse S, Paris R, Belfanti E, Tartarini S, Sansavini S, Patocchi A and Gessler C (2005) Identification of functional apple scab resistance gene promoters. *TAG* 110:1119–1126.
- Smereka KJ, Kausch AP and MacHardy WE (1988) Intracellular junctional structures in germinating ascospores of *Venturia inaequalis*. *Protoplasma* 142:1-4.
- Schwabe WFS, Jones AL and Jonker JP (1984) Changes in the susceptibility of developing apple fruit to *Venturia inaequalis*. *Ecology and Epidemiology* 74:118–121.
- Shay JR and Williams EB (1956) Identification of three physiological races of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 46:190-193.
- Steiner U and Oerke E-C (2007) Localized melanization of appressoria is required for pathogenicity of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 97:1222–1230.
- Valsangiacomo C and Gessler C (1988) Role of the cuticular membrane in ontogenic and *Vf*-resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 78:1066–1069.
- Vanblaere T, Szankowski I, Schaart J, Schouten H, Flachowsky H, Brogini GA and Gessler C (2011) The development of cisgenic apple plant. *J Biotechnol* 154:304-311.
- Vanblaere T, Flachowsky H, Gessler C and Brogini GA (2014) Molecular characterization of cisgenic lines of apple ‘Gala’ carrying the *Rvi6* scab resistance gene. *Plant Biotechnol J* 12: 2-9.

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3:12.
- Velasco R, Zharkikh A *et al.* (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nat Genet* 42:833-841.
- Vinutzer BA, Zhang HB, Sansavini S (1998) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of apple. *Theor Appl Genet* 97:1183–1190.
- Vlot AC, Dempsey DA and Klessig DF (2009) Salicylic acid a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47:177-206.
- Williams EB and Shay JR (1957) The relationship of genes for pathogenicity and certain other characters in *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Genetics* 42:704-711.
- Williams EB, Dayton DF and Shay JR (1966) Allelic genes in *Malus* for resistance to *Venturia inaequalis*. *Proc Am Soc Hort Sci* 88:52–56
- Xu ML and Korban SS (2002) A cluster of four receptor-like genes resides in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics* 162:1995–2006.
- Xu XM and Robinson J (2005) Modelling the effects of wetness duration and fruit maturity on infection of apple fruits of Cox's Orange Pippin and two clones of Gala by *Venturia inaequalis*. *Plant Pathol.* 54:347–356.
- Zeng Y, Yang T (2002) RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology* 20:417-417.