

Resistência ao *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) por RNAi em Plantas Transgênicas de Milho¹

Luciana Carla de Souza Santos Andrade², Isabel Regina P de Souza³, Elizabeth de Oliveira³; Francisco José Lima Aragão⁴, Andréa A. Carneiro³; Newton P. Carneiro³

¹ Trabalho financiado pelo CNPq, FAPEMIG, Embrapa

² Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário, UNIFEMM, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq - Embrapa

³ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

⁴ Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Introdução

O milho é um cereal cuja cultura vem crescendo extensamente no mundo. No entanto, a limitação da terra produtiva, os recursos de água, os estresses ambientais, as doenças que acometem a cultura e o grande crescimento da população ocasionam uma grande demanda no aumento da produção, bem como na sua qualidade (HUANG; WEI, 2004). Dentre os grandes prejuízos enfrentados pela agricultura, encontram-se os ataques de pragas e doenças em milho. Doenças que antes não eram problema, aumentaram sua incidência, como é o caso das viroses e dos enfezamentos (causados por mollicutes - fitoplasmas e espiroplasmas). Dentre as estirpes do complexo viral, Fuchs et al. (1996) verificaram que *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) e *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) são as mais importantes potyviroses, causando perdas significativas na produção de grãos e forragem em genótipos de milho susceptíveis. Os efeitos causados pelo Mosaico em plantas de milho são tanto maiores quanto mais cedo se estabelece a infecção, sendo que estimativas experimentais mostram reduções na produção da ordem de 50%, em genótipos suscetíveis (FERNANDES et al., 1995). O crescimento das plantas pode ser acentuadamente reduzido, conforme a espécie e estirpe do vírus e a cultivar de milho, principalmente quando a infecção ocorre nos estágios iniciais de desenvolvimento (GONÇALVES et al., 2007). A geração de cultivares cada vez mais produtivas, resistentes a pragas e adaptadas às mais diversas condições de cultivo pode ser acelerada com a utilização de técnicas de mapeamento genético, manipulação gênica e transformação. Deste modo, o desenvolvimento de cultivares superiores mais produtivas, através da introdução de genes de resistência a vários estresses bióticos, é altamente desejável. O objetivo desse trabalho foi o de obter plantas de milho resistentes ao vírus do mosaico da cana-de-açúcar, através do uso de calos friáveis de milho HiII, susceptíveis ao mosaico. O processo utilizado foi obtendo transformantes de milho via biobalística empregando-se duas construções baseadas na tecnologia do RNAi, em que uma sequência de 499 pb da capa proteica do SCMV (representado na Figura 1) foi utilizada na montagem do looping do plasmídeo 19 (RNAi correto) e do plasmídeo 28 (controle RNAi negativo) (Figura 2); para a montagem das sequências foi utilizado pKanibal que continha o intron, responsável pela alça do looping no plasmídeo 19, e transferidas para o pCAMBIA 3301.

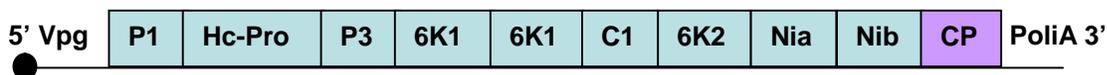


Figura 1 - Representação esquemática da organização genômica de potyvirus indicando as proteínas codificadas pelo vírus e as suas possíveis funções. P1 primeira protease, HC-Pro helper component - protease, P3 terceira protease. A proteína C1 tem atividade RNA helicase; 6K1 e 6K2 são peptídeos; N1a e N1b são proteínas de inclusão nuclear a e b, onde N1a é uma protease e N1b, provavelmente, uma RNA polimerase dependente de RNA e CP é a proteína da capa. Por analogia com outros sistemas virais, sugere-se que VPg sirva como *primer* para a síntese do vRNA (Shukla et al., 1994) e estabilização do mRNA contra o ataque de exonucleases.

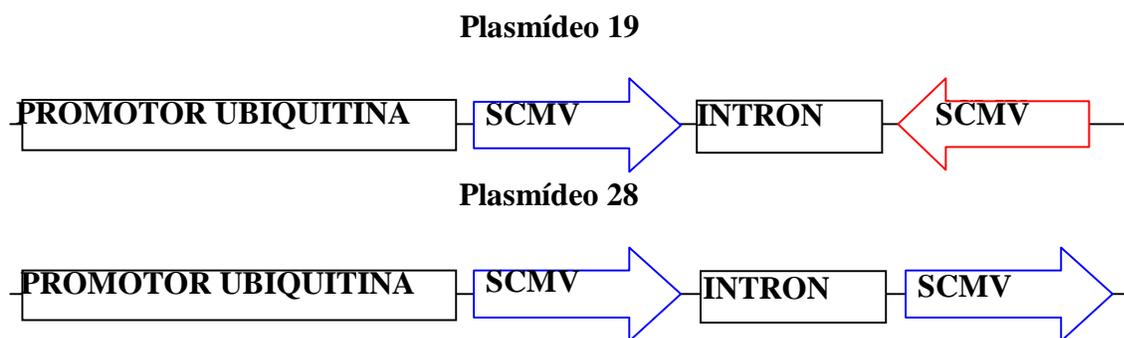


Figura 2 – Construção gênicas do RNAi do vírus SCMV. Sequências invertidas do SCMV do plasmídeo 19 (A) e sequências na mesma direção do plasmídeo 28 (B). O plasmídeo 28 tem sido usado como controle negativo já que teoricamente, de acordo com essa construção, não é possível formar a complementaridade de bases (e consequentemente a dupla fita de RNA).

Material e Métodos

Material vegetal

Foi realizado o plantio de sementes de milho provenientes de eventos transgênicos escolhidos a partir de análise de *Southern Blotting*, que foi realizado em bandeja, na casa de vegetação do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo.

Utilizaram-se oito repetições biológicas para cada evento. As amostras advêm da autofecundação de plantas T0 transformadas por biobalística e cultivadas em laboratório até o plantio, portanto, são eventos T1.

O híbrido HiII, utilizado como genótipo receptor na transformação, foi o controle negativo (susceptível ao vírus).

Inóculo

O primeiro inóculo do vírus do mosaico se deu com 30 dias após o plantio utilizando-se Carborundo malha 600. O segundo foi realizado cinco dias após o primeiro inóculo e o terceiro, cinco dias após o segundo.

Folhas com sintomas do mosaico foram coletadas no campo, maceradas em nitrogênio líquido. Ao macerado acrescentou-se tampão fosfato de potássio gelado (pH 7,0; 10mM) – a

cada grama de folha adicionaram-se cinco vezes mais tampão. Após o descongelamento da mistura acrescentou-se areia lavada para otimizar a maceração. A mistura foi passada em uma peneira fina para retirar a massa vegetal e a areia. Adicionou-se 0,25g do abrasivo a cada 40 ml do inóculo.

O inóculo foi passado em uma folha de cada planta esfregando-se o local, que foram lavadas com água imediatamente.

Coleta do tecido vegetal

A primeira coleta se deu quando as plantas alcançaram sete dias de desenvolvimento. Foram coletados pedaços da folha de cada planta (aproximadamente três centímetros) com tesoura e estes colocados em tubos específicos distribuídos em uma placa que permaneceu em caixa de isopor contendo gelo até o fim da coleta.

As amostras foram colocadas para liofilizar durante 48 horas. Este material foi utilizado para extração de DNA em larga escala de acordo com o procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para Extração de DNA de Tecido Vegetal em Larga Escala. Posteriormente, foi realizada uma reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com *primers* específicos do SCMV.

A segunda coleta se deu da seguinte maneira: as folhas, 30 dias após o plantio, foram cortadas com tesoura, embaladas em papel alumínio devidamente identificado e colocadas imediatamente no nitrogênio líquido. Foi escolhida a folha mais jovem de cada planta e forma cortados 15 centímetros de folha (variando de acordo com o tamanho da planta). Posteriormente, foram armazenadas em *freezer* -80 °C. Após isso, foi realizada a extração de DNA *Fast Prep* (baseado no método de Sanghai - Maroof). Este DNA foi utilizado na técnica de *Southern Blotting*.

Amostras de tecido também foram coletadas para extração de RNA. Para tanto, as amostras foram coletadas 30 dias após o plantio das sementes antes do primeiro inóculo do vírus do mosaico e, por isso, denominadas AT (antes do tempo); 15 dias após o primeiro inóculo (T15) e 30 dias após o primeiro inóculo do vírus (T30).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi realizada uma reação de PCR com *primers* específicos para a parte do vírus contida na construção, a partir do resultado desta PCR foram desbastadas todas as plantas negativas, pois este é o indício de que estas não foram transformadas. A reação se deu utilizando-se o kit da Sigma-Aldrich *Taq* DNA Polymerase e cloreto de magnésio da Invitrogen de maneira a complementar o volume necessário na reação. Serão necessários para cada reação: 1µl de DNA; 0,4µl de cloreto de magnésio (Invitrogen); 0,5 nucleotídeos (dntp – desenvolvida no laboratório); 2,0µl de tampão 10X; 0,5µl de *primer* SCMV3; 0,5µl de *primer* SCMV5; 0,1µl de *Taq* Polimerase e 15,0µl de água ultrapura autoclavada. O ciclo no termociclador foi o seguinte: 94 °C por dois minutos; 35 ciclos de 94 °C, 60 °C e 72 °C por 30 segundos cada temperatura; 72 °C por quatro minutos e mantidos a 4 °C. Eletroforese em gel de agarose 1,2% (g/v) se deu à 100 V.

Southern Blotting

O DNA genômico das amostras foi digerido com a enzima de restrição Eco RI utilizando-se 40,0µl de DNA; 5,0µl de enzima e 5,0µl do tampão da enzima. O controle positivo utilizado foi o plasmídeo 19 3301 SCMV (1:500 v/v), sendo: 20,0µl de plasmídeo; 12,0µl de água

ultrapura autoclavada; 4,0µl de enzima e 4,0µl do tampão da enzima. Como controle negativo, utilizou-se DNA de HiII e as condições para a digestão foram as mesmas utilizadas para as outras amostras.

As mostras foram mantidas a 37 °C por aproximadamente cinco horas. Após isso, foi realizada a eletroferese em gel de agarose 1% (m/v) e o gel carregado com todo o volume da digestão, 5µl de corante Azul de Bromofenol e Xileno Cianol 1:1 (v/v) e Gel Red 1:1000 (v/v) durante toda a noite a 27 V. As lavagens do gel para que houvesse a transferência do DNA para uma membrana de nitrocelulose se deram com as soluções para depuração (ácido clorídrico 1,1% v/v) durante 10 minutos; denaturação (87,66 g de cloreto de sódio e 20,0 g de hidróxido de sódio para um litro de solução aquosa) por 40 minutos, sendo, 10 minutos (para neutralização do ácido clorídrico) mais 30 minutos com solução nova; neutralização (87,66 g de cloreto de sódio e 60,5g de Trizma base para um litro de solução aquosa em pH 7,5) por 30 minutos.

A solução de SSC 20X é composta de 88,23 g de Tri-Citrato de sódio e 175,32 g de cloreto de sódio para um litro de solução a pH 7,0. Após 12 horas, a membrana foi lavada em solução de SSC 6X por 10 minutos e seca em estufa a 65 °C por 10 minutos.

A membrana foi hibridizada a 65 °C em tampão contendo 1,17 g de cloreto de sódio; 1,6g de Reagente de Bloqueio e 40 ml de tampão de hibridização na temperatura de 65 °C, onde foi acrescentada a sonda preparada segundo recomendações do fabricante.

A membrana foi então colocada em solução de tampão secundário em um recipiente em temperatura ambiente por 10 minutos. O estoque do tampão foi preparado com 121 g de Tris Base (1 M) e 112 g de cloreto de sódio (2 M) para um litro de água destilada. No *Southern Blotting* utilizou-se a diluição à 5% v/v, acrescida de 1 ml de cloreto de magnésio.

A membrana foi colocada em um filtro transparente de PVC e, sobre ela, 2 ml de Reagente de Detecção foram espalhados. A membrana foi totalmente coberta pelo filtro de PVC. Em câmara escura colocou-se a membrana sob um filme (DNA voltado para o filme) dentro de um cassete e aí permaneceu *overnight*. A revelação do filme se deu em ambiente escuro. Ele foi colocado em solução de revelação e fixação, respectivamente, em agitação manual por 20 segundos para cada solução e lavado em água corrente.

Resultados e Discussão

Obtenção das plantas transgênicas

Através de bombardeamento de partículas, conforme descrito por Carneiro et al. (2004), foram geradas 250 plantas supostamente transgênicas, oriundas de 25 experimentos de transformação, que após a seleção foram transferidas para casa de vegetação, onde apenas 82 plantas produziram sementes. Destas 82 plantas, 47 foram testadas em relação ao inóculo SCMV e ao herbicida PPT buscando verificar a presença do gene *bar* confirmando a transgenia delas. Foram plantadas quatro sementes de cada uma das 47 plantas, estas plântulas foram inoculadas utilizando extrato de folhas de plantas de milho com mosaico em tampão fosfato 0,01 M e Carborudum Bioglobal mesh 600. As inoculações foram realizadas durante 4 semanas consecutivas. De um total de 142 plantas testadas, 26 apresentaram-se assintomáticas, sendo observada também a diminuição dos sintomas em algumas das plantas testadas no decorrer das semanas após a primeira infecção. Foi realizado um teste de PCR utilizando *primers* da região da

capa proteica (Figura 3) para verificar a existência da construção nas plantas supostamente transgênicas

Os resultados obtidos demonstram que a técnica do RNAi é funcional e pode-se afirmar que plantas de milho transgênicas contendo o cassete correto em relação à formação do looping (plasmídeo 19) apresentam resistência à contaminação do Mosaico e ao herbicida Finale (PPT); pode-se afirmar também que plantas transgênicas contendo o cassete controle (plasmídeo 28) apesar de serem resistentes ao herbicida Finale apresentam sintomas do Mosaico.

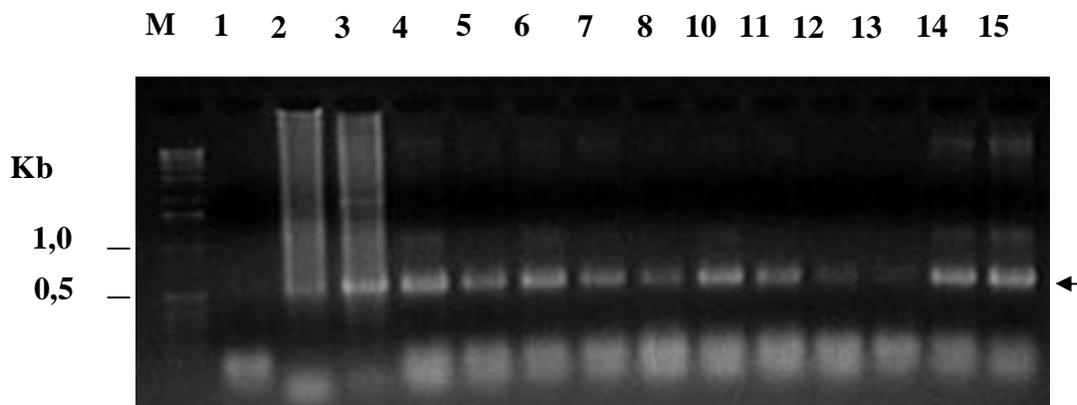


Figura 3 – PCR das plantas supostamente transgênicas utilizando *primers* do fragmento SCMV (seta a direita da figura). Marcador molecular 1 kb (M); Controle negativo - Planta não transgênicas (1); Plasmídeos 19 (2) e 28 (3). Plantas de milho provenientes da cultura de tecido e seleção em PPT (herbicida) supostamente transgênicas (4 a 15).

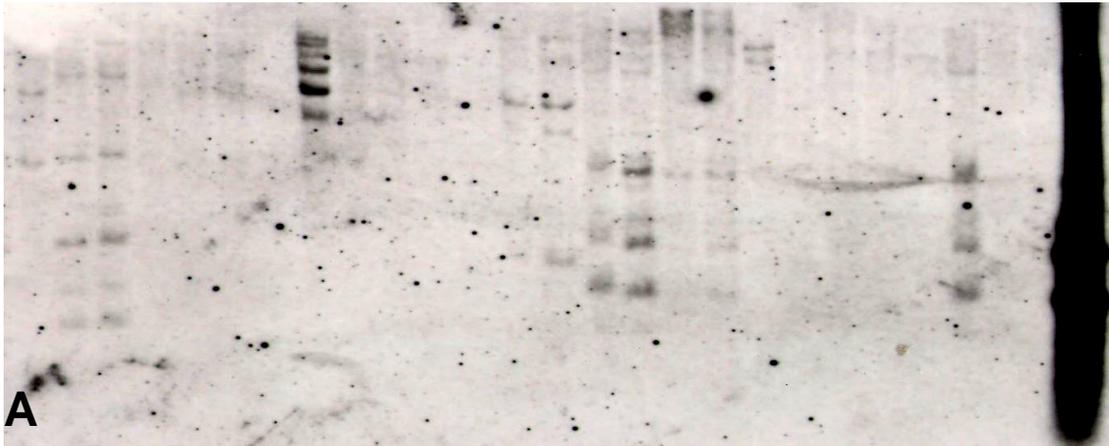


Figura 4 – Plantas transgênicas sem sintomas (B); Seta preta na figura 4B mostra sintomas. Como controles foram utilizadas oito plantas Hi-II não transgênicas.

De acordo com análise de *Southern Blot*, foi concluído que as amostras 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22 e 23 foram negativas para as duas sondas e para as plantas positivas foram criados sete grupo das 23 amostras analisadas (Tabela 1 e Figura 5).

| Grupo | Amostras no <i>Southern</i> |
|--------------|------------------------------------|
| 1 | 1 |
| 2 | 2 e 3 |
| 3 | 8 |
| 4 | 13, 14 |
| 5 | 15, 16 e 24 |
| 6 | 17 e 18 |
| 7 | 19 |

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27

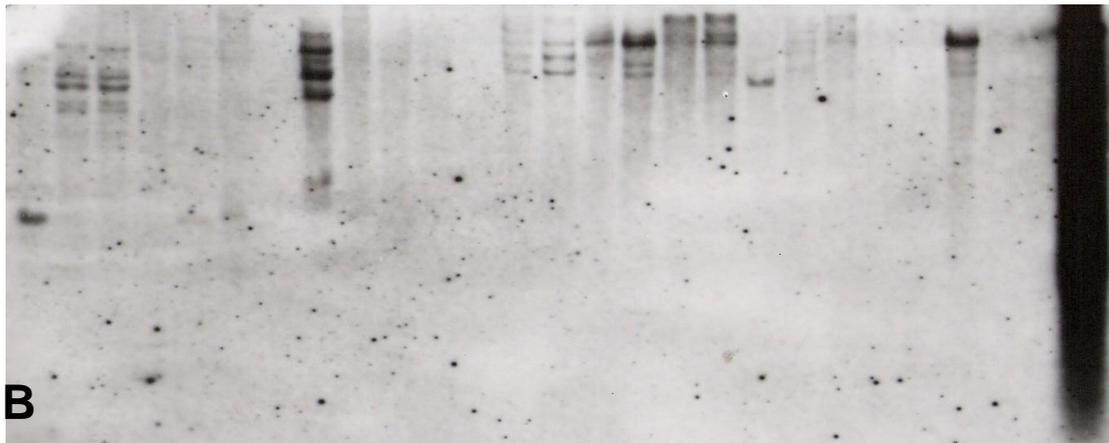


Figura 5 – *Southern blots* com plantas transgênicas mostrando número de cópias da construção gênica. (A) sonda do gene bar; (B) sonda do gene SCMV. As amostras 25 e 26 são plantas não transgênicas como controle.

A partir das plantas que se desenvolveram, foi realizada uma reação de PCR com *primers* específicos para a construção do SCMV. As amostras que não amplificaram foram desbastadas na casa de vegetação. A continuidade do experimento se deu apenas com as amostras positivas, nas quais houve amplificação. O inóculo do vírus do Mosaico foi realizado a cada cinco dias, totalizando três inóculos.

A técnica de *Southern Blotting* foi utilizada para verificar o número de cópias do transgene nas amostras. Ela foi realizada com sonda específica para a construção SCMV (Figura 3) e para o gene de seleção BAR.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, podemos verificar que a transformação via RNA interferente em plantas milho foi efetiva, todavia, outras técnicas mais precisas de análise precisam ser feitas para a confirmação da transgenia.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq, FAPEMIG e Embrapa pelo apoio.

Referências

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 44 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 32).

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. de; PINTO, N. F. J. de A. Doenças do milho. In: SEJA o doutor do seu milho. 2. ed. aum. Piracicaba: POTAFOS, 1995. p. 21-24. (Arquivo do Agrônomo, 2). Encarte.

FUCHS, E.; GRÜNTZIG, M.; KUNTZE, L.; OERTEL, U.; HOHMANN, F. Zur epidemiologie der potyviren des maises in Deutschland. **AG Saatzuchleiter der “Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter”**, Gumpenstein, n. 46, p. 43-49, 1996.

GONÇALVES, M. C.; MAIA, I. G.; GALLETI, S. R.; FANTIN, G. M. Infecção mista pelo *Sugarcane mosaic virus* e *Maize rayado fino virus* provoca danos na cultura do milho no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 33, n. 4, p. 22-26, out./dez. 2007.

HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, p. 793-800, 2004.

LOPES, M. J. C. **Estresse oxidativo e análise anatômica em plantas de diferentes ciclos de seleção do milho 'Saracura BRS-4154' sob encharcamento contínuo**. 2005. 65 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 517-531, 2005.

O'CONNOR-SÁNCHEZ, A.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDEZ-MELARA, M.; TÉLLEZ-RODRÍGUEZ, P.; PONS-HERNÁNDEZ, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, n. 4, p. 302-312, Nov. 2002.

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O.; GIMÉNEZ PECCI, M. L. P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Ocorrência e perdas causadas por mollicutes e vírus na cultura do milho safrinha no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 19-25, jan. 2003.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The potyviridae**. Cambridge: CAB International, 1994. 516 p.