

## Resistência ao *Sugarcane mosaic vírus* (SCMV) por RNAi em Plantas Transgênicas de Milho

Andréa A. Carneiro<sup>4</sup>; Gracielle T.C.P. Coelho<sup>1</sup>; Fátima V. Vasconcelos<sup>2</sup>; Isabel Regina P de Souza<sup>4</sup>, Elizabeth de Oliveira<sup>4</sup>, Caroline Pereira Petrillo<sup>5</sup>, Luciano V. Paiva<sup>3</sup>; Francisco José Lima Aragão<sup>4</sup>; Newton P. Carneiro<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Doutoranda, EMBRAPA/Universidade Federal de Lavras e bolsista CAPES, CP 151 CEP: 35701-970, Sete Lagoas, MG. [gracielle.costa@gmail.com](mailto:gracielle.costa@gmail.com) <sup>2</sup> Acadêmica FEAD e bolsista CNPq. [fatimavilacavasconcelos@hotmail.com](mailto:fatimavilacavasconcelos@hotmail.com) <sup>3</sup> Professor/pesquisador, UFLA [luciano@ufla.br](mailto:luciano@ufla.br) <sup>4</sup> Pesquisadores, EMBRAPA [newtonc@cnpms.embrapa.br](mailto:newtonc@cnpms.embrapa.br) <sup>5</sup> Bolsista Fapemig.

Palavras-chave: *Zea mays* L., Mosaico, RNAi, transformação genética.

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 sua qualidade (Huang & Wei, 2004). Dentre os grandes prejuízos enfrentados pela agricultura encontram-se os ataques de pragas e doenças e no milho. Doenças que antes não eram problema, aumentaram sua incidência como é o caso das viroses e enfezamentos (causados por mollicutes - fitoplasmas e espiroplasmas). Dentre as estirpes do complexo viral, Fuchs e Grüntzig (1995) 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 as 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 as 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 produtivos, através da introdução de genes de resistência a vários estresses bióticos é altamente desejável. Como o objetivo de obter plantas resistentes ao Mosaico, calos friáveis de milho HiII, susceptíveis ao mosaico, foram transformados via biobalística empregando-se duas construções baseadas na tecnologia do RNAi, onde uma seqüência de 499 pb da capa protéica 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 seqüências foi utilizado pKanibal que continha o intron, responsável pela alça do looping no plasmídeo 19, e transferidas para o pCAMBIA 3301.

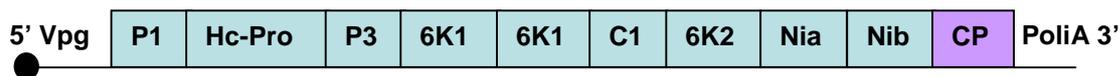


Figura 1 - Representação esquemática da organização genômica de potyvirus indicando as proteínas codificadas pelo vírus e as suas possíveis funções. P1 primeira protease, HC-Pro helper componente - protease, P3 terceira protease. A proteína C1 tem atividade RNA helicase; 6K1 e 6K2 são peptídeos; NIa e Nib são proteínas de inclusão nuclear a e b, onde NIa é uma protease e Nib, 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.

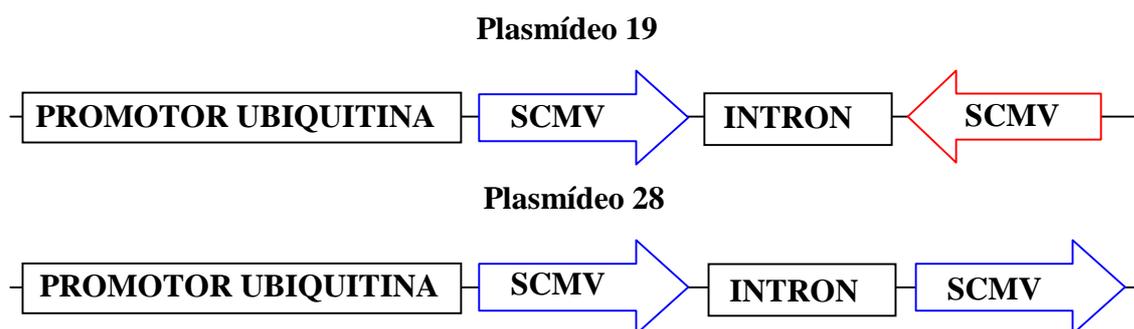


Figura 2 – Construção gênica do RNAi do vírus SCMV. Seqüências invertidas do SCMV do plasmídeo 19 (A) e seqüências na mesma direção do plasmídeo 28 (B). O plasmídeo 28 tem sido usado como controle negativo já que teoricamente, de acordo com essa construção, não é possível formar a complementaridade de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

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 inoculo SCMV (Figuras 4 e 5) ao herbicida PPT buscando verificar a presença do gene *bar* confirmando a transgenese das mesmas (Figura 6). Foram plantadas 4 sementes de cada uma das 47 plantas, estas plântulas foram inoculadas utilizando extrato de folhas de plantas de milho com mosaico em tampão fosfato 0,01M e Carborudum Bioglobal mesh 600. As inoculações foram realizadas durante 4 semanas consecutivas. De um total de 142 plantas testadas 26 se apresentaram assintomáticas, além disto foi observado 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 protéica (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 transgênica contendo o cassete correto em relação ao formação do looping (plasmídeo 19) apresentam resistência a 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.

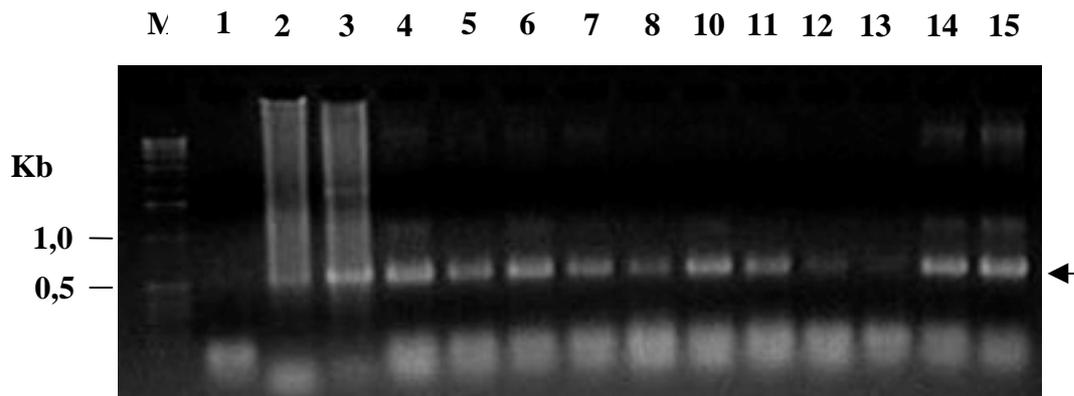


Figura 3 – PCR das plantas supostamente transgênicas utilizando primers do fragmento SCMV (seta a direita da figura). Marcador molecular 1 kb (M); Controle negativo - Planta não transgênicas (1); Plasmídeos 19 (2) e 28 (3). Plantas de milho provenientes da cultura de tecido e seleção em PPT (herbicida) supostamente transgênicas (4 a 15). Esse teste foi feito nas plantas antes do inóculo do vírus já que o mesmo também pode ser amplificado com esses primers.



Figura 4 – Descrição de experimento em casa de vegetação. Plantas transgênicas sem sintomas (B); Seta preta na figura 4B mostra sintomas. Como controle foram utilizado 8 plantas do genótipo Hi-II não transgênico.



Figura 5 – Fotos tiradas do mesmo experimento da figura 4 transcorridas 2 semanas. Plantas assintomáticas (setas) apresentaram melhor crescimento e desenvolvimento que as plantas sintomáticas indicando que o sistema do RNAi está realmente protegendo a planta contra a doença. As fotos também ajudam a demonstrar os efeitos da doença sobre a cultura, observada pela produção superior de massa foliar das plantas assintomática.

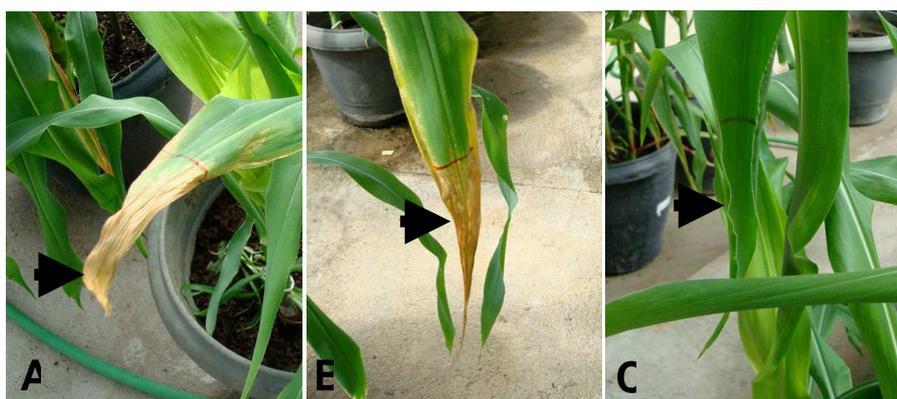


Figura 6 – Teste com o herbicida PPT na ponta de uma das folhas. Amostras sensíveis ao PPT (A, B) e amostra não sensível ao PPT (C) mostrando a possível inserção do gene de resistência do herbicida na planta.

### Referências bibliográficas

CARNEIRO AA; CARNEIRO NP; PAIVA E. Transformação genética de milho utilizando bombardeamento de partículas. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 44 p. (Embrapa Milho e Sorgo # 32) [Title: Genetic transformation of maize using biolistics], 2004.

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E.; PINTO, N.F.J.A. Doenças do Milho. Arquivo do Agrônomo. Piracicaba., 2ª ed. n.º2, p.15 – 18, set. 1995.

FUCHS E, GRÜNTZIG M, KUNTZE L, OERTEL U, HOHMANN F. 1996; Zur Epidemiologie der Potyviren des Mais in Deutschland. Bericht 46. Arbeitstag. AG Saatzuchtleiter der “Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter”, Gumpenstein, November 21-23, 43-49, 1995,.

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 phytopathol. Botucatu, v.33, n.º.4, Oct./Dec.2007.

HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. . High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). Plant Cell Reportes, 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, MG.

MONQUERO, P.A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. Bragantia vol.64 no.4 Campinas 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 Reporters, 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. E CRUZ, I. Ocorrência e perdas causadas por mollicutes e vírus na cultura do milho safrinha no Paraná. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.38, n.1, p.19-25, jan.2003.

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