

Expressão transiente de genes repórter em plantas de arroz e tabaco através de vetores virais

Jonata Alex Ribeiro Christino e Felipe dos Santos Maraschin

Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Introdução

Por muitas décadas, a manipulação da expressão gênica e da inserção de características recombinantes em plantas baseou-se em técnicas de transformação genética como a infecção por *Agrobacterium tumefaciens* ou a transferência direta de genes por biolística. Recentemente, uma nova série de métodos tem ampliado o campo da genômica funcional de plantas, entre eles estão os vetores virais. Esses vetores não se integram no DNA genômico da planta infectada e não são herdáveis, portanto a planta é submetida a uma transformação transiente. Vetores virais modificados são manipulados a fim de perderem sua patogenicidade, sem perder o seu poder de infectar as células do organismo alvo. Logo, eles são capazes de se replicar e se disseminar completamente por muitos tecidos vegetais sem causar doenças enquanto levam à superexpressão de genes recombinantes sem a necessidade de obtenção de plantas transgênicas. Nosso objetivo é validar a tecnologia TraitUP™ (Morflora Israel LTD.), baseada no Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV), para os estudos de genômica funcional do nosso laboratório, otimizando o método e as condições para os nossos modelos de plantas como tabaco, arroz, soja, *Arabidopsis*, canola, mamona e *Eucalyptus*. A confirmação da expressão das proteínas recombinantes permitirá que façamos uso dessa ferramenta para caracterizar muitos genes que estão sendo estudados no nosso laboratório.

Material e Métodos

Sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. SR1) e arroz (*Oryza sativa* spp. *japonica* cv. *Nipponbare*) foram germinadas em solo. Após um período de 30 dias, as plântulas foram submetidas à absorção do DNA viral pelas raízes com uma mistura dos plasmídeos, p1470 (IL-60-BS, Fig.1A) e p28iIR::GFP (Fig. 1B), de 1:1 (500 ng de cada plasmídeo) e água. As plântulas controles foram tratadas similarmente, porém na ausência dos plasmídeos na solução. Após o tratamento, as mudas foram replantadas no solo e deixadas para se desenvolverem. Duas semanas depois, folhas jovens foram coletadas para extração de DNA total via CTAB. O DNA total foi analisado por PCR para a presença da construção p28iIR::GFP com primers específicos. Para a visualização da expressão de GFP, folhas foram destacadas das plantas (10 dias após o tratamento) e observadas no microscópio de fluorescência invertida Olympus CKX41.

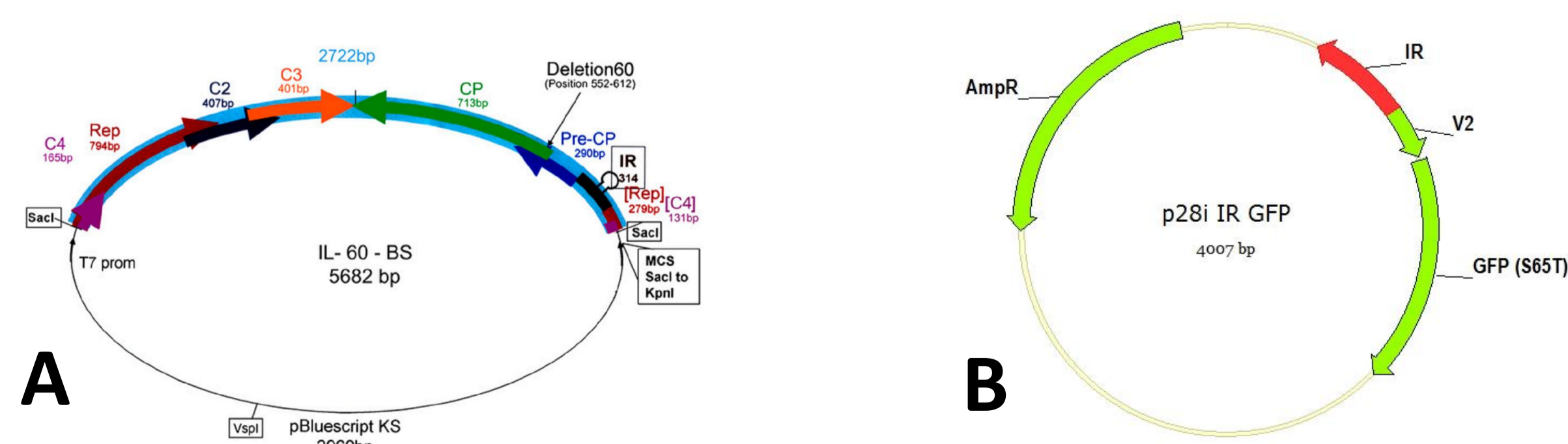


Figura 1: Plasmídeos usados nos experimentos. (A) "Helper vírus" plasmídeo p1470 (IL-60-BS), versão não patogênica do genoma de TYLCV. (B) Construção de expressão da GFP p28iIR::GFP contendo as repetições invertidas (IR) da origem de replicação do vírus, que servem como promotor de transcrição bidirecional para a sequência codificadora da GFP.

Resultados e Discussão

Dez dias após a infecção, nós pudemos detectar a presença do DNA viral no DNA total das folhas mais jovens de tabaco (Fig.2B). Essas folhas foram analisadas no microscópio de fluorescência e detectamos um bom sinal de GFP nas células da epiderme (Fig.2A) indicando que a expressão de GFP aconteceu e a infecção foi bem sucedida. Não pudemos observar GFP nas plantas tratadas de arroz, mas foi detectada a presença do DNA viral, 14 dias após a infecção, via PCR (Fig.2C). O fato do DNA viral estar presente nos tecidos distantes do lugar de inoculação do vírus indica que as moléculas de DNA estão sendo replicadas e disseminadas através da planta rapidamente. A falha na detecção de GFP nas folhas de arroz pode estar associada a baixos níveis de expressão da proteína repórter. Outras construções foram feitas para futuros testes, uma delas utiliza o gene repórter GUS (Fig.3A) e outra com uma variante de GFP excitável por luz UV (mGFP5) (Fig.3B). A alta sensibilidade do teste histoquímico com GUS pode nos permitir detectar a expressão da enzima nos tecidos de arroz. A variante da GFP é excitada por um comprimento de onda muito mais amplo, portanto, poderemos detectar a proteína repórter com mais facilidade. Testaremos ainda essa técnica em outras espécies como soja, canola, *Eucalyptus* e mamona. Esperamos que esse método seja uma ferramenta útil para a caracterização funcional de muitos genes que vêm sendo estudados no nosso laboratório.

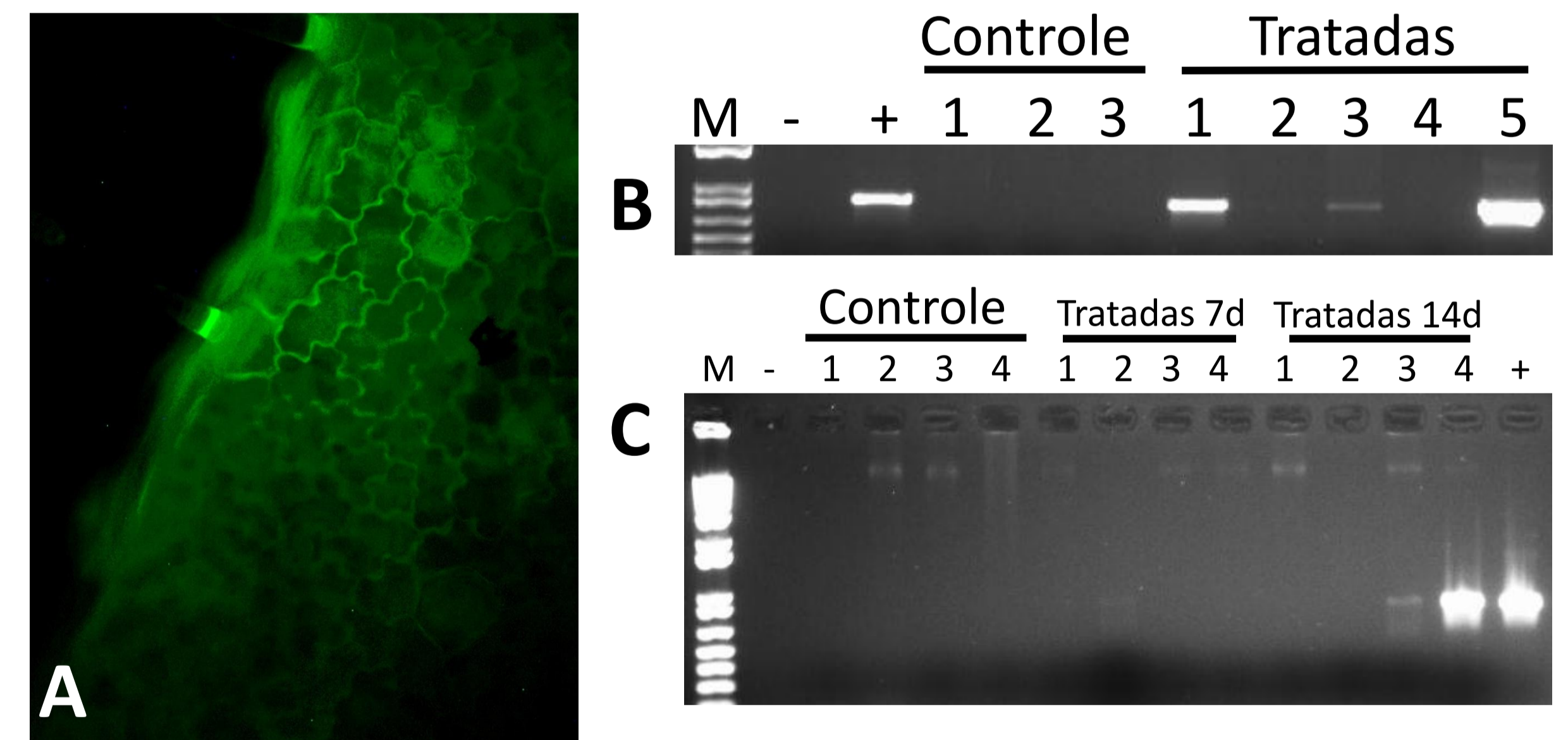


Figura 2: (A) Imagem de fluorescência, GFP, de células da epiderme da folha de tabaco 10 dias após infecção com p1470 e p28iIR::GFP. (B) Detecção do p28iIR::GFP por PCR do DNA total de tabaco. Linha (M) Marcador, (-) Controle negativo, (+) Controle positivo. Reações com DNA total das plantas não tratadas (Controle 1-3) e das plantas com 10 dias de infecção (tratadas 1-5). (C) Detecção do p28iIR::GFP por PCR do DNA total de arroz. Linha (M) Marcador, (-) Controle negativo. Reações com DNA total das quatro amostras não tratadas (Controle), plantas tratadas 7 dias (tratadas 7d) e 14 dias após a infecção (tratadas 14d). (+) Controle positivo, plasmídeo p28iIR::GFP.

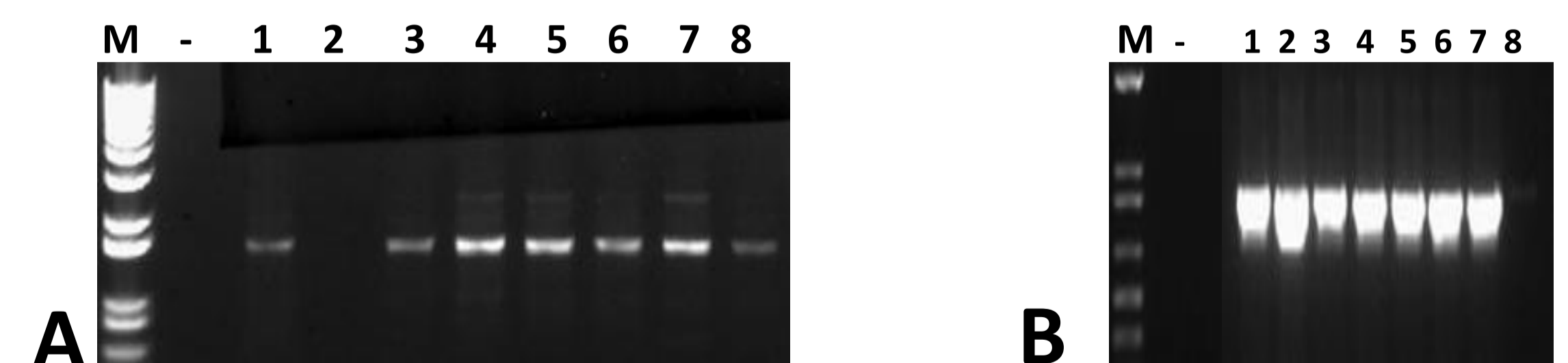


Figura 3: Confirmação das clonagens de GUS e mGFP5 em p28iIR. PCR de colônias de *E. coli* recombinantes contendo a construção p28iIR::GUS (A) e p28iIR::mGFP5 (B). (M) Marcador 1Kb, (-) Controle negativo da reação de PCR, amostras (1-8).

Apoio financeiro: