

Validação da Indução ao SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) em Plantas de Milho Via RNA Interferente

Luciana Carla de Souza Santos Andrade^{1,2,4}, Beatriz de Almeida Barros^{2,5}, Andrea Almeida Carneiro^{2,6}, Isabel Regina P. de Souza^{2,7}, Elizabeth de Oliveira^{2,8}, Francisco José Lima Aragão^{3,9} e Newton Portilho Carneiro^{2,10}.

¹Centro Universitário de Sete Lagoas, Minas Gerais, ²EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, ³EMBRAPA Recursos Genéticos, Brasília, Distrito Federal, ⁴lucina.carla15@hotmail.com, ⁵beatriz@cnpmc.embrapa.br, ⁶andrea@cnpmc.embrapa.br, ⁷isabel@cnpmc.embrapa.br, ⁸beth@cnpmc.embrapa.br, ⁹aragao@cenargen.embrapa.br, ¹⁰newtonc@cnpmc.embrapa.br

RESUMO – O milho é um cereal de grande importância mundial e é amplamente cultivado no Brasil. No entanto, o vírus do Mosaico da cana-de-açúcar é responsável por grande perda em monoculturas de milho, o que acarreta grandes prejuízos para a agricultura e economia. A seleção de plantas resistentes ao vírus apresenta-se como uma prática desejável, porém, técnicas convencionais de melhoramento demandam muito tempo. Assim a transformação genética se mostra como uma alternativa eficaz para a produção mais rápida de cultivares resistentes. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da construção Ubi::SCMV-Intron-SCMV-NOS no silenciamento viral nas plantas transgênicas. Para tanto foram utilizados 12 eventos, produzidos na EMBRAPA Milho e Sorgo, que foram inoculados com o vírus do mosaico. A presença do vírus foi verificada por meio de avaliação visual dos sintomas da doença e detecção do cDNA viral utilizando *primers* específicos para regiões presentes e ausentes na construção. Os resultados das PCR mostraram que dos doze eventos iniciais três foram negativos para a detecção do cDNA viral indicando que a construção utilizada na transformação é eficiente na indução do silenciamento do mRNA viral.

Palavras-chave: cDNA, PCR, mRNA viral.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.), um cereal de origem mexicana e amplamente cultivado no mundo, tem grande importância na produção de derivados e na alimentação animal (CRUZ, 2008). Segundo a Conab (2012), a estimativa brasileira para a produção do milho este ano é de 65 milhões de toneladas.

Apesar de sua grande importância, a cultura de milho muitas vezes se mostra susceptível ao ataque de pragas.

O vírus do mosaico da cana-de-açúcar é um agente causador de doença que pode afetar uma diversidade de culturas, dentre elas, a do milho. Essa doença é transmitida de planta para planta por meio, principalmente, do pulgão do milho (*Rhopalosiphum maidis*) (CASELA, et al., 2006).

O mosaico do milho acomete praticamente todas as regiões de cultivo de milho e é

responsável pela perda de metade de toda a produção do cereal. O complexo viral responsável pela doença faz parte do grupo de *Potyvirus* e, dentre eles, está o *Sugarcane Mosaic Virus* (Vírus do Mosaico da Cana-de-açúcar) (FERREIRA, et al. 2000).

Sendo assim, a seleção de plantas resistentes ao vírus é uma prática de manejo extremamente interessante. No entanto, a identificação de genótipos resistentes por meio de técnicas convencionais de melhoramento demanda tempo demasiado longo.

A transformação genética se apresenta como uma alternativa eficaz para a produção mais rápida de tais cultivares. A estratégia baseada em RNA interferente foi utilizada neste trabalho buscando o silenciamento pós-transcricional, por meio de pequenos RNAs (siRNAs), do mRNA viral.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da construção Ubi::SCMV-Intron-SCMV-NOS no silenciamento viral em plantas transformadas de milho.

Material e Métodos

Foram utilizados 12 eventos de transformação genética – 5; 6; 8; 19; 41; 51; 54; 56; 80; 97; 105; 106 – ainda segregantes para a presença do transgene, produzidos pela Embrapa Milho e Sorgo, sendo que cada evento foi representado por oito plantas.

O plantio foi realizado em casa de vegetação, em bandejas de isopor contendo substrato vegetal. Amostras de tecido foliar foram coletadas depois de sete dias após a germinação, e a extração do DNA foi realizada de acordo com Lana et al. (2010). Posteriormente, as plantas positivas para o transgene foram identificadas por PCR utilizando *primers* específicos SCMV5 e SCMV3 (Tabela 1) que amplificam uma parte da sequência que codifica a capa proteica do vírus presente na construção utilizada para a produção dos eventos transgênicos. As plantas negativas foram descartadas.

Para análise fenotípica das plantas positivas selecionadas foram realizados três inóculos do vírus do mosaico, em intervalos de cinco dias. Para tanto, utilizou-se macerado de folhas de milho com sintomas da virose ao qual foram adicionados tampão fosfato de potássio (pH: 7; 10mM) e Carborundo malha 600. Após 0, 15 e 30 dias do primeiro inóculo, coletou-se material foliar para extrações de RNA total.

Uma fenotipagem foi realizada por meio de análise visual de sintomas para identificar plantas assintomáticas ao vírus. A extração de RNA total dessas plantas foi feita com reagente

Trizol[®] (Invitrogen), de acordo com recomendações do fabricante. Para a síntese de cDNA, foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), de acordo com recomendações do fabricante.

As reações de PCR com amostras de cDNA foram realizadas utilizando *primers* específicos (Tabela 1) que amplificam regiões virais e íntron presentes na construção e parte da sequência do vírus fora da construção para detecção da transcrição do RNA viral. *Primers* que amplificam o gene actina foram utilizados como controle interno para verificação da qualidade do cDNA e possíveis contaminações com DNA genômico. A reação foi realizada utilizando-se o kit *Taq* DNA Polymerase (Sigma-Aldrich). Em cada reação foram utilizados: 1 µl da reação de síntese de cDNA; cloreto de magnésio (2,0 mM); 62,5 µM de dNTPs ; tampão de PCR 1X; 0,125 µM de cada *primer*; 0,5U de *Taq* Polimerase num volume final de 20 µl. As reações foram realizadas em termociclador com período inicial de desnaturação 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 s/ 60°C por 30/ 72°C por 30 s e um período de extensão de 72°C por 4 min.

Para verificar a presença de pequenos RNAs (siRNAs) induzidos pela transcrição eficiente da construção utilizada, um *Northern Blot* está sendo realizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (DF).

Resultados e Discussão

A análise fenotípica indicou que as amostras 6.8; 41.3; 41.4; 41.6; 54.1; 54.5; 80.7; 105.1; 105.5; 106.4; 106.8 – (11 plantas) apresentaram-se assintomáticas ao vírus do mosaico. A reação de PCR realizada com cDNA de indivíduos sem sintomas representativos de cada evento utilizando *primers* específicos para o íntron não apresentou banda em nenhuma das amostras, como o esperado. A PCR realizada para amplificar uma parte da sequência que codifica a capa proteica do vírus presente na construção indicou que cinco amostras foram contaminadas (6.8, 80.7, 41.4, 105.1, 105.5) e cinco eram potencialmente eficientes (41.3, 54.1, 54.5, 106.4, 106.8) (Figura 1). A reação com *primers* específicos para amplificar a parte da sequência do vírus fora da construção (Figura 2) detectou a mRNA viral em três amostras – 6.8, 41.4 e 105.5, 30 dias após o inóculo.

Conclusão

Dos doze eventos iniciais três foram negativos para a detecção do cDNA viral indicando que a construção utilizada na transformação foi eficiente na indução do

silenciamento do mRNA viral.

Literatura Citada

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. da S.; FERNANDES, F. T.; PINTO, N. F. J. A. Doenças. In: RODRIGUES, J. A. S.; VERSIANI, R. P.; FERREIRA, M. T. R. (Ed.). Cultivo do sorgo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 2). <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Sorgo/CultivodoSorgo_2ed/doencas_cana.htm#topo>.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: grãos: safra 2011/2012 sétimo levantamento: abril 2012.. <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_11_15_04_18_boletim_abril_2012.pdf>.

CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHAES, P. C. A cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 517p.

FERREIRA, A. da S.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F. T.; PINTO, N. F. J. de A. Doenças. In: CRUZ, J. C.; VERSIANI, R. P.; FERREIRA, M. T. R. (Ed.). Cultivo do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2000. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 1). <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_3ed/doencasvirus.htm#topo>.

LANA, U. G. de P.; GOMES, P. C.; TINOCO, C. F. da S.; OLIVEIRA, B. C. F. S.; GUIMARAES, C. T.; MAGALHAES, J. V. de; OLIVEIRA, B. C. F. S. Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para extração de DNA de tecido vegetal em larga escala. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 104).

Tabela 1: Primers Forward (F) e Reverse (R) utilizados para reações de PCR.

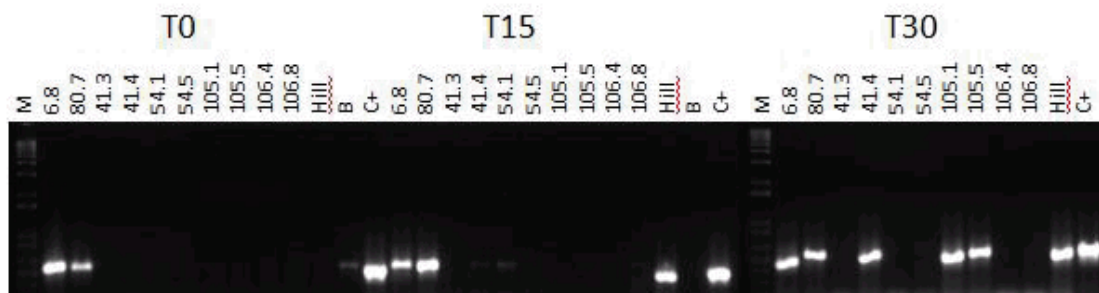
Primer	Sequência
SCMV5 ¹	(F) 5' GCGGATCCTCTAGACTCGGAGTAGGGACTGGTGCAAC 3'
SCMV3 ¹	(R) 5' GCGGATCCAAGCTTGCTACCTGAAGTCCGTACCTTGG 3'
pKb1 ²	(F) 5' AGTGATGTTAATTAGTATG 3'
pKb4 ²	(R) 5' CACATTGACATGATCTATC 3'
SCMV8F ³	(F) 5' ACGCTACGGCTGCTTGTTATT 3'
SCMV8R ³	(R) 5' CATTGGGAATGGTGGAAAAT 3'
ActinaF ⁴	(F) 5' cctgaagatcacctgtgct 3'
ActinaR ⁴	(R) 5' ACAAGGGATGGGTGGAACAG 3'

¹ - Primers que amplificam uma parte da sequência que codifica a capa proteica do vírus presente na construção.

² - Primers que amplificam íntron.

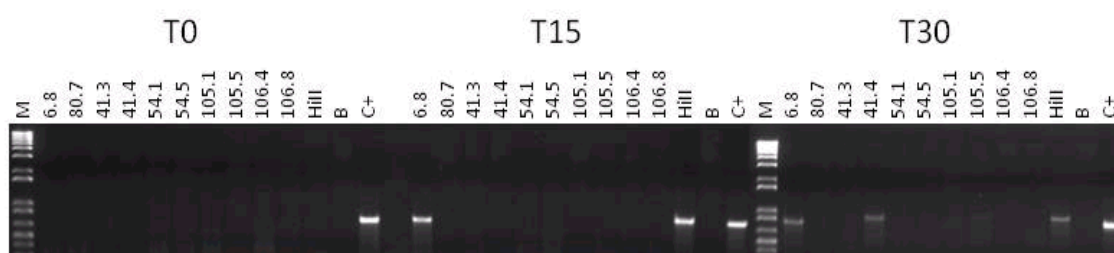
³ - Primers que amplificam sequência do vírus fora da construção.

⁴ - Primers que amplificam o gene da actina.



Fi
g

ura 1. PCR realizada com *Primers* específicos para amplificar região no vírus do mosaico na construção. M: marcador molecular de 1Kb; 6.8 à 106.8: amostras de cDNA de plantas transformadas; HiII: controle não transgênico; B: branco; C+: controle positivo plasmídeo SCMV. T0, T15 e T30 indicam 0, 15 e 30 dias após o primeiro inóculo do vírus, respectivamente.



Fi

gura 2. PCR realizada com *Primers* específicos para amplificar região no vírus do mosaico fora da construção. M: marcador molecular de 1Kb; 6.8 à 106.8: amostras de cDNA de plantas transformadas; HiII: controle não transgênico; B: branco; C+: controle positivo HiII contaminado com o vírus. T0, T15 e T30 indicam 0, 15 e 30 dias após o primeiro inóculo do vírus, respectivamente.