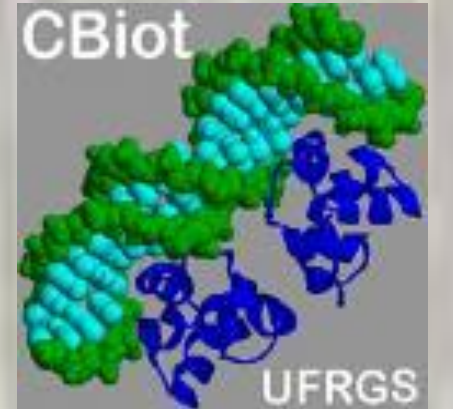


Adaptação de genes codificadores de proteínas fluorescentes a vetores plasmidiais para a transformação genética e expressão em plantas



Camila Bedin Scalco¹, Rochele P. Kirch², Giancarlo Pasquali³

1. Faculdade de Agronomia - Bolsista PIBIC/CNPq - Lab. Biologia Molecular Vegetal, Centro de Biotecnologia - UFRGS
2. PPG Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia – UFRGS
3. Dept. Biol. Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências & Centro de Biotecnologia – UFRGS



Introdução

A agricultura sustentável depende de boa ciência e de desenvolvimento tecnológico. Estes fatores são também essenciais para que se obtenha aumento de produção e da produtividade agrícola. A biotecnologia pode trazer diversas vantagens competitivas para a agricultura pela tecnologia de produção de plantas transgênicas. Embora este potencial seja reconhecido, é preciso garantir que a liberação de um organismo transgênico não traga efeitos negativos à saúde humana, à saúde animal e ao meio ambiente. Por estas razões, a biossegurança faz-se extremamente necessária.

O presente estudo está vinculado ao “Projeto CDA *Eucalyptus*: Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para a Biossegurança Relativa a Plantas Geneticamente Modificadas de *Eucalyptus*”, o qual trata de compor métodos, protocolos e roteiros para avaliar a biossegurança do eucalipto transgênico. Pesquisas na área de biologia molecular e biotecnologia estão sendo conduzidas com a finalidade de disponibilizar uma coleção de plasmídeos binários contendo diferentes versões do gene codificador da proteína de fluorescência verde (*gfp*), originalmente de *Aequorea victoria*, para a futura geração de plantas GM com fenótipos facilmente detectáveis.

A GFP apresenta diversas propriedades favoráveis no seu uso como proteína-repórter. Além de não provocar interferência nas atividades celulares, pode ser detectada por vários métodos. Contudo, apresenta limitações para o uso em vegetais em virtude do espectro de sua fluorescência. Buscando superar estas limitações, foram desenvolvidos genes codificadores de GFP em diferentes versões, exemplificados na Figura 1.

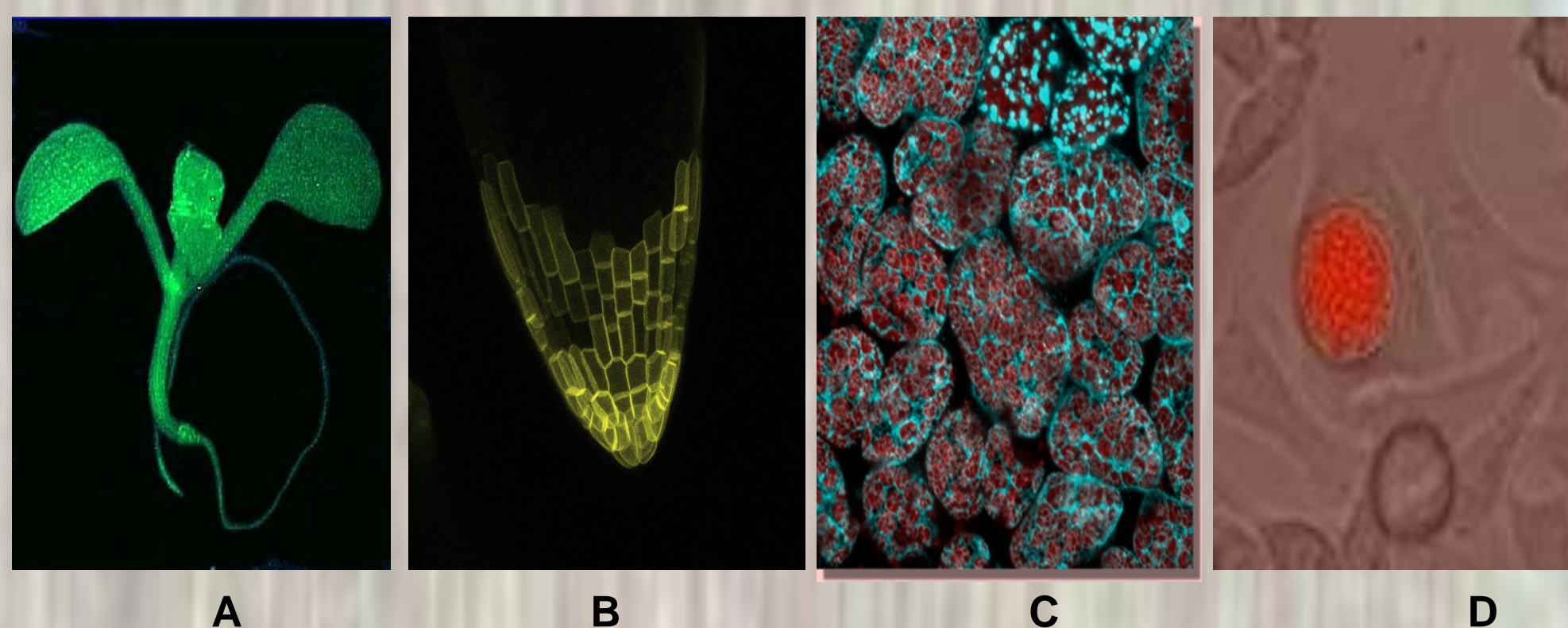


Figura 1. Atividade fluorescente de diferentes versões recombinantes da GFP. (A): Plântula transgênica de *Arabidopsis thaliana* expressando mGFP (mutated green). (B): Ponta de radícula de *A. thaliana* expressando eYFP (enhanced yellow) durante a germinação. (C): Células do mesófilo paliácido de *A. thaliana*. Talina, uma proteína de ligação à actina, foi fundida à eCFP (enhanced cyan), de modo que o citoesqueleto de actina está marcado. (D): *Coxiella burnetii* expressando mCherryFP (cherry = red).

A fluorescência das diferentes versões da GFP será utilizada neste trabalho para o monitoramento de sementes, pólen, folhas e plantas transgênicas em estudos de biossegurança em contenção e no ambiente.

Objetivos

- Introduzir os genes codificadores de mGFP, eYFP, eCFP, e mCherryFP em plasmídeos binários para a transformação genética e expressão em células vegetais;
- Transformar plantas-modelo e *Eucalyptus grandis* com plasmídeos binários contendo genes codificadores de GFP, eYFP, eCFP e mCherryFP para estudos de biossegurança.

Agradecimentos: Bolsa PIBIC/CNPq, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e CNPq pelo financiamento do Projeto CDA *Eucalyptus*.

Resultados

• Uma ampla coleção de plasmídeos contendo diferentes versões de *gfp* foi obtida a partir de doações ou aquisições comerciais. Optou-se por trabalhar com os plasmídeos da Clontech pEYFP, pECFP e pGG463 (que contém mCherryFP), e do CAMBIA pCAMBIA1302 (que contém mGFP). Este último foi o único plasmídeo binário obtido. Assim, foi necessário transferir os genes *eyfp*, *ecfp* e *mcherryfp* para este plasmídeo, em substituição a *mgfp*. Todos os plasmídeos foram produzidos e purificados em escala e suas identidades confirmadas por digestão com endonucleases (Figura 2). As atividades de adaptação dos genes a pCAMBIA1302 continuam em andamento. A fluorescência das diferentes proteínas foi confirmada pela exposição das culturas de *E. coli* JM109 transformadas com os respectivos plasmídeos, conforme evidenciam as imagens representadas nas Figuras 3 e 4.

• Com vistas a avaliar o nível de expressão básica da mGFP em plantas, discos foliares de *Nicotiana tabacum* foram transformados com *Agrobacterium tumefaciens* contendo pCAMBIA1302 (Figura 5). A regeneração de plantas transgênicas expressando mGFP está em andamento.

• A confirmação da transgenia das plantas será evidenciada pela fluorescência da proteína sob estereoscopia confocal e por análises moleculares como PCR, RT-qPCR e hibridizações de Southern blot.



Figura 2. Análises de preparações plasmidiais de pCAMBIA1302 e pGG463 (A), e de pEYFP e pECFP (B). (C) Confirmação da identidade de plasmídeos; bandas relativas aos genes *eyfp* (~760 pb), *ecfp* (~765 pb) e mCherryFP (~765 pb) observadas em tamanho correto.

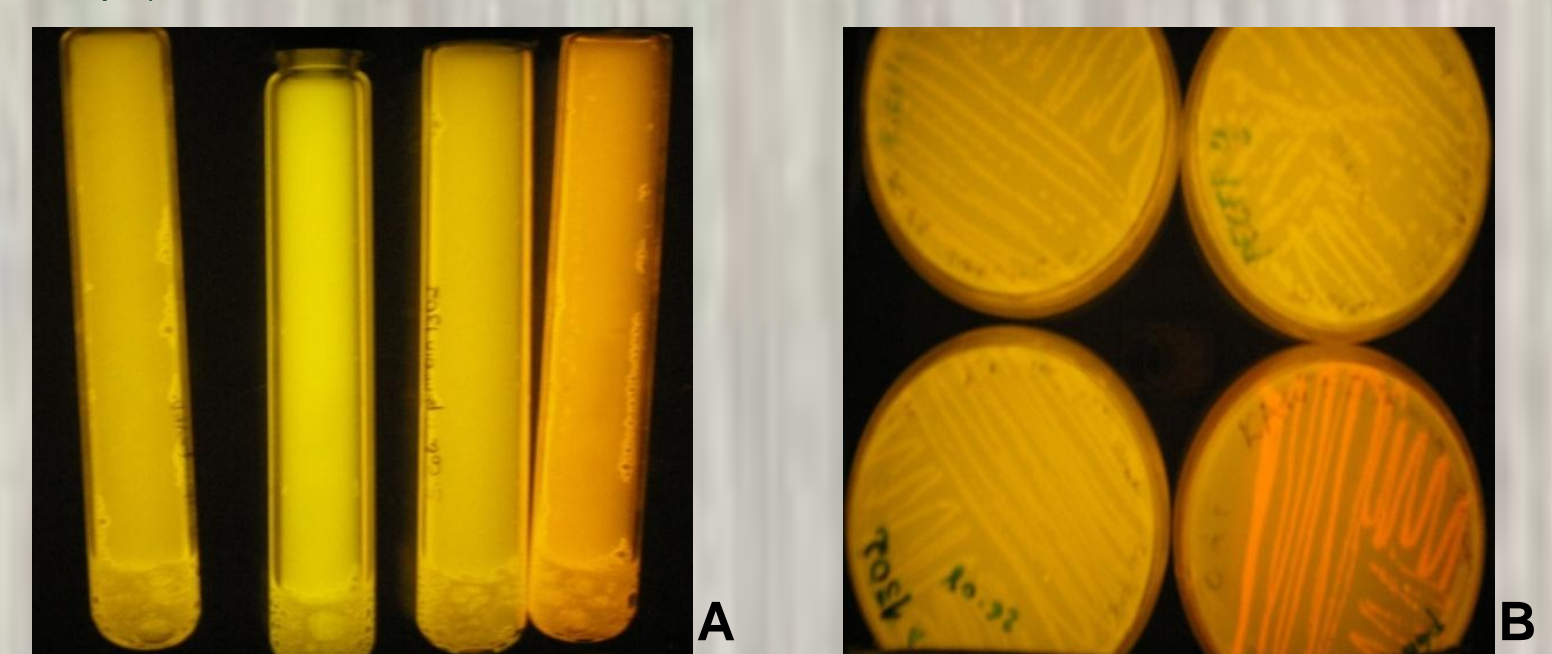


Figura 3. Tubos de ensaio (A) e placas de Petri (B) contendo culturas de *E. coli* JM109 transformadas com pEYFP, pECFP, pCAMBIA1302 (contendo mGFP) e pGG463 (contendo mCherryFP), visualizados pela exposição a transiluminador de luz azul. Uma única faixa de luz azul foi utilizada para a produção da imagem, o que não permite distinguir os tons de fluorescência típica de cada proteína. Todas as culturas evidenciaram uma fluorescência verde-amarelada, exceto a que contém mCherryFP, de cor alaranjada.



Figura 4. Imagens por microscopia de fluorescência (40X) de esfregaços de *E. coli* JM109 transformada com o plasmídeo pCAMBIA1302 (controle negativo, uma vez que o promotor do gene *mgfp* é ativo apenas em plantas) sob emissão a 507 nm e filtro verde (A); *E. coli* JM109 contendo o plasmídeo pEYFP sob emissão a 527 nm e filtro verde (B); *E. coli* JM109 contendo o plasmídeo pGG463 (mCherryFP) sob emissão de 610 nm e filtro vermelho (C).

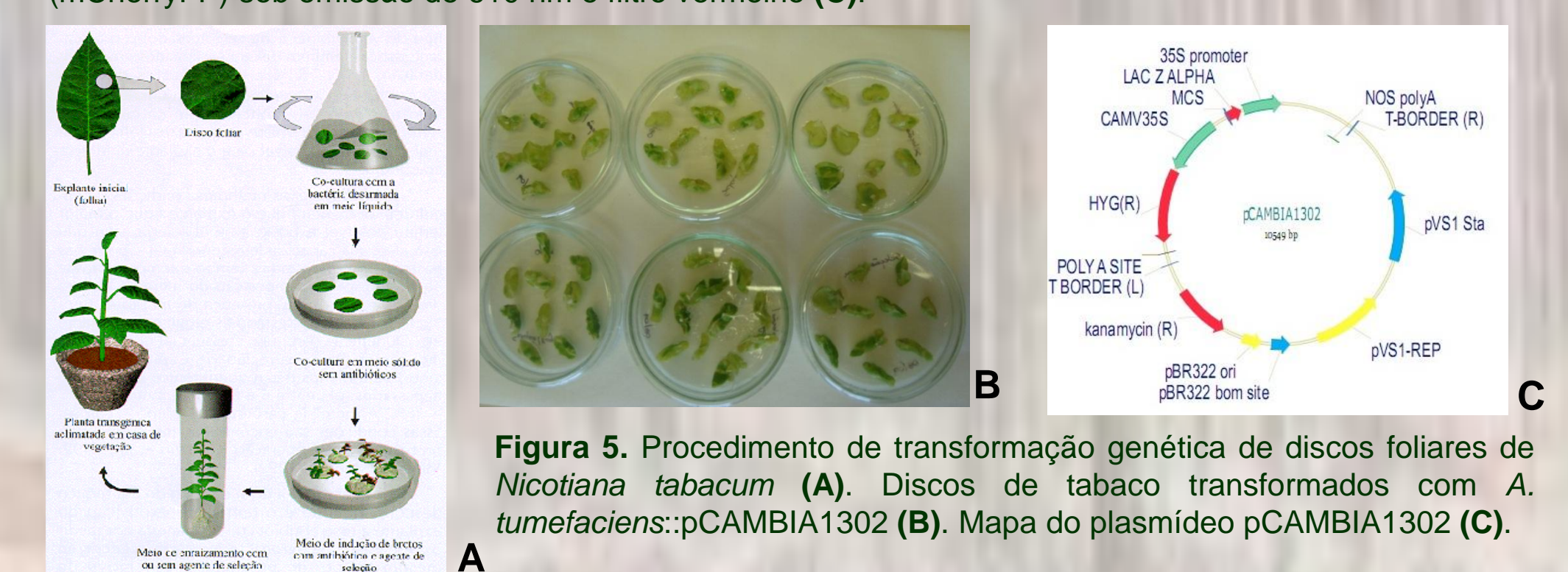


Figura 5. Procedimento de transformação genética de discos foliares de *Nicotiana tabacum* (A). Discos de tabaco transformados com *A. tumefaciens*:pCAMBIA1302 (B). Mapa do plasmídeo pCAMBIA1302 (C).