

Avaliação da expressão do gene *Mildew Locus O* (*BoMLO*) em linhagens de urucum (*Bixa orellana* L.) com superexpressão e silenciamento do *microRNA156*

NASCIMENTO, K. C.; OTONI, W. C.; SOUZA, C. S.; SALVATO, L. A.; KOEHLER, A. D.; MACHADO, K. L. G.

ODS9
Dimensões econômicas

Introdução

O urucum (*Bixa orellana* L., Bixaceae, Malvales) é uma planta de porte arbustivo e lenhoso nativa da Amazônia, reconhecida como a principal fonte natural de bixina, um corante carotenoide amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, cosmética e têxtil. Além de seu valor econômico, a espécie tem sido empregada como planta-modelo em estudos de respostas a estresses bióticos e abióticos, devido às suas características fisiológicas específicas. Entretanto, *B. orellana* é altamente suscetível ao oídio (*Oidium bixae*, Erysiphales), um fungo biotrófico com ampla distribuição geográfica e capaz de infectar diversas espécies de interesse agrícola, especialmente sob condições ambientais quentes e secas. Estudos indicam que a suscetibilidade ao patógeno pode estar relacionada à expressão do gene *Mildew Locus O* (*MLO*), envolvido na interação planta-patógeno. A inativação desse gene tem sido associada à resistência ao oídio, embora possa comprometer o desenvolvimento e a produtividade de plantas modificadas geneticamente.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi confirmar a presença do transgene em diferentes linhagens de *Bixa orellana* (BoNT, BoSTTM e BoOE::156) por meio do testes histoquímicos e PCR genômico, bem como analisar a expressão do gene *BoMLO1* em tecidos foliares, com o intuito de investigar possíveis mecanismos moleculares relacionados à resistência da planta a patógenos.

Material e Métodos

Foram coletados primórdios foliares expandidos de uma linhagem não transgênica (BoNT) e duas linhagens transgênicas (BoSTTM e BoOE::156) de *Bixa orellana* (Otoni et al., 2024). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, conforme as normas estabelecidas pela CIBio/UFV e pela CTNBio. A presença do transgene foi inicialmente verificada por meio de ensaio histoquímico utilizando o gene repórter *GUS*, com base na coloração azul característica da atividade da β -glucuronidase e por PCR com DNA genômico, visando à amplificação dos genes *GUS* e *HPTII*. O DNA foi extraído por protocolo padrão com CTAB e quantificado por espectrofotometria. Para a análise de expressão gênica, o RNA total foi extraído a partir dos tecidos foliares utilizando cloreto de lítio como agente precipitante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific), e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para evitar contaminação com DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I livre de RNase antes da síntese de cDNA. A expressão de *BoMLO1* foi analisada por PCR semi-quantitativa. Para ambas as análises, o gene *RPL38* foi utilizado como controle endógeno (gene de referência) devido à sua expressão estável.

Agradecimentos



Apoio Financeiro

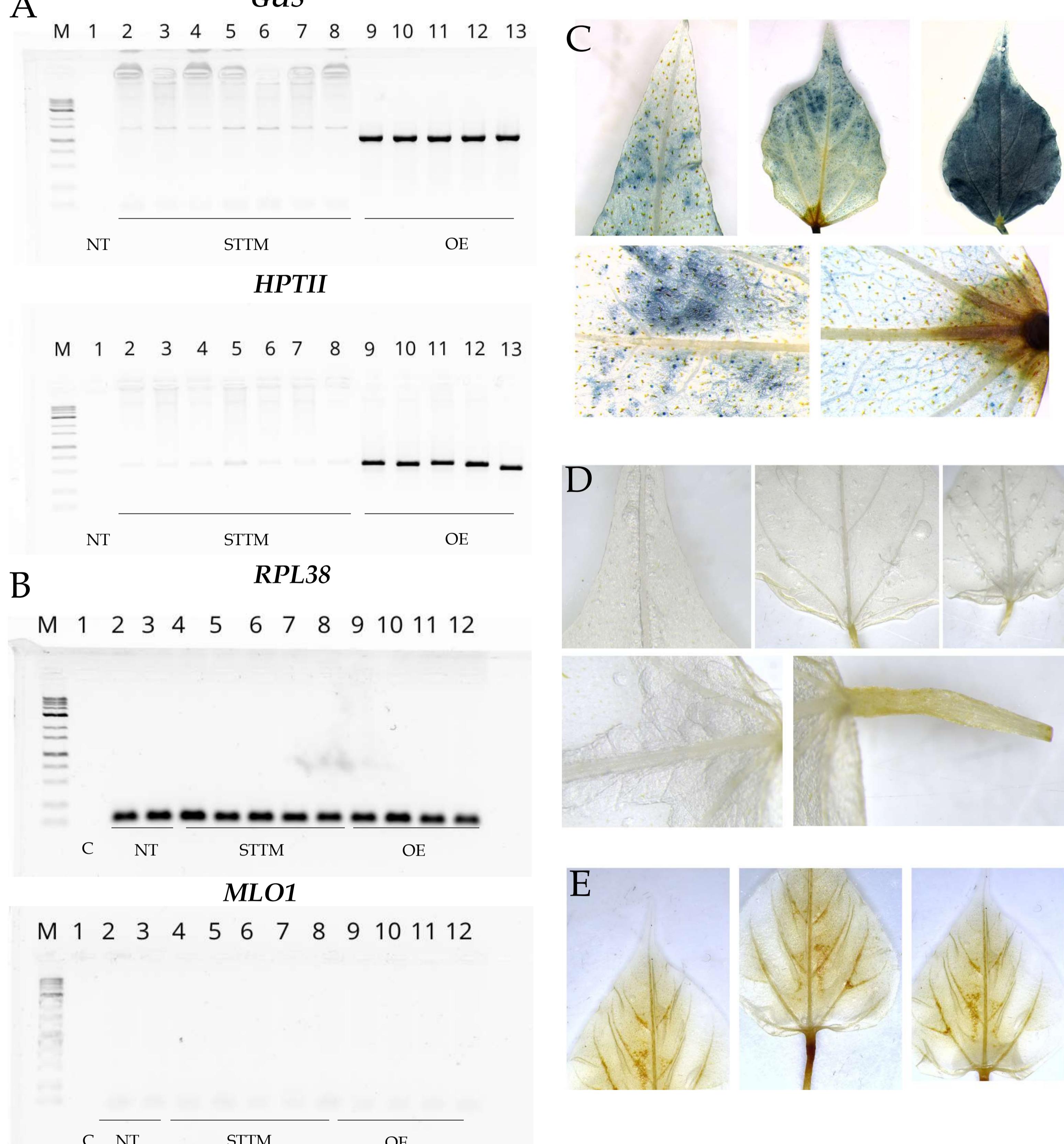


Figura 1. Análises moleculares e histoquímicas em linhagens de *Bixa orellana* com diferentes níveis de expressão de miR156. A. Detecção dos genes *GUS* e *HPTII* com marcador molecular de 1 kb (M) e linhagens BoNT (1), BoSTTM (2-8) e BoOE::156 (9-12). B. Avaliação da expressão dos genes *RPL38* (referência) e *BoMLO1* com marcador molecular de 1 kb (M), branco (C) e linhagens BoNT (1), BoSTTM (2-8) e BoOE::156 (9-12). C. Teste histoquímico para o gene *GUS* na linhagem BoOE::156. D. Teste histoquímico para o gene *GUS* na linhagem BoSTTM. E. Teste histoquímico para o gene *GUS* na linhagem BoNT.

Conclusões

Coerentemente, a linhagem não-transformada (BoNT) não apresentou a coloração *indigo-blue*, característica do teste histoquímico de *GUS* (Fig. 1E). Já BoOE::miR156 apresentou intensa coloração azul (Fig. 1C). Interessantemente, a linhagem BoSTTM não exibiu essa coloração (Fig. 1D). Todavia, a amplificação por PCR dos genes repórter (*GUS*) e de resistência à higromicina (*HPTII*), confirmou a natureza transgênica das linhagens modificadas (Fig. 1A). A coloração intensa observada em BoOE::miR156 (Fig. 1C) pode estar associada à menor concentração de polissacarídeos e componentes da parede celular, facilitando a infiltração e acessibilidade do tampão com X-Gluc e, consequente, maior atividade da β -glucuronidase. Ao contrário, a linhagem BoSTTM apresentou maior teor desses componentes, o que pode ter comprometido a coloração. A análise por PCR semi-quantitativa não detectou níveis mensuráveis de expressão do gene *BoMLO* (Fig. 1B), sugerindo baixa transcrição ou ausência de expressão nas amostras testadas, mesmo após contato com o patógeno.

Bibliografia

- AGRIOS GN (2005) *Plant pathology*. Elsevier.
BALIANE A (1982). *Cultura do urucueiro [Bixa orellana]; Variedades; Clima; Cultivo do solo; Industrialização; Brasil*.
BRAUN U, KUMMER V, XU B (2009). Taxonomy and nomenclature of powdery mildew fungi: *Erysiphe asclepiadis*, *E. robiniae*, and *Golovinomyces caulicola*. *Mycotaxon*, 107 (1): 285-295.
FARIA DV, FREITAS DMS, DUARTE MBS, et al. (2022) Agrobacterium-mediated transformation of annatto (*Bixa orellana* L.): protocol optimization and overexpression of microRNA 156 in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 148: 585-598.
OTONI, WC, MACHADO, KLG, CORREIA LNF, et al. (2024) Advances in Tissue Culture and Transformation Studies in Non-model Species: *Bixa orellana* L. (Bixaceae). *Methods Molecular Biology*, 2827:223-241.