

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *rgs-Cam* EM PLANTAS DE TABACO EXPRESSANDO DIFERENTES VERSÕES DE UM SUPRESSOR DE SILENCIAMENTO GÊNICO VIRAL.

Sérgio Akira Adachi, Ivan de Godoy Maia. – Genética – Ciências Biológicas – Departamento de Genética – Instituto de Biociências – Campus de Botucatu.

O Silenciamento Gênico Pós-transcricional (PTGS) é um mecanismo de defesa presente em plantas que tem como função principal silenciar RNAs aberrantes produzidos em infecções virais, introdução de transgenes ou mobilização de transposons. É interpretado como um mecanismo de verificação do transcriptoma de um organismo, estando presente em diferentes espécies (revisto Cogoni & Macino, 2000).

Os vírus que atacam plantas, embora alvos do PTGS, são capazes de suprimir essa resposta através da expressão de proteínas virais supressoras. Dentre tais proteínas destaca-se a proteína “Helper Component-Proteinase” (HC-Pro) codificada pelos potyvírus. Os potyvírus representam o mais importante grupo de vírus de planta já descrito.

Recentemente, um supressor endógeno de silenciamento gênico, denominado *rgs-Cam*, foi caracterizado como sendo capaz de suprimir o silenciamento de genes repórteres em plantas (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Com base nessa evidência, levantou-se a hipótese de que a proteína viral HC-Pro tenha por função ativar a expressão da *rgs-Cam*, sendo esta a verdadeira supressora de PTGS. Em estudo recente, Silva (2004) verificou que a expressão do gene *rgs-Cam* é induzida em plantas de tabaco transgênicas para a proteína HC-Pro do *Potato virus Y*.

O presente trabalho tem por objetivo verificar o efeito de mutações introduzidas no domínio central da proteína supressora HC-Pro sobre a expressão do gene *rgs-Cam*, e checar a replicação de um vírus indicador *Potato virus X* (PVX) para confirmar a presença ou ausência da atividade supressora nessas plantas. Para isso, plantas transgênicas de tabaco que expressam diferentes versões da proteína viral HC-Pro (Pereira, 2002), dotadas ou não de atividade supressora, e plantas indicadoras (*Datura stramonium* e *Gomphrena globosa*) foram inoculadas com PVX obtido a partir de folhas de uma planta indicadora (*Datura stramonium*) infectada, maceradas em tampão fosfato em presença de sulfito de sódio.

Amostras de RNA total foram extraídas das plantas inoculadas. A acumulação do vírus nas plantas transgênicas, bem como nas plantas indicadoras, foi constatada empregando-se oligonucleotídeos degenerados e anticorpos policlonais. Para tal, um protocolo experimental foi adaptado a fim de detectar a presença desse vírus nas referidas plantas por meio da técnica de transcrição reversa (RT)-PCR e por DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay*).

Após tentativas não sucedidas de amplificação viral nas plantas infectadas, foram realizados mais testes para a padronização da concentração de oligonucleotídeos degenerados usando RT-PCR. (Figura 1).



Figura 1: Gel de agarose 1% contendo os produtos de amplificação obtidos por PCR a partir de cDNA infeccioso de PVX (pP2C2S). Coluna 1 - MassRuler™ DNA Ladder, Mix; Coluna 2 - amplificação usando cDNA viral diluído 5 vezes e oligonucleotídeos degenerados para PVX na concentração 0.5 mM; Coluna 3 - amplificação usando cDNA viral diluído 5 vezes e oligonucleotídeos degenerados para PVX na concentração 1.0 mM; Coluna 4 - amplificação usando cDNA viral diluído 10 vezes e oligonucleotídeos degenerados para PVX na concentração 1.0 mM.

Devido às dificuldades encontradas no processo de inoculação do vírus PVX e na amplificação das plantas infectadas, a análise da atividade supressora dos mutantes da proteína HC-Pro sobre a indução do gene *rgs-Cam* encontra-se em processo de análise.

Referências Bibliográficas

Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J.M., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L. & Vance, V.B. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 290: 142-144, 2000.

Cogoni, C. & Macino, G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Current Opinions in Genetics and Development*, 10: 638-643, 2000.

Pereira, T.C. Estudo da atividade de supressão da proteína HC-Pro e análise do perfil de expressão de PTGS em cana de açúcar. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 2002.

Silva, M.S. Análise da expressão do gene *rgs-Cam* em plantas contendo diferentes versões da proteína viral HC-Pro. Monografia de Bacharelado, UNESP, 2004.

Bolsa: CNPq/PIBIC