

# TRANSFORMAÇÃO DE FEIJOEIRO COM O GENE OXALATO OXIDASE PARA RESISTÊNCIA AO MOFO BRANCO CAUSADO POR *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

JOSIAS CORRÊA DE FARIA<sup>1</sup>, GESIMÁRIA RIBEIRO COSTA COELHO<sup>2</sup>, LORRAINE KETTLEN ERINETE PEREIRA<sup>3</sup>, ELEN AMORELI GONÇALVES CINTRA<sup>4</sup>, HELEN VITÓRIA STIVAL ARAÚJO<sup>5</sup>

**INTRODUÇÃO:** O mofo branco do feijoeiro, causado pelo fungo de solo *Sclerotinia sclerotiorum* constitui-se numa importante doença do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L) no mundo, causando perdas significantivas em locais com temperaturas mais frias do verão do hemisfério norte e nos cultivos de inverno dos países tropicais, ou em condições microclimáticas favoráveis. No Brasil, a ocorrência do mofo branco é ampla, causando epidemias de proporções variáveis em feijoeiro e em muitas outras culturas. A denominada terceira época de cultivo do feijoeiro, intensificada a partir da década de 80, e que ocorre nos meses mais frios do ano, resultou em significativo aumento da importância do mofo branco especialmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Além das condições climáticas, a ausência de cultivares com alta resistência genética, ampla gama de hospedeiras do fungo, relatos de sobrevivência do fungo na forma de escleródios no solo por períodos de oito anos ou mais e a transmissibilidade pelas sementes favorecem a ocorrência e severidade da doença. Lavouras individuais podem ser completamente dizimadas pela doença. Estudo realizado no estado de Goiás por Ricardo et al. (2007), para a terceira época, onde houve o cultivo de cerca de 53.000 hectares dos quais cerca de 20% foi pesquisada, houve um gasto médio de R\$218,00 por hectare com fungicidas específicos para o controle do mofo branco. A perda atribuída ao mofo branco, dependendo do cenário, poderia ultrapassar a R\$1.000,00 por hectare. O agente causal da doença é conhecido como um fungo do tipo necrotrófico, ou seja precisa matar os tecidos antes de colonizar. Sabe-se que a produção de ácido oxálico por *S. sclerotiorum* é o principal fator de patogenicidade que predispõe as plantas à infecção (PARTRIDGE-TELENKO et al., 2011). Dentre os mecanismos propostos para a ação do ácido oxálico, acredita-se que a acidificação facilita a ação de enzimas que degradam a parede celular (poligalacturonase; endopoligalacturonase) ou sequestra os cátions de Ca<sup>+2</sup>. O pH baixo pode enfraquecer as plantas e facilitar o acesso à infecção pelo fungo. Kim et al. (2008) mostraram que o ácido oxálico secretado funciona como um elicitante da morte programada de células de plantas sendo responsável pelo desenvolvimento da doença. A morte programada de células é essencial para patogenicidade do fungo em que oxalato subverte o conjunto regulatório de morte de células do hospedeiro de modo a facilitar o sucesso da patogenicidade. Ademais, a secreção de ácido oxálico por si só não seria tóxico, mas funcionaria como molécula ativadora de sinal. A enzima oxalato descarboxilase (OxDc) catalisa a decomposição do ácido oxálico em dióxido de carbono e ácido fórmico. Esta enzima é encontrada dentro de células, e pode ser secretada pelas células de hifas de certos fungos no processo de infecção. A enzima é induzida pelo substrato e apresenta atividade ótima em pH ácido (MAGRO et al., 1988). O envolvimento da OxDc na resistência de plantas a *S. sclerotiorum* utilizando plantas transgênicas de fumo (*Nicotina tabacum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*) foi demonstrado por Kesarwani et al., 2000. A superexpressão do gene *oxdc* clonado do fungo *Collybia velutipes* foi capaz de proteger fumo e tomate contra a infecção por *S. sclerotiorum*. No Brasil, Dias et al (2006) clonaram o gene *oxdc* de *Flamulina* sp. A expressão deste gene em alface (*Lactuca sativa*) resultou na obtenção de plantas completamente resistentes a *S. sclerotiorum* quando inoculadas com micélio do fungo. A expressão de genes que degradam produtos tais como o ácido oxálico, via tecnologia do DNA recombinante para aumentar a resistência das plantas a fungos vem sendo explorada. No presente trabalho propôs-se transformar o feijoeiro com uma construção gênica

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, PhD, Pesquisador, Santo Antonio de Goiás, GO, [josias@cnpaf.embrapa.br](mailto:josias@cnpaf.embrapa.br)

<sup>2</sup> Engenheira Agrônoma, Doutora, Analista, Santo Antonio de Goiás, GO, [gesimaria@cnpaf.embrapa.br](mailto:gesimaria@cnpaf.embrapa.br)

<sup>3</sup> Ciências Biológicas, Graduanda, Estagiária, Santo Antonio de Goiás, GO, [lorraine-biologia@hotmail.com](mailto:lorraine-biologia@hotmail.com)

<sup>4</sup> Ciências Biológicas, Graduanda, Estagiária, Santo Antonio de Goiás, GO, [elenmiranda@hotmail.com](mailto:elenmiranda@hotmail.com)

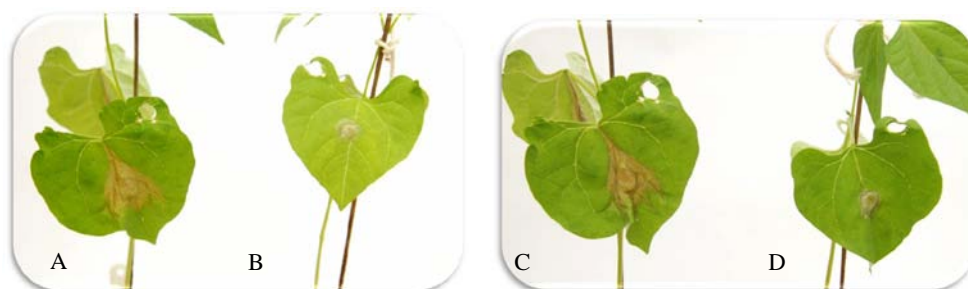
<sup>5</sup> Ciências Biológicas, Graduanda, Estagiária, Santo Antonio de Goiás, GO, [helenstival@hotmail.com](mailto:helenstival@hotmail.com)

para expressar o gene oxalato descarboxilase, objetivando a resistência ao fungo agente causal do mofo branco.

**MATERIAL E MÉTODOS:** O vetor utilizado na transformação é um plasmídeo construído com base em pBluescript II KS<sup>+</sup>, e contém o gene *ahas* com o seu próprio promotor e o gene *oxdc*, clonado de *Flammulina*, um fungo comestível, com o promotor en\_d35S e a sequência regulatória traducional de *Alfafa mosaic virus* - AMV. O gene *ahas* foi utilizado para induzir resistência a “imazapyr”, facilitando o processo *in vitro* de geração/seleção das plantas transgênicas. A transformação genética vem sendo realizada utilizando-se o bombardeador de genes pressurizado com gás Hélio. Embriões de sementes da cultivar de feijão Olathe Pinto produzida em casa de vegetação são preparados, bombardeados, e cultivados em meio MS com adição de imazapyr e benzyl amino purina (BAP) por cinco dias em ausência de luz. Findo este período, os embriões são transferidos para meio de cultura idêntico, porém sem adição de BAP. Os explantes que sobreviverem e atingirem o estágio adequado são transferidos para vermiculita e posteriormente para solo, em casa de vegetação. As plântulas obtidas são inicialmente analisadas por PCR para verificação da transgenia, e as transformadas são mantidas para a produção de sementes. As sementes são coletadas, representando a geração T1, armazenadas em sacos de papel, identificadas e guardadas em dessecador em temperatura ambiente. Essas sementes foram semeadas em vaso com capacidade de 1Kg, contendo solo e adubo, em casa de vegetação. Após um período de quinze dias os vasos foram levados para câmara de tratamento intensivo (CTI) e inoculadas com um disco de BDA (batata-dextrose e Agar) contendo micélio do fungo, retirados da borda da colônia. Os discos de aproximadamente 9mm foram colocados no centro da folha ou de folíolos, quando inoculadas folhas primárias ou trifolioladas, respectivamente. As plantas foram mantidas em condições de temperatura de 24 °C e umidade relativa de 100%, por 48 horas. Como testemunha foi usada sementes da cultivar Olathe Pinto. Foram efetuadas quatro avaliações, sendo que a primeira vinte e quatro horas após a inoculação e as subsequentes, 28, 44 e 48 horas. As avaliações consistiram da leitura do comprimento da lesão usando um paquímetro digital. Para confirmar os resultados, quando as trifolioladas se encontravam em pleno desenvolvimento também foram inoculadas.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Plantas transformadas vem sendo obtidas, conforme a análise por PCR. Resultados promissores foram encontrados quando avaliadas as plantas OxDc15-4-1 e 15-4-6 que confirmaram transformação por reação de PCR (Figura 1). Apesar de terem apresentado lesão houve um crescimento mais lento do fungo, uma redução do tamanho da lesão na última avaliação, além de visualmente ser observada uma lesão menos encharcada quando comparada com a testemunha (Figura 2). Os resultados foram confirmados nas folhas trifolioladas, com dados menos discrepantes da testemunha. As folhas inoculadas foram destacadas e as plantas levadas para casa de vegetação para produção de sementes. Seguindo a mesma metodologia, as sementes dessas duas plantas (T2) foram germinadas e as plantas foram inoculadas e avaliadas, e os resultados foram semelhantes ao das folhas trifolioladas da geração T1.

**Figura 1.** Resultado da PCR em eletroforese em gel de agarose. A banda com cerca de 0,7 Kb indica presença de planta transgênica.



**Figura 2.** Folhas primárias de plantas do feijoeiro inoculadas com discos de BDA contendo micélio do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, 48 horas após a inoculação. A e C-Olathe Pinto, B-planta 15-4-1 e D-planta 15-4-6.

**CONCLUSÕES:** Plantas transformantes vêm sendo geradas no laboratório com eficiência em torno de 0,5%. O desafio das progênes de plantas T<sub>0</sub> transgênicas vem sendo feito, com sucesso, usando o método de inoculação com discos de meio de cultura contendo micélio do fungo. Dentre as progênes analisadas, a partir doze eventos de transformação, não se obteve plantas completamente resistentes à colonização por *S. sclerotiorum*; Houve RAM, entretanto, plants com redução da área necrosada ou na abundancia de micélio fúngico sobre a folha. Novos transformantes serão analisados na tentativa de se obter plantas com maior grau de resistência. Qualquer redução da atividade do fungo resultaria em ganhos econômicos e ambientais.

## REFERÊNCIAS

DIAS, B. B.; CUNHA, W. G.; MORAIS, L. S.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L.; CAPDEVILLE, G.; ARAGÃO, F. J. L. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 187–193, Apr. 2006.

KESARWANI, M.; AZAM, M.; NATARAJAN, K.; MEHTA, A.; DATTA, A. Oxalate Decarboxylase from *Collybia velutipes* Molecular cloning and its overexpression to confer resistance

to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 10, p. 7230-7238, Mar. 2000.

KIM, K. S.; MIN, J. Y.; DICKMAN, M. B.. Oxalic Acid Is an Elicitor of Plant Programmed Cell Death during *Sclerotinia sclerotiorum* Disease Development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, n. 5, p. 605–612, May 2008.

MAGRO, P.; MARCIANO, P.; DI LENNA, P. Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 9–12, 1984.

PARTRIDGE-TELENKO, D. E., HU, J., LIVINGSTONE, D. M., SHEW, B. B., PHIPPS, P. M., AND GRABAU, E. A. 2011. Sclerotinia blight resistance in Virginiatype peanut transformed with a barley oxalate oxidase gene. *Phytopathology*, ST. Paul, v.101p. 786-793. 2011.

RICARDO, T. R.; WANDER, A. E.; LOBO JUNIOR, M. L. Custos associados ao mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em feijoeiro comum de 3ª safra em Goiás1. Resumos IX CONAFE 2008.