

GENÔMICA FUNCIONAL: MUTAGÊNESE INSERCIONAL COMO FONTE DE DESCOBERTA DE NOVOS GENES PARA O MELHORAMENTO DE ARROZ (*ORYZA SATIVA* (L.))

Bevitóri, R.¹, Margis, M. M. P.², Silveira, R. D. D.³, Abreu, J.⁴, Silva, Adriano, B.⁵, Ortega, J. M.⁶

INTRODUÇÃO: Devido ao seu pequeno genoma, a facilidade de transformação e a similaridade de seu genoma com outros cereais, o arroz se tornou a espécie modelo para monocotiledôneas. A possibilidade da produção de uma biblioteca de mutantes insercionais em arroz, aliado ao rápido acúmulo de seqüências genômicas geradas pelos diversos projetos públicos e privados, colocaram o arroz como alvo central para os estudos de genômica funcional em cereais. Estas seqüências serão cuidadosamente analisadas em busca de esclarecer a função de todos os genes identificados. O foco internacional agora, é identificar a função específica de cada um dos 20.000 a 40.000 genes preditos. Um poderoso método de identificação da função de um gene consiste na identificação de um mutante para esse gene e, em seguida, no estudo do efeito dessa mutação na planta. A inserção de uma seqüência conhecida em um gene (“gene tag”) produzirá um mutante e fornecerá uma maneira para a determinação da função, bem como um sistema para a identificação do gene. Neste projeto, estamos propondo a construção de uma coleção de mutantes insercionais em arroz, participando assim do esforço internacional, que hora vem se estabelecendo, para o entendimento da função dos genes. Ao mesmo tempo, o resultado deste projeto fornecerá também importante conhecimento para o futuro do melhoramento de plantas, pois este fornecerá genes, suas funções, e indicará caminhos futuros para a incorporação desta característica em cultivares suscetíveis, além de permitir a viabilização de programas de melhoramento por seleção assistida por marcadores moleculares na Embrapa e seus parceiros.

MATERIAL E MÉTODOS: Neste projeto estamos empregando os vetores construídos pelo grupo de genômica funcional de arroz do CSIRO da Austrália (Upadhyaya et al, 2002; <http://www.pi.csiro.au/fgrttpub/home.htm>) visando obter linhagens mutantes portando o elemento transposon *Ds*: As linhagens estão sendo

¹ Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Biotecnologia, Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, CEP 75375-000, Sto. Antônio de Goiás, GO. Fone (62) 35332176. bevitóri@cnpaf.embrapa.br.

² Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre, RS.

³ Estudante de Biologia/UCG, bolsista da Embrapa Arroz e Feijão.

⁴ Estudante de Biologia/UFRGS, bolsista, Porto Alegre, RS.

⁵ Estudante de doutorado/UFGM, Belo Horizonte, MG.

⁶ Biólogo, Ph.D em Ciências Biológicas, UFGM, Belo Horizonte, MG

obtidas pela transformação de calos de arroz (*Oryza sativa*, sub-espécie japônica, cultivar Nipponbare e Primavera), via *Agrobacterium tumefaciens* com a construção contida no vetor pMN393b2 (Figura 1). Calos de linhagens estáveis contendo o elemento *Ds* são depois supertransformadas transitariamente com a construção contendo a transposase contida no vetor pMNlig400D (Figura 2). A avaliação das linhagens contendo inserções estáveis está sendo realizada através das seguintes análises: a) expressão de GFP, a qual indicará a presença da inserção original (“*Ds* launching pad”); b) spray com higromicina; c) PCR utilizando primers específicos para a seqüência do elemento *Ds*; d) PCR utilizando primers específicos para as seqüências flanqueadoras do *Ds* (“*Ds* excision” PCR, o qual mostrará a saída do transposon da inserção original) e teste de coloração para GUS. Esses testes são realizados na primeira geração de mutantes (F2 dos cruzamentos ou DtT1 dos duplo transformantes). As linhagens estáveis com transposição do *Ds* ligado ao sítio de inserção original (“*lauching pad*”) são então selecionadas para o estudo de atividade do gene repórter, fenótipo e subsequente clonagem das regiões flanqueadoras utilizando o sistema de recuperação de plasmídeo (“*plasmide rescue*”). A clonagem das seqüências flanqueadoras dos elementos *Ds* em cada linhagem estável está sendo realizada através do sistema de recuperação de plasmídeo (“*plasmid rescue*”), o qual foi incorporado nas construções. Os plasmídeos são purificados e analisados com enzimas apropriadas antes de serem seqüenciadas utilizando o ABI 3100. As seqüências obtidas serão utilizadas na criação de um banco de dados das seqüências flanqueadoras que representarão os genes interrompidos pelo transposon. Os bancos de dados públicos disponíveis serão utilizados na busca de seqüências homólogas a esses genes interrompidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO. Até o presente momento, foram gerados 498 calos mutantes knock-out; 150 calos foram supertransformados com o plasmídeo pMN400D contendo a transposase; 204 calos mutantes supertransformados resistentes à higromicina; 27 linhagens regenerantes supertransformadas; 5 plasmídeos recuperados e estabelecimento da metodologia para isolamento das seqüências flanqueadoras da inserção. As figuras 3 a 6 mostram os resultados das análises moleculares e de regeneração das plantas. A base de dados do projeto Genômica Funcional de *Oriza sativa* (GenFOs) foi estabelecida no servidor Biotec instalado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Laboratório de Biodados. Foi adquirido o domínio “<http://genfos.net>” para permitir o redirecionamento simplificado para as home pages contruídas. A homepage do projeto pode ser acessada pelo endereço <http://www.biotec.icb.ufmg.br/genfos>. A servidora Biotec já contém as seqüências totais dos pseudocromossomos de arroz organizadas na base de dados MySQL.

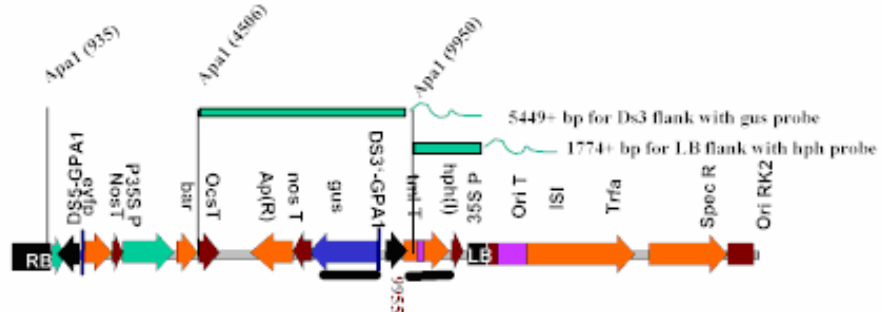


Fig. 1. Vetor de transformação pMN393b2 contendo o elemento *Ds*.

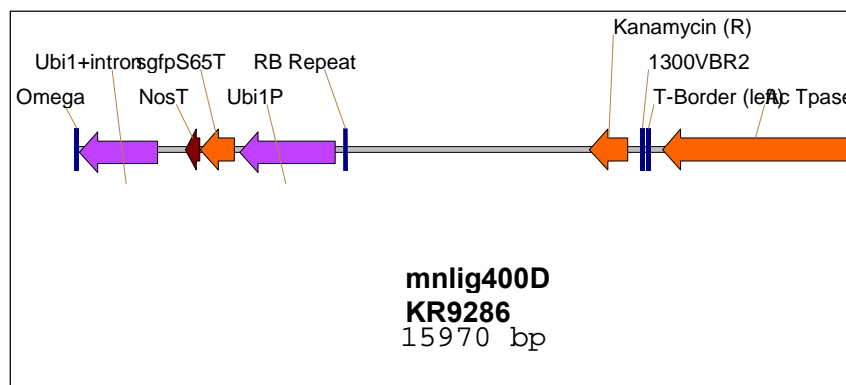


Fig. 3. Vetor de transformação pMNlig400D contendo o elemento a transposase..

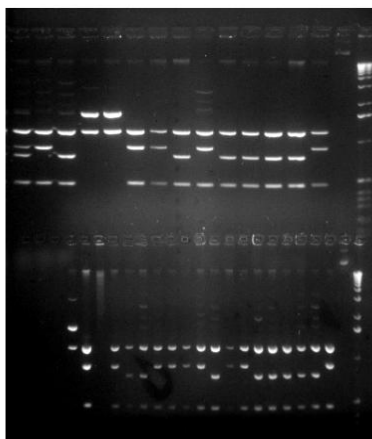


Fig. 4. Isolamento da sequência de DNA genômico flanqueadora do T-DNA/DS (LB rescue).

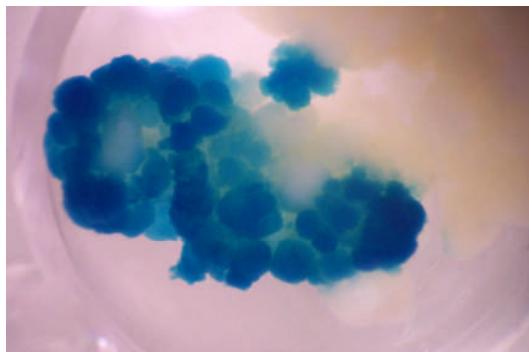


Fig. 5. Calo obtido pela supertransformação da linhagem Ds-23 com o vetor pMN400D mostrando atividade GUS



Fig. 6. Seleção das plantas transgênicas com o herbicida BASTA. (A) Planta transgênica (B) não transgênica.

CONCLUSÕES: após o estabelecimento da metodologia para isolamento das seqüências flanqueadoras da inserção, estão sendo obtidas linhagens transgênicas contendo o elemento Ds e linhagens transgênicas supertransformadas com o plasmídeo pMN400d.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Upadhyaya N. M, et al. An *iAc/Ds* gene and enhancer trapping system for insertional mutagenesis in rice. **Functional Plant Biology** 29:547-559. 2002.