

Expressão de Genes Codificadores de Versões Truncadas da Urease de *Canavalia ensiformis* em Plantas

Patrícia RD Picolotto, Célia R.R.S. Carlini & Giancarlo Pasquali

Laboratório de Biologia Molecular Vegetal – Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia do Instituto de Biociências e Centro de Biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre-RS, Brasil

E-mail: patricia_picolotto@yahoo.com.br



UFRGS
PROPEAQ

XXV SIC
Salão Iniciação Científica

CB - Ciências Biológicas

INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira cresce a cada ano, juntamente à necessidade da produção de maiores quantidades de alimentos. Os danos causados por insetos e fungos nas plantações podem representar grandes perdas e prejuízo aos agricultores e, por isso, novas abordagens para o melhoramento das culturas são necessárias. As ureases são enzimas níquel-dependentes que catalisam a reação de hidrólise da ureia para formar amônia e dióxido de carbono. As ureases são encontradas em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais. A urease da semente de *Canavalia ensiformis* (feijão-deporco ou *jack bean*) possui três isoformas cujas propriedades inseticida e antifúngica, em maior ou menor grau, foram comprovadas. Tendo em vista que insetos e fungos são os principais agentes que causam danos às culturas agrícolas, as ureases representam um grande potencial biotecnológico para o melhoramento vegetal.

OBJETIVO

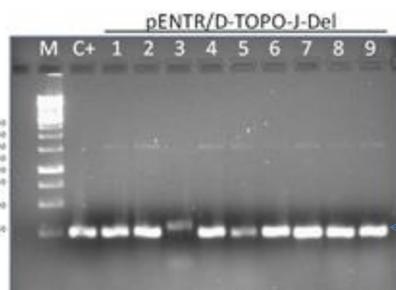
Transformar plantas-modelo de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) com genes que codificam versões truncadas da isoforma da urease Jaburetox-2Ec, denominadas J-Del e J-V5, e regenerar plantas transgênicas resistentes a determinados tipos de insetos e fungos.

METODOLOGIA

Plasmídeos contendo as sequências gênicas codificadoras dos peptídeos J-Del e J-V5 foram cedidas pela Dra. Anne Helene S. Martinelli (LAPROTOX, Centro de Biotecnologia, UFRGS) e *primers* específicos para uso do sistema Gateway (Invitrogen) foram projetados. Os plasmídeos foram transformados em células de *Escherichia coli* para clonagem, repurificador e a presença dos genes foi confirmada por sequenciamento de DNA. Utilizando os *primers* específicos, a região codificadora dos peptídeos J-Del e J-V5 foi amplificada por PCR e os fragmentos foram combinados ao plasmídeo pENTR/D-TOPO (Invitrogen), obtendo-se clones recombinantes. A presença dos insertos foi confirmada por PCR e eletroforese em gel de agarose (Resultado 1). Por meio de recombinação, de acordo com o sistema Gateway, os genes J-Del e J-V5 foram transferidos de pENTR/D-TOPO para o plasmídeo binário pEarleyGATE 100. Após confirmação da recombinação, as versões deste plasmídeo foram introduzidas em células de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 para a transformação genética de *Nicotiana tabacum* SR1. Um total de 30 discos foliares de tabaco foram transformados pelo método de infecção via *Agrobacterium*, no qual se obteve brotos regenerantes. Estes foram colocados em meio de seleção e regeneração para desenvolverem caules, folhas e raízes (Resultado 2). Para a avaliação inicial do estado transgênico das plantas, extraiu-se DNA de duas delas (Resultado 3) pelo método CTAB para confirmação, por PCR, da presença dos transgenes de interesse (Resultado 4).

RESULTADOS

1



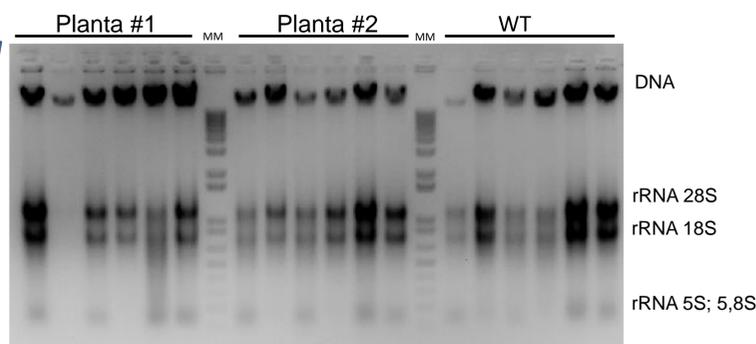
Confirmação da presença de J-Del em pENTR/D-TOPO. Gel de agarose a 1% em TAE 1X corado com EtBr submetido à eletroforese a 69 V e 130 mA durante ~1 h. Todas as amostras resultaram positivas a partir da visualização da banda de ~280 bp correspondente a J-Del. Resultado semelhante foi obtido para a versão J-V5.

2



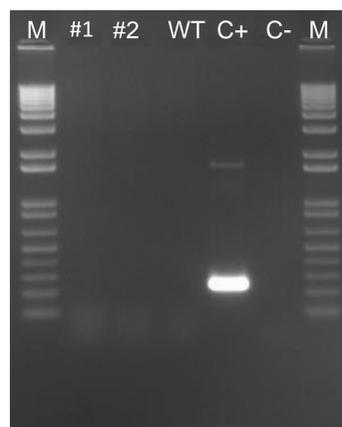
Exemplar de planta transgênica de tabaco transformada com o gene J-Del via *Agrobacterium*. Um total de 8 linhagens independentes foram obtidas para J-Del.

3



Confirmação da qualidade de DNA extraído de plantas. Gel de agarose a 1% em TAE 1X corado com EtBr submetido à eletroforese a 69 V e 130 mA durante 2 h. A presença de bandas nítidas de DNA e RNA, sem degradação, demonstra a ótima qualidade das preparações.

4



PCR preliminar para amplificação do gene J-Del a partir de DNA de plantas. Gel de agarose a 1% em TAE 1X corado com EtBr submetido à eletroforese a 69 V e 130 mA durante 2 h. A PCR com *primers* específicos a J-Del não permitiu a amplificação do gene a partir de DNA cromossômico, à semelhança do que se observa para o controle positivo (C+, pENTR/D-TOPO-J-Del). Otimização da PCR e análise de maior número de plantas transgênicas estão em andamento.

PERSPECTIVAS

- Extração de DNA de outras plantas para avaliação do estado transgênico das mesmas;
- Se positivo, quantificação do nível de proteína produzida pela planta;
- Testes para verificar a resistência das plantas contra insetos e fungos.



MODALIDADE
DE BOLSA

IC Voluntária