

# Análise de plantas de soja geneticamente modificadas pela inserção de gene com potencial para conferir resistência a insetos fitófagos.

Bruno Aschidamini Prandi<sup>1</sup>, Maria Helena Bodanese Zanettini<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biotecnologia, UFRGS, <sup>2</sup> Departamento de Genética, UFRGS

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] do mundo e as previsões indicam que a produção continuará crescendo. Mesmo com este cenário positivo, diversos estresses ambientais limitam o rendimento desta oleaginosa. Insetos estão entre os principais limitadores bióticos. Já existe disponível comercialmente a soja Bt, que é resistente a lagartas, mas ainda não há plantas de soja geneticamente modificadas com resistência a percevejos. 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. A atividade inseticida de uma proteína de *Canavalia ensiformis* (peptídeo resultante denominado jaburetox ou JBTX) contra insetos fitófagos foi descrita pelo grupo de pesquisa da Dra. Célia R. Carlini, sendo o gene que codifica esta proteína eleito como candidato para a transformação de soja. Quatro vetores contendo parte da sequência codificadora do gene foram previamente construídos por meio da tecnologia Gateway: pEarleyGate100-del, pEarleyGate100-V5, pH7WGD2-del e pH7WGD2-V5. Paralelamente à construção dos vetores, culturas embriogênicas de soja das cultivares Bragg e IAS5 foram estabelecidas para garantir o tecido alvo para os experimentos de transformação. Os conjuntos de embriões somáticos foram submetidos à transformação via bombardeamento. Os tecidos transformados foram selecionados em meio contendo os agentes seletivos apropriados. Meios de cultura específicos foram utilizados para indução da histodiferenciação, maturação e regeneração dos embriões recuperados após quatro meses em sistema de seleção. As plantas regeneradas previamente obtidas pelo nosso grupo foram aclimatadas e transferidas para solo a fim de continuar o seu desenvolvimento.

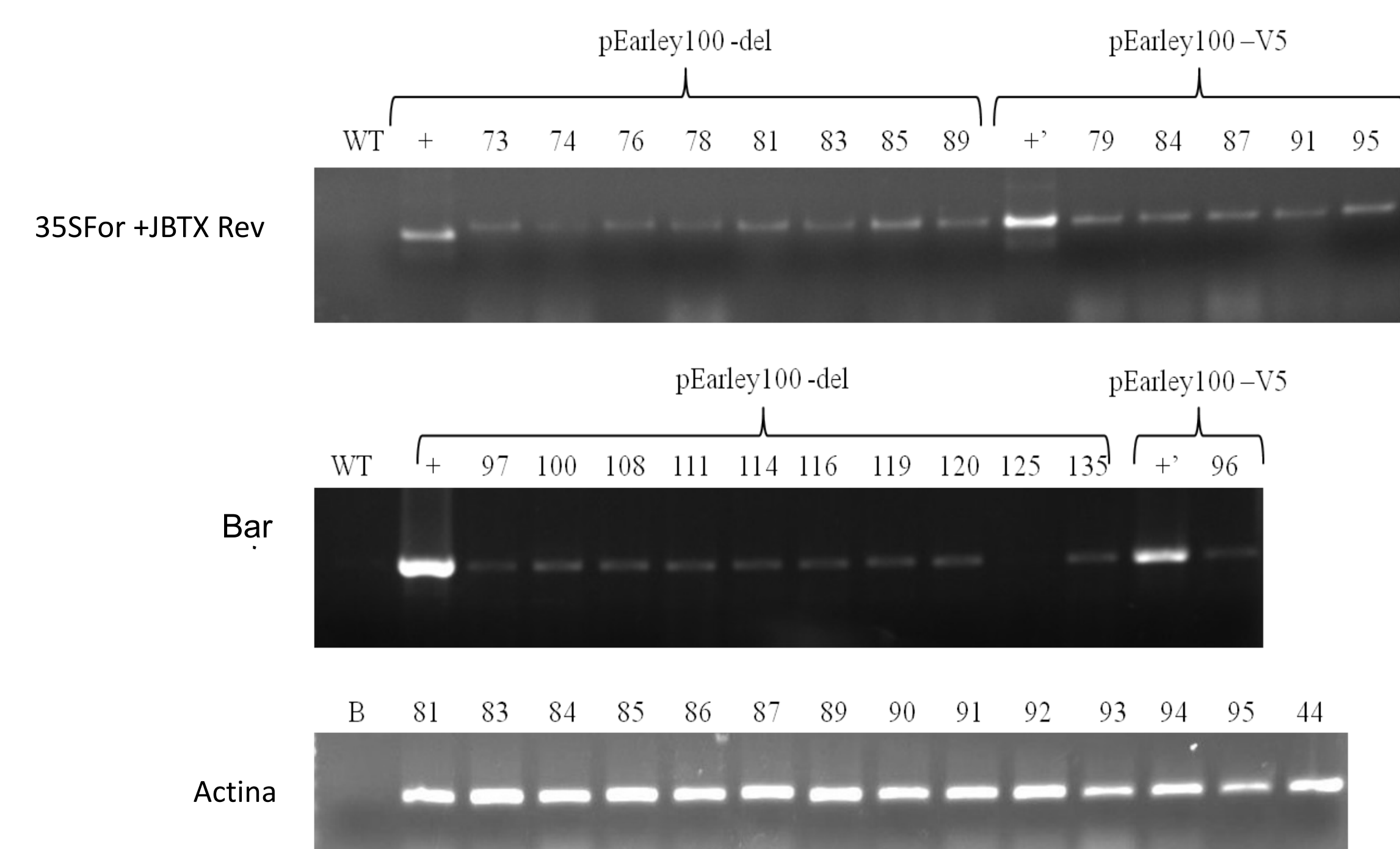
## 2. Objetivos

O presente projeto tem como objetivos principais a regeneração e análise molecular das plantas potencialmente transgênicas resultantes da transformação de embriões de soja com o gene que codifica um peptídeo derivado da urease de *C. ensiformis*.

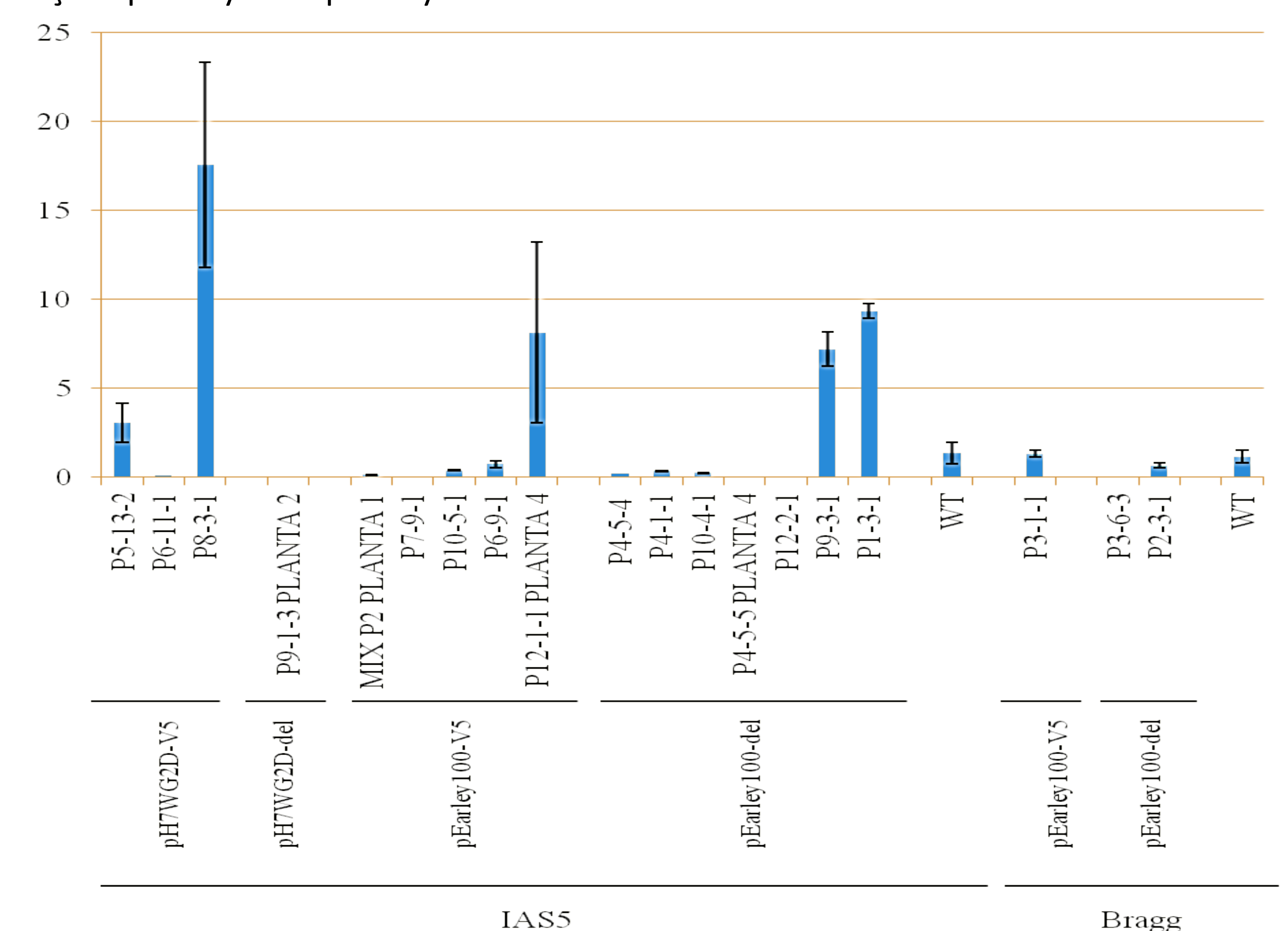
## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

- Para a análise molecular, foram coletadas três folhas expandidas de cada planta.
- As extrações de DNA e RNA foram realizadas pelos métodos CTAB e Trizol, respectivamente.
- Para amplificação do transgene, foi utilizado o oligonucleotídeo senso da sequência promotora (35S) e o antisenso do transgene.
- A síntese do cDNA foi feita a partir de 1µg de RNA utilizando-se a enzima transcriptase reversa M-MLV.
- Foi projetado, oligonucleotídeo iniciador para o experimento de RT-qPCR.
- Reações de RT-qPCR foram realizadas em quadruplicatas técnicas.
- Valores de expressão gênica relativa foram calculados com base no método 2- $\Delta\Delta$ CT de Livak & Schmittgen.

## 4. Resultados



**Figura 1.** Resultado da PCR para confirmação do estado transgênico de uma amostra de plantas. 35S For + JBTX Rev: PCR com oligonucleotídeo iniciador senso da sequência promotora (35S) e o antisenso do transgene (JABURETOX ou JBTX) para confirmação da integração do JABURETOX; Basta: PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene marcador bar que confere resistência a glufosinato (Bar) para confirmação da sua integração; Actina: PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene endógeno actina 11 para confirmação da qualidade do DNA; WT: planta não transformada da cultivar 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 cultivar IAS5 transformadas com as construções pEarley-V5 e pEarley-del.



**Fig.2 Expressão do JABURETOX em folhas de plantas transgênicas de soja.** Os níveis relativos de transcritos do JABURETOX foram determinados por RT-qPCR. Os valores obtidos para as plantas transformadas correspondem à média obtida a partir de uma planta com quatro replicatas técnicas. Os valores obtidos para as plantas não transformadas (WT) 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 transformadas (WT) foram utilizados para normalizar o acúmulo de transcritos nas plantas transformadas.

## 5. Conclusões

- Até o momento, o estado transgênico de plantas de 76 eventos, obtidos via bombardeamento, já foi verificado por PCR.

## 6. Perspectivas

- Analisar a estabilidade e padrão de segregação do transgene.
- Realizar bioensaios com insetos alvo e não-alvo que servirão como prova de conceito para a capacidade inseticida do peptídeo e confirmarão seu potencial para geração de um futuro produto biotecnológico.