

UTILIZAÇÃO DE *VIRUS INDUCING GENE SILENCING* (VIGS) EM PLANTAS DANINHAS

ALEXANDRE DE LIMA CAETANO¹; RUBENS ANTONIO POLITO²; DANIELLE RIBEIRO DE BARROS³

¹Universidade Federal de Pelotas– alexandreelcaetano@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- rubenspolito@gmail.com

³Danielle Ribeiro de Barros– danielle.barros@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Entre os principais desafios enfrentados pelos agricultores no manejo de áreas agrícolas, a eliminação de plantas daninhas certamente se destaca. Até o momento, a medida mais eficiente para o controle dessas plantas é o uso de produtos químicos (herbicidas). No entanto, essa prática apresenta desvantagens, como o alto custo para o produtor, o desenvolvimento de resistência por parte das plantas daninhas e críticas por não ser uma solução sustentável do ponto de vista ambiental.

Atualmente, a busca por métodos de controle mais eficientes, que garantam a segurança alimentar do consumidor e sejam ecologicamente responsáveis, é urgente. Para desenvolver um manejo eficiente, é fundamental entender a carga genética destas plantas, identificando os genes envolvidos na resistência a herbicidas e no crescimento dessas espécies. Com o avanço do sequenciamento genético, o genoma de várias espécies de plantas já está disponível. No entanto, atribuir funções específicas às sequências geradas continua sendo um grande desafio.

O silenciamento gênico é uma ferramenta simples e eficaz para estudar a função dos genes. Esse mecanismo age sobre sequências específicas de ácidos nucleicos, levando à redução direcionada da expressão gênica, seja em nível transcricional ou pós-transcricional. O silenciamento de RNA pode ser induzido por genes endógenos dos organismos (plantas, fungos, bactérias) para regulação gênica ou como uma resposta antiviral, resultando na degradação específica de sequências-alvo (Baulcombe, 2002).

O silenciamento gênico induzido por vírus (*virus-induced gene silencing*, VIGS) é um método eficaz para o silenciamento de genes, pois utiliza o mecanismo de defesa antiviral da planta para suprimir a expressão de transcrições virais específicas. Para implementar o VIGS como ferramenta biotecnológica, um fragmento do gene de interesse é colocado em um vetor viral que é inserido em uma bactéria. Após a inoculação na planta de uma cultura bacteriana contendo o vetor viral com o fragmento do gene, este é replicado e disseminado de forma sistêmica, como parte do vírus recombinante. Uma vez iniciado o processo de silenciamento, o mRNA correspondente ao fragmento inserido no vetor viral é degradado por meio do mecanismo de silenciamento de RNA (Baulcombe, 1999; Lu et al., 2003). O VIGS tem sido adaptado para diversas espécies de plantas, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, permitindo a análise de funções de genes em plantas cuja transformação genética ainda não é uma prática comum ou mal sucedida. Além disso, o VIGS oferece uma forma eficaz de estudar as funções de genes previamente identificados em grandes estudos genômicos ou

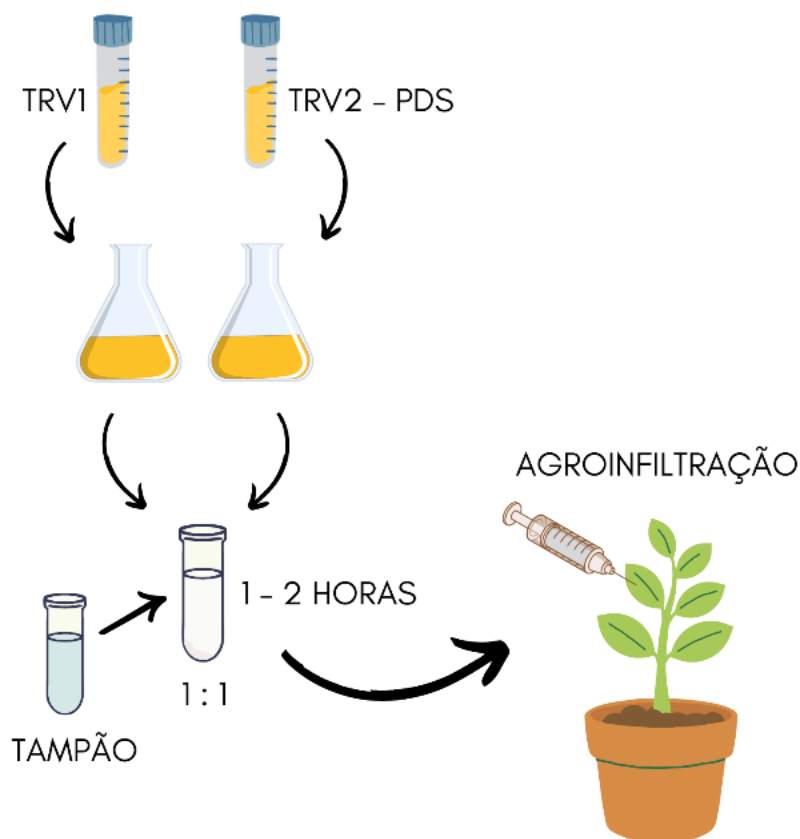
transcriptômicos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi testar a eficácia do sistema composto pelo vetor viral *Tobacco Rattle Virus* (TRV) em plantas daninhas. O seu funcionamento proporcionará a análise funcional de genes potencialmente envolvidos no crescimento e na resistência a herbicidas destas plantas.

2. METODOLOGIA

As plantas daninhas usadas neste estudo foram: Caruru (*Amaranthus sp.*), Nabiça (*Raphanus sp.*), Buva (*Conyza sp.*), Capim-Annoni (*Eragrostis plana*), Algodão (*Gossypium sp.*) e *Nicotiniana bentamiana* (controle positivo).

As construções do vetor viral do TRV usadas foram: TRV1 e TRV2-com um fragmento do gene que codifica a enzima Fitoeno Desaturase (PDS) de tabaco (TRV2_PDS_T), inseridas em *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58C1). Para a preparação das culturas bacterianas contendo os vetores virais, os clones que estavam armazenados no ultrafreezer -80°C, foram reativados e estriados em uma Placa de Petri contendo meio Luria Bertani (LB) e os antibióticos rifampicina (Rf), Canamicina(Cn) e Gentamicina(Gt) na concentração de 40mg/ml. Para a preparação do pré-inóculo, uma colônia bacteriana, presente na Placa de Petri, foi escolhida e colocada para crescer em tubos falcons de 15 ml contendo 5 ml de meio LB líquido na presença dos mesmos antibióticos a 28°C, agitação de 250 rpm por 20 horas. Após, 1 ml dos pré-inóculos de TRV1 e TRV2_PDS_T, foram transferidos para Erlenmeyers contendo 50 ml de meio LB com os mesmos antibióticos e concentrações descritos acima. Os Erlenmeyers ficaram nas mesmas condições de temperatura e agitação que o pré-inóculo. Decorridas as 24 horas, com o auxílio de um espectrofotômetro, iniciou-se a medição da densidade ótica (OD) no comprimento de onda a 600nm. Ao atingir o valor de 0,6 as culturas foram transferidas para tubos falcons estéreis e centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. Os pellets obtidos foram dissolvidos em tampão de inoculação (10mM de MgCl₂, 10mM de MES, 200μM de acetoseringona e pH: 5.5) até atingir OD=1,2 no comprimento de onda de 600nm. As suspensões bacterianas ficaram em repouso por 3 horas e a seguir foram misturadas na proporção de 1:1 e utilizadas para a infiltração e imersão de raízes das plantas (Figura 1)

Figura 1: Preparo das culturas bacterianas para agroinfiltração



Fonte: autor

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste primeiro experimento, as plantas agroinfiltradas com as construções TRV1+TRV2_PDS mostraram um leve sintoma inicial de clorose nas folhas infiltradas, mas nenhum fenótipo de branqueamento (albinismo) foi observado nas folhas recém emergidas. Nenhum sintoma também foi observado nas plantas que tiveram as raízes imersas na solução bacteriana

Em contraste, a agroinfiltração das plantas de *Nicotiana benthamiana*, resultaram em um fenótipo albino, confirmando que a construção TRV2_PDS está funcionando.

4. CONCLUSÕES

Esta foi a primeira abordagem experimental para estabelecer um estudo de gene funcional usando VIGS em plantas daninhas. Como nenhum silenciamento sistêmico do gene PDS foi observado nestas plantas, novos experimentos estavam sendo desenvolvidos alterando parâmetros como novas concentrações da cultura

bacteriana, utilização de outras cepas de bactérias, outros métodos de inoculação ou até mesmo a procura de um outro vetor viral que seja mais adequado a estas plantas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAULCOMBE, David. RNA silencing. **Current biology**, v. 12, n. 3, p. R82-R84, 2002.

BAULCOMBE, David C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. **Current opinion in plant biology**, v. 2, n. 2, p. 109-113, 1999.

LU, Rui et al. Virus-induced gene silencing in plants. **Methods**, v. 30, n. 4, p. 296-303, 2003.