

Uso de Radiação Gama na Eliminação de Genes Marcadores de Soja Geneticamente Modificada

INTRODUÇÃO

O uso de um gene marcador no processo de produção de organismos geneticamente modificados confere vantagens seletivas às células transformadas. Genes marcadores podem conferir à planta resistência a antibióticos, a herbicidas ou ainda tornar possível a identificação e seleção das células modificadas geneticamente sem causar injúrias ou morte à população de células não-transformadas. No último caso, eles podem conferir às células transformadas a capacidade de metabolizar alguns compostos que não são usualmente metabolizados.

O gene *gus*, que codifica a enzima β -glucuronidase (GUS), é amplamente utilizado como gene marcador devido, principalmente, à simplicidade, à rapidez e à versatilidade dos métodos de detecção da atividade enzimática e ao fato de que a maioria das plantas não apresenta atividade endógena significativa.

Devido às preocupações com biossegurança, avaliações complexas têm sido realizadas com o objetivo de estudar o potencial impacto de genes marcadores presentes em plantas transgênicas para a saúde humana e para o meio ambiente. Apesar de não existir evidências do efeito nocivo do uso de plantas transgênicas com genes marcadores, a sua remoção já está declarada como "boa prática de laboratório" por vários comitês de biossegurança. Conseqüentemente várias estratégias para remover os genes marcadores de seleção têm sido desenvolvidas.

Visando a mutação e conseqüente eliminação por agente físico do gene *gus*, este trabalho foi realizado a fim de avaliar o uso de radiação gama na eliminação física de genes marcadores introduzidos no genoma de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e Irradiação

As sementes de soja transgênicas, variedade BR-16, linhagem 8-19, utilizadas neste experimento derivaram de uma única planta transgênica gerada em nosso laboratório (Aragão et al. 2000). Esta linhagem contém uma única cópia do plasmídeo pAG1 que contém o gene *ahas* de *Arabidopsis thaliana*, sob controle do promotor *ahas* e o gene *gus* (β -glucuronidase) sob controle do promotor da actina de *A. thaliana*. (Aragão et al. 2000). Sementes transgênicas homocigotas foram irradiadas com raios gamas de ^{60}Co nas dosagens de 225, 250, 275, 300 e 350 Gy, plantadas em casa de vegetação e a geração M2 foi analisada quanto à presença e expressão dos genes *gus* e *ahas* por PCR.

Análise por PCR

Para determinar a presença dos genes *gus* e *ahas*, foram realizadas análises por PCR. Foram utilizados os oligonucleotídeos 5' actagagattccagcgtc 3' (AHASP dentro do promotor *ahas*) e 5' gtggctatacagatcctgg 3' (AHAS500C dentro da seqüência codificante do gene *ahas*) para amplificar uma seqüência de 685 bp a 685 bp para examinar as plantas transgênicas quanto à presença do cassete *ahas*. Os oligonucleotídeos 5' ttggcaggccagcgtatcgt 3' (GUS251) e 5' atcagcagttcaacgcgtgac 3' (GUS671C) foram utilizados para amplificar uma seqüência de 420 bp dentro da seqüência codificante do gene *gus*.

28

Circular
Técnica

Brasília, DF
Dezembro, 2003

Autores

Maria Laine Penha

Tinoco

Bióloga, mestranda, UnB,
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia

Marcelo Banho

Andrade Reis

Biólogo, graduando, UCB,
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia

Sergio Abud

Técnico de Nível Superior,
Embrapa Cerrados

Plínio I.M. Souza

Eng. Agr., Ph.D., Embrapa
Cerrados

Giovanni Rodrigues

Vianna

Eng. Agr., Ph.D., Embrapa
Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Elíbio Leopoldo Rech

Eng. Agr., Ph.D., Embrapa
Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Francisco José Lima

Aragão

Eng. Agr., Ph.D., Embrapa
Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Ensaio histoquímico

Plantas foram avaliadas quanto à expressão do gene *gus* por ensaio histoquímico. Os tecidos foram analisados para a localização *in situ* da atividade de GUS segundo Jefferson et al. (1987).

Ensaio de tolerância ao herbicida

Para avaliar a resistência do gene *ahas*, todas as plantas foram pulverizadas com 100 g.ha⁻¹ do herbicida imazapyr (Arsenal®, BASF).

Southern blot

O DNA genômico foi isolado de acordo com Dellaporta et al. (1983) e o *Southern blotting* e a hibridização foram realizadas como previamente descrito (Sambrook et al. 1989). O DNA genômico (10 mmg) foi digerido com *SpeI*, separado em gel de agarose 1% e transferido para membrana de nylon HyBond. A hibridização foi realizada usando o *ahas* e *gus* como sondas (Fig. 1). As sondas foram marcadas com aa³²P dCTP (3000 Ci mol⁻¹) usando o random primer DNA labeling kit (Pharmacia Biotech).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 resume a frequência de plantas cuja expressão do gene *gus* foi silenciada.

Tabela 1. Frequência de plantas nas quais a expressão do gene *gus* foi silenciada.

Gy	Gene <i>gus</i> positivo:negativo
0	499 / 0
225	1445 / 2
250	1431 / 7
275	1455 / 6
300	1444 / 8
350	1290 / 13

Para determinar a presença dos genes *gus* e *ahas*, todas as 36 plantas que tiveram o gene *gus* silenciado foram analisadas por PCR. Exceto por uma planta, em todas as outras foi observado a ausência de ambos os genes (0,49%). Na planta 1A vinda do tratamento com 275 Gy observou-se a ausência do gene *gus* e presença do gene *ahas*.

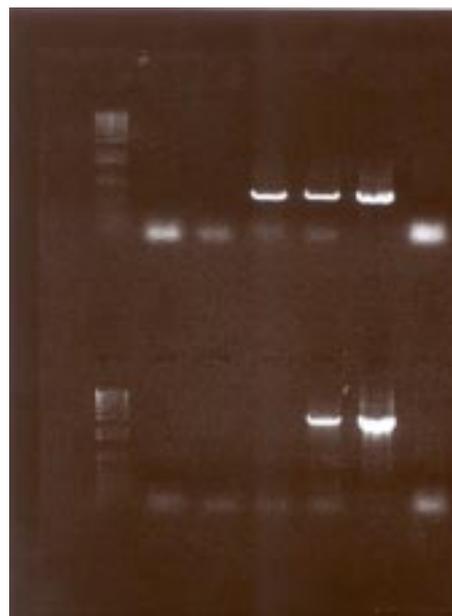


Fig 1. 1) Análise por PCR das plantas que apresentaram silenciamento do gene *gus* para determinar a presença dos genes *gus* e *ahas*. A planta nomeada 1 A, tratada com 275Gy apresentou ausência do gene *gus* e presença do gene *ahas*. Todas as outras 36 plantas analisadas apresentaram ausência de ambos os genes. 1) 1Kb DNA ladder 2) planta 9D 3) planta 5 A 4) planta 1 A 5) C+ 6) C+ 7) C- Superior) gene *ahas* Inferior) gene *gus*.

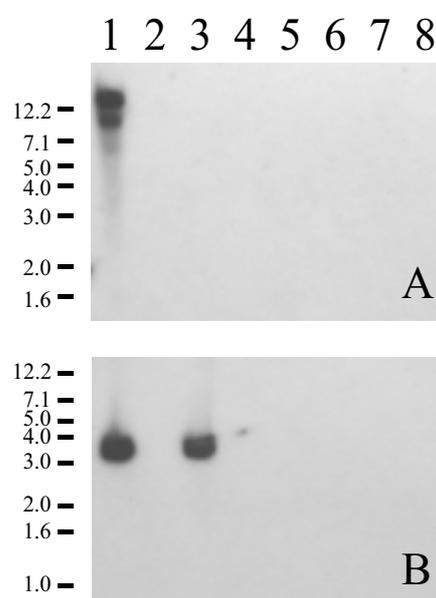


Fig 2. Análise por *Southern Blot* das plantas que apresentaram silenciamento do gene *gus* para avaliar a presença dos genes *gus* e *ahas* integrados no genoma. A planta 1 A apresentou ausência do gene *gus* e presença do gene *ahas* (poço3). As outras plantas analisadas apresentaram ausência de ambos os genes (poços 4 a 8). 1) Planta 8/19 2) Planta não-transformada 3)Planta 1 A 4) 8J 5) 5 A 6)3E 7) 9D 8) 10E Superior) Gene *gus* Inferior) gene *ahas*.

Seis plantas que tiveram o gene *gus* silenciado foram analisadas por *Southern Blot* para a presença do gene *gus* e *ahas* integrados no genoma. Nossos resultados mostram a ausência dos genes *gus* e *ahas* nas plantas 3E, 5A, 8J, 9D e 10E. Entretanto, na planta 1A foi detectada a ausência do gene *gus* e presença do gene *ahas*.

Estas plantas receberam tratamento com o herbicida imazapyr para avaliar a funcionalidade do gene *ahas*. Nenhum sintoma foi observado na planta 1A. Como esperadas nervuras vermelhas tipicamente vistas em plantas tratadas com imidazolinonas foram observadas nas plantas 3E, 5A, 8J, 9D, 10E e na planta controle (não-transgênica) e morreram duas semanas após o tratamento com herbicida.

As 36 plantas analisadas por PCR foram mantidas até a maturidade e formação de vagens. Trinta plantas, incluindo a planta 1A apresentaram um fenótipo normal com crescimento, vagens e produção de sementes normais.

Por outro lado, duas plantas apresentaram nanismo, queda e enrugamento das folhas.

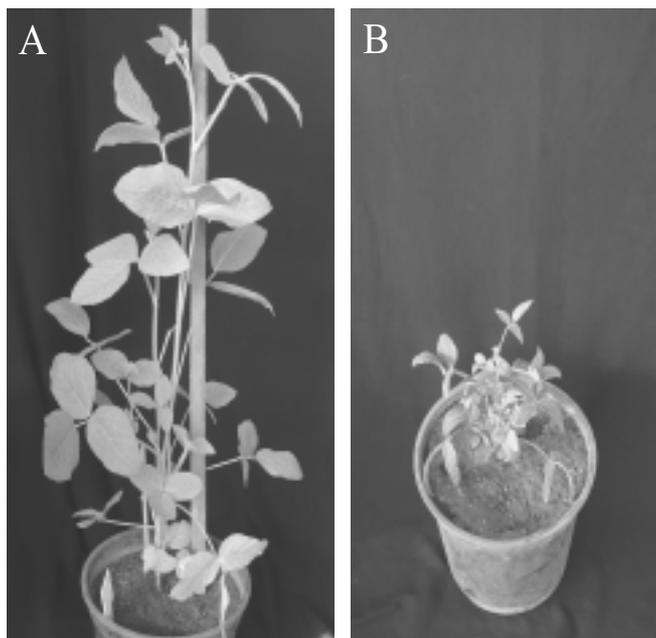


Fig 3. Planta 1 A apresentando fenótipo normal após pulverização com herbicida, confirmando a funcionalidade do gene *ahas*.

Os atuais processos para desenvolvimento comercial de variedades transgênicas somente necessitam da presença de características desejadas sem a necessidade de genes marcadores de seleção. Conseqüentemente, a remoção total ou parcial do transgene é desejável para garantir nenhuma expressão futura. Os resultados confirmam a hipótese que a radiação gama pode ser utilizada para remover fisicamente um gene específico (*gus*) de uma linhagem de soja transgênica que contem outros transgenes integrados no genoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aragão, F.J, L. Sarokin, G.R Vianna, E.L Rech. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at high frequency. *Theor Appl Genet* 101:1-6, 2000.

Dellaporta, S.L., J. Wood & J.B. Hicks. A plant DNA miniprep: versão II. *Plant Mol Biol. Rep* 1:19-21, 1983.

Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh & M.W, Bevan. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907, 1987.

Circular Técnica , 28

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br



1ª edição

1ª impressão (2003): 150 unidades

Comitê de publicações

Presidente: *Luzemar Alves Duprat*
Secretário-Executivo: *Maria José de Oliveira Duarte*
Membros: *Maurício Machaim Franco*
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Luciano Lourenço Nass
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares Campos Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: *Maria José de Oliveira Duarte*
Normalização Bibliográfica: *Maria Alice Bianchi*
Editoração eletrônica: *Giscard Matos de Queiroz*