

# TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM ARROZ COM O GENE *bvl* de *Bauhinia variegata* VISANDO À OBTENÇÃO DE PLANTAS TOLERANTES A FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Tatiane Casarin<sup>1</sup>; Carla Ferreira Silveira<sup>2</sup>; Fabiana Roos Nora<sup>3</sup>; Luciana Bicca Dode<sup>4</sup>; Guilherme Cardoso<sup>5</sup>; Amanda Munari Guimarães<sup>6</sup>; Luciano da Silva Pinto<sup>7</sup>

Palavras-chave: Transgênico, lectina, *Oryza sativa* L..

## INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das mais importantes espécies cultivadas no mundo, fazendo parte da alimentação diária de metade da população mundial (SCHMIDT, 2009). O Brasil destaca-se como o nono maior produtor no mundo, o maior produtor fora do continente asiático, e responsável por cerca de 2% da produção mundial total e de 50% da produção da América Latina (CONAB, 2013).

No entanto, a cultura é atacada por diversas pragas e doenças que reduzem seu potencial produtivo. As doenças fúngicas destacam-se dentre os fatores limitantes da produção e da qualidade dos grãos, sendo que uma das principais doenças é a brusone, causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* e, como doença secundária, a doença causadora de manchas em grãos ocasionada por *Bipolaris oryzae* (BALARDIN e BORIN, 2001). Nos últimos anos a ocorrência da mancha parda ou helmintosporiose causada pelo fungo *B. oryzae* vem aumentando, tendo assumido posição de doença economicamente importante devido à maior suscetibilidade da maioria das cultivares atualmente em uso (MALAVOLTA et al., 2002).

O ensaio de atividade antifúngica realizado por Pinto et al (2008) mostrou que a lectina BVL de *Bauhinia variegata* L. possui atividade contra os fungos *P. oryzae* e *B. oryzae*. Lectinas são proteínas de origem não-imune, com capacidade de interação seletiva com resíduos de carboidratos, sem, no entanto, modifica-los, excluindo desta definição imunoglobulinas e enzimas (PEUMANS e VAN DAME, 1995). Conforme estes autores, qualquer proteína que possua ao menos um domínio não catalítico capaz de ligar-se reversivelmente a mono ou oligossacarídeos pode ser enquadrada nesta categoria.

As funções fisiológicas propostas para as lectinas vegetais incluem o papel em mecanismos de defesa da planta contra fitopatógenos e insetos fitófagos (CHRISPEELS e RAIKEL, 1991; GATEHOUSE et al., 1994; PEUMANS e VAN DAMME, 1995; SITOHY et al., 2007).

Sendo assim, a ação das lectinas sobre fitopatógenos se mostra uma promissora aplicação biotecnológica dessas proteínas a ser explorada para fins agrônômicos. A expressão heteróloga dessas proteínas como estratégia de obtenção de plantas tolerantes a pragas e doenças pode representar uma ferramenta para o aumento da produtividade de plantas de interesse econômico.

O objetivo deste trabalho é a obtenção de plantas de arroz geneticamente modificadas com o gene que codifica a proteína BVL, que ao ser expressa, possibilite a obtenção de plantas tolerantes a fungos fitopatogênicos.

---

<sup>1</sup> Aluna de pós-graduação em Biotecnologia, UFPel – casarintatiane@gmail.com

<sup>2</sup> Ma. em Biotecnologia, Embrapa Clima Temperado

<sup>3</sup> Dra. em Biotecnologia

<sup>4</sup> Professora adjunta, UFPel

<sup>5</sup> Aluna de Graduação em Biotecnologia, UFPel

<sup>6</sup> Aluno de pós-graduação em Biotecnologia, UFPel

<sup>7</sup> Professor adjunto, UFPel

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Foram utilizadas no estudo sementes do cultivar de arroz comercial PUITA INTA CL. Sementes previamente descascadas foram desinfestadas com álcool 70% durante 3 min., solução de hipoclorito de sódio 3% por 25 min., seguido de três lavagens em água destilada estéril. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) semi-sólido acrescido de 3% (p/v) de sacarose (MS 3%) e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético). O pH do meio foi ajustado em 5,8 anteriormente ao processo de autoclavagem que garantiu a esterilização através do calor úmido. O material foi incubado no escuro, à temperatura de 28 ± 1°C, durante 12 a 15 dias. Após este período, os calos formados, a partir do escutelo, foram seccionados e transferidos para meio fresco com o mesmo regulador de crescimento e mantidos nas mesmas condições de cultivo.

### Construção do vetor e transformação genética dos explantes via *Agrobacterium tumefaciens*

O gene *bvl*, com o peptídeo sinal nativo foi amplificado a partir do vetor pCR2.1::*bvl* previamente construído (Pinto *et al*, 2008). Para isso, iniciadores específicos BaulR (5'CATATGATGCTTCTCTACCAAC3') e BVLplantaF (5'ATGCTTCTCTACAACTCAAATC3') foram construídos. Após a amplificação, o produto de PCR foi ligado ao vetor de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) originando o vetor pCR8::*bvl*, conforme indicação do fabricante. Este vetor foi utilizado para a recombinação com o vetor de destino pH7WG2D, originando o vetor pH7WG2D::*bvl* que foi inserido em *Escherichia coli* Top10F por eletroporação. Após a caracterização e confirmação da construção, o vetor pH7WG2D::*bvl* foi transferido para a cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Para a transformação dos explantes de arroz, a cepa de *A. tumefaciens* foi cultivada até uma DO<sub>550</sub> entre 0,5 e 1,0 em meio LB e colocada em co-cultivo com os calos durante 20 minutos, os quais foram transferidos para meio de regeneração seletivo contendo 20 mg L<sup>-1</sup> de higromicina e 300 mg L<sup>-1</sup> de cefotaxima. O meio de regeneração utilizado consistiu de meio MS 3% semi-sólido, acrescido dos reguladores de crescimento benziladenina (2 mg L<sup>-1</sup>) e ácido naftaleno acético (0,5 mg L<sup>-1</sup>). Os explantes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25±1 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 42 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. (HIEI e KOMARI, 2008).

### Enraizamento e aclimatização das plantas transformadas em casa-de-vegetação

As brotações regeneradas e possivelmente transformadas foram alongadas em meio MS 3%. Estas brotações foram transferidas para meio de enraizamento (MS acrescido de 60 g L<sup>-1</sup> sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> mioinositol e 7,0 g L<sup>-1</sup> ágar) por um período de 15 dias. Posteriormente, as plantas com raízes foram transplantadas para vasos contendo como substrato solo e vermiculita (1:1) e cultivadas em casa de vegetação.

### Seleção de plantas transformadas

O gene foi amplificado do gDNA das plantas de *O. sativa* cv. Puita INTA CL por PCR utilizando 200 ng de gDNA molde, 10 mM de cada oligonucleotídeo e 25 µL de *GoTaq*<sup>®</sup> *Green Master Mix 2x* (Promega, contendo dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, e *Taq* DNA polimerase) em 50 µL de reação. As PCRs foram realizadas em termociclador T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD) utilizando desnaturação inicial (94°C, 5 min.), 30 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min.), anelamento (55°C, 1 min.) e extensão (72°C, 1 min. 30 seg.), e então extensão final (72°C, 5 min.). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a cv. Puitá INTA CL, em experimento realizado previamente à transformação, estabeleceu-se a dose mínima (20 mg L<sup>-1</sup>) do antibiótico de seleção (higromicina) à qual explantes (calos) não transformados sejam susceptíveis. Quatro mil e cem explantes de *O. sativa* foram submetidas ao protocolo de transformação, sendo que destes, 7 regeneraram plantas possíveis transformadas. Estas plantas irão gerar 7 diferentes linhagens que foram aclimatadas e transferidas para casa de vegetação. Amostras das folhas destas plantas foram coletadas para as análises moleculares (Figura 1).

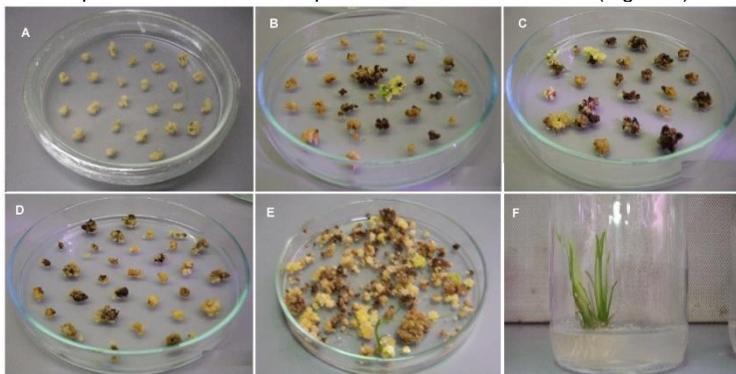


Figura 1. Arroz putativamente transgênico cultivar Puitá INTA CL obtido via infecção por *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor pH7WG2D::BVL contendo o gene *bvl*. (A): Calos de arroz em meio de seleção contendo antibióticos – 0 dias. (B): Calos de arroz putativamente transformados em meio de seleção contendo antibióticos – 15 dias. (C-E): Calos de arroz em meio de regeneração – 45, 60 e 60 dias respectivamente. (F): Plântula de arroz em meio de alongamento – 30 dias. Fonte: Autor da Pesquisa, 2015.

A partir dos resultados pode-se pressupor que houve a inserção do gene *bvl*, nas plantas analisadas (03 – 10) conforme Figura 2. Este é o primeiro relato do uso da lectina BVL, na tentativa de obtenção de arroz cv. Puita INTA CL, resistente a brusone. No entanto, a tolerância ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, foi comprovada em trabalhos realizados por YAN et al. (2005), que demonstraram a utilização de lectinas de *B. variegata* com ação antifúngica em *Colletotrichum* sp., comprovando a eficiência da sua ação inibitória em fungos. Pinto et al. (2008) também utilizou esta proteína em testes com o *Pyricularia oryzae*, obtendo resultados positivos contra seu crescimento.

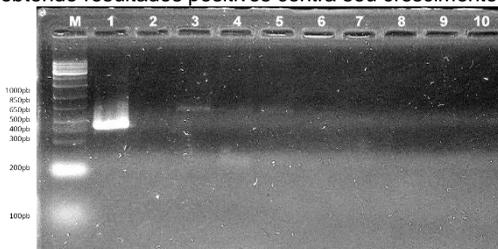


Figura 2. Validação por PCR dos clones pH7WG2D::BVL em *O. sativa* cv. Puita INTA CL. M: Marcador 1Kb plus (Invitrogen); 1: Controle positivo; 2: Controle negativo (gDNA planta não transformada); 3-10: clones positivos. Gel de agarose 1%, com amostras coradas com *Blue green I* (LGC).

Dados de outros trabalhos (KOPROWSKI e YUSIBOV, 2001; TWYMAN et al., 2003), mostram que a expressão de genes exógenos inseridos em plantas é muitas vezes baixa,

além do que, a produção da proteína alvo pode chegar a representar apenas 0,1 a 1% do total de proteínas solúveis produzidas no vegetal. Isso dificulta a verificação da presença da proteína na planta.

## CONCLUSÃO

Através do protocolo utilizado, foram obtidas plantas regeneradas resistentes ao antibiótico de seleção e positivas na amplificação do gene de *bvl* por PCR, indicando que estas sejam possivelmente transformadas. Para a confirmação da transformação, serão necessárias novas análises, como *western* e *southern blot*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALARDIN, R. S.; BORIN, R. C. **Doenças na cultura do arroz irrigado**. Santa Maria: [s.n], 48p, 2001.
- CHRISPEELS, M.J.; RAIKHEL, N.V. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. **The plant cell**, v. 3, p. 1-9, 1991.
- CONAB, **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 12/13** – Décimo Segundo Levantamento – Setembro/2013. Companhia nacional de abastecimento – Brasília: Conab. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em outubro de 2013.
- GATEHOUSE, A.M. et al. Insect-resistant transgenic plants: choosing the gene to do the "job". **Biochemical society Transactions**, v. 22, p. 944-949, 1994.
- HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. **Nature Protocols**, v.3, n.5, p.824-834.
- MALAVOLTA, V. M. A. et al. Efeito de diferentes níveis de incidência de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz sobre aspectos fisiológicos, transmissão do patógeno às plântulas e produção. **Summa Phytopathologica** v. 28, p. 336-340, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol**, v.15, p.473-479, 1962.
- SCHMIDT, A. B. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. **Desenvolvimento de painéis multiplex de marcadores microssatélites e mapeamento de QTLs de tolerância à seca e ao frio em linhagens puras recombinantes de arroz (Oryza sativa L.)**, 1 v. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2009.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, p.347-352, 1995.
- PINTO, L. P. et al. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds, **Journal of Biosciences**, v.33, n.3, p.355-363, 2008.
- SAMBROOK, J.; D. W. RUSSEL. 2001. Molecular cloning. p. 9.16-9.17. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian Pisum sativum seeds. **Food Chemistry**, v.104, n.3, p.971-979, 2007.
- KOPROWSKI, H.; YUSIBOV, V.; The green revolution: plant heterologous expression vectors. **Vaccine**. v.19, p.2741-2745, 2001.
- TWYMAN, R.M. et al. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. **Trends Biotechnology**. v.21, p.570-578, 2003.
- YAN, Q. et al. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. **Archives of Biochemistry Biophysics**. v.442, p.72-81, 2005.