

Caracterização molecular de plantas transgênicas que superexpressam um peptídeo derivado de urease

Mariana C. M. Corso¹, Maria Helena Bodanese-Zanettini²

¹ Biotecnologia, UFRGS, ² Departamento de Genética, UFRGS

marianamcorso@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Devido ao alto impacto econômico que a soja representa no ramo do agronegócio, são constantes os esforços realizados a fim de minimizar possíveis estresses ambientais e, assim, aumentar o rendimento da cultura. O desenvolvimento de produtos biotecnológicos tem contribuído de forma bastante expressiva na produtividade das safras no decorrer dos últimos anos. Um dos principais limitadores da produtividade da soja são os insetos-praga. A identificação de genes que possibilitem a obtenção de plantas de soja mais resistentes a estes insetos pode contribuir para a obtenção de cultivares agronomicamente superiores. Tendo sido demonstrada a atividade inseticida de uma urease de *Canavalia ensiformis*, optou-se pela expressão de parte do gene codificador desta proteína (denominada Jbtx) como candidato para a transformação de soja. Um total de 174 plantas, oriundas de 76 eventos independentes, foi obtido a partir da transformação de embriões somáticos de soja por bombardeamento.

2. OBJETIVO

O presente projeto tem como objetivo a caracterização molecular das progênes das plantas transgênicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

- Plantas de cinco eventos que apresentaram níveis desejados de transcritos (variando de 3,5 a 18 vezes) foram selecionadas para a análise molecular;
- As extrações de DNA e RNA de folhas foram realizadas pelos métodos CTAB e Trizol, respectivamente;
- Para confirmação do estado transgene das plantas foi utilizado oligonucleotídeo senso da sequência promotora (35S) e o antisenso do transgene;
- Reações de RT-qPCR foram realizadas em quadruplicatas técnica. Valores de expressão gênica relativa foram calculados com base no método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de Livak & Schmittgen;
- A determinação do padrão de segregação do transgene foram testadas usando o *chi*-quadrado.

4. RESULTADOS

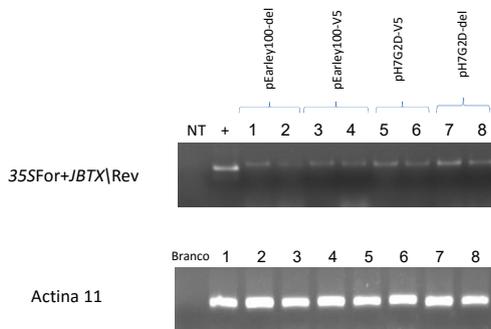


Figura 1. Resultado da PCR para confirmação do estado transgênico das plantas. 35S For + JBTX Rev: PCR com oligonucleotídeo iniciador senso da sequência promotora (35S) e o antisenso do transgene (JBTX) Actina: PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene endógeno actina 11 para confirmação da qualidade do DNA; NT: planta não transgênica da cv. IAS5 (controle negativo da reação); +: plasmídeo (controle positivo da reação); B: amostra sem DNA (controle negativo da reação); números correspondem a plantas de diferentes eventos da cv. IAS5 transformadas com as construções pEarley-V5, pEarley-del e PH7-v5

Construção	Evento	Número de plantas			Taxa esperada	valor p
		T ₁	JBTX +	JBTX -		
pH7WG2D-Jbtx	P5-13-2	21	15	6	3:1	>0.05
pH7WG2D-Jbtx	P8-3-1	35	15	20	3:1	<0.05
pEarleyGate100-Jbtx	P12-1-1	46	20	26	3:1	<0.05
pEarleyGate100-JbtxΔ-β	P1-3-1	38	28	10	3:1	>0.05
pEarleyGate100-JbtxΔ-β	P9-3-1	2	0	2	-	-

(*) Taxa de segregação foram testadas usando o *chi*-quadrado

Figura 2. Padrão de segregação da geração T₁ de plantas transgênicas de soja

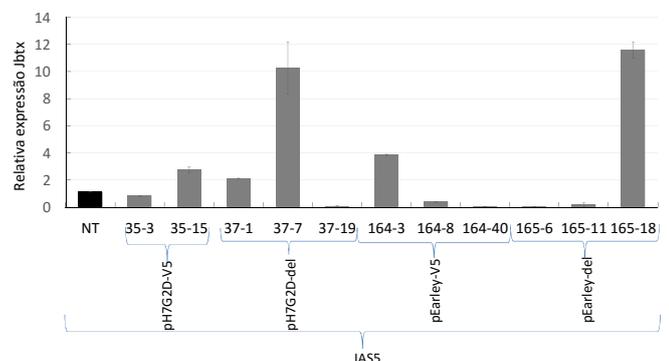


Figura.3 Nível de transcritos (RT-qPCR) de parte do gene codificador de uma urease de *C. ensiformis* (Jbtx) em folhas de plantas transgênicas T₁. Os valores obtidos para as plantas transgênica correspondem à média obtida a partir de uma planta com quatro replicatas técnicas. Os valores obtidos para as plantas não transgênicas (NT) correspondem à média obtida a partir de duas plantas com quatro replicatas técnicas cada. Os genes referência F-Box e Metalloprotease foram utilizados como controles internos para normalizar a quantidade de mRNA presentes em cada amostra. Os níveis de transcritos das plantas não transgênica (NT) foram utilizados para normalizar o acúmulo de transcritos nas plantas transgênica. Plantas transgênicas e não transgênicas pertencem a cv. IAS5.

5. CONCLUSÕES

- Utilizando o teste bioestatístico *chi*-quadrado, comparou-se o padrão de segregação observada para os transgene, em relação à proporção esperada para um alelo dominante;
- A descendência de dois eventos obedeceu à proporção esperada, confirmando a inserção dos transgenes em um único locus. Por outro lado, a proporção na descendência de outros dois eventos desviou significativamente da esperada;
- As plantas apresentaram níveis de transcritos superiores em relação a plantas não transgênicas.

6. PERSPECTIVAS

- Verificar o número de cópias do transgene presente nesta geração de plantas, por meio de qPCR, bem como quantificar a proteína recombinante por ELISA;
- Ainda, pretende-se analisar a estabilidade e confirmar o padrão de segregação do transgene nas gerações seguintes;
- Realizar bioensaios com insetos alvo e não-alvo que servirão como prova de conceito para o capacidade inseticida do peptídeo e confirmarão seu potencial para geração de um futuro produto biotecnológico.