

Análise funcional de um gene que codifica uma aquaporina relacionada à resposta da soja a estresses bióticos e abióticos

BALDASSO, BD *; HOMRICH, MS; WEBER, RLM; BODANESE-ZANETTINI, MH.

Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação de Plantas, UFRGS, Porto Alegre, RS;
*email: bruna.baldasso@ufrgs.br



INTRODUÇÃO

A produtividade da cultura da soja é amplamente afetada por diversos fatores bióticos e abióticos. Considerando a estreita variabilidade genética da soja, a engenharia genética e a genômica funcional aparecem como importantes ferramentas para o incremento das bases genéticas utilizadas nos programas de melhoramento. Os dois métodos mais comumente utilizados para a transformação de soja são o bombardeamento de partículas e o sistema *Agrobacterium tumefaciens*. Uma desvantagem destes métodos é o longo tempo até obtenção das plantas transgênicas - em torno de dez meses ou mais. Por outro lado, a transformação de soja via *Agrobacterium rhizogenes*, tem surgido como uma poderosa ferramenta biotecnológica devido à simplicidade e rapidez do método. Através desta técnica, são produzidas raízes transgênicas *in vitro* em, aproximadamente, seis semanas. Vários estudos têm demonstrado a expressão diferencial de genes envolvidos na resposta das plantas de soja ao ataque de fungos patogênicos e ao estresse hídrico. Baseado nos resultados desses estudos, um gene que codifica uma aquaporina foi selecionado para uma melhor caracterização funcional. A principal função das aquaporinas é facilitar o transporte de água através de seus canais (poros), atuando, principalmente, como reguladoras de estresses abióticos em plantas. Neste contexto, o estudo da função dos genes que codificam aquaporinas é de fundamental importância para o esclarecimento de seu papel na resposta das plantas a estresses bióticos e abióticos.

OBJETIVO

O principal objetivo deste estudo é caracterizar e determinar a função desta aquaporina em resposta a estresses bióticos e abióticos

MATERIAL E MÉTODOS

Construção do vetor de superexpressão

- A região codificante do gene foi amplificada a partir do cDNA da cultivar Conquista de soja e clonada em pGEM®-TEasy (Promega);
- A identidade do fragmento foi confirmada por seqüenciamento;
- Recombinação no vetor de entrada pENTR Directional TOPO® (Gateway®- Invitrogen);
- Recombinação no vetor de destino pH7WG2D, contendo o promotor 35S para superexpressão e os marcadores de seleção de resistência a espectinomicina (para a bactéria) e higromicina (para plantas). O vetor também contém um gene repórter GFP.

Transformação via *A. rhizogenes*

O vetor de superexpressão foi introduzido em *A. rhizogenes* por eletroporação e as bactérias foram selecionadas em meio de cultura contendo o antibiótico espectinomicina. Estas bactérias foram utilizadas para infectar cotilédones de soja e induzir a formação de raízes-em-cabeleira transgênicas.

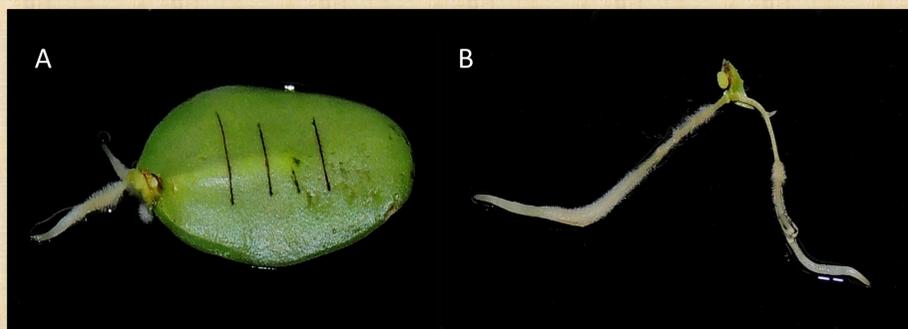


Figura 1. A: Raiz em cabeleira crescendo em um cotilédone após infecção por *A. rhizogenes*.
B: Raiz em cabeleira cultivada em meio de seleção contendo espectinomicina.

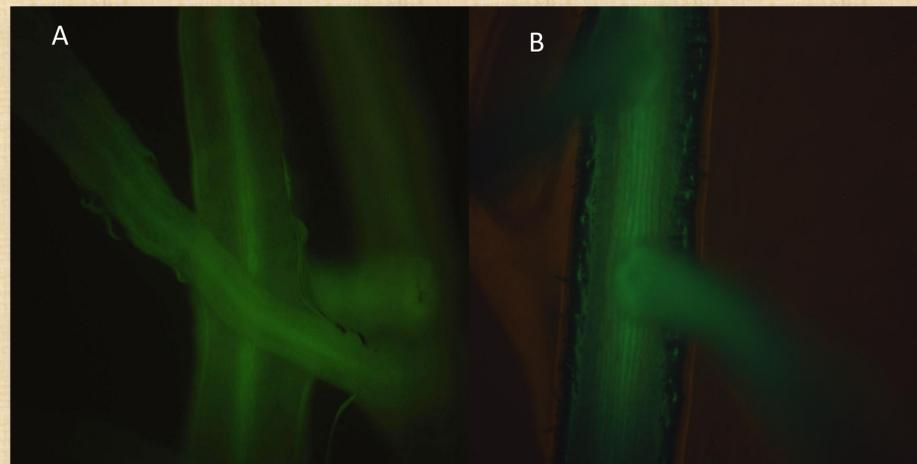


Figura 3. Raízes em cabeleira expressando GFP.



Figura 3. Detalhe do ápice de raiz em cabeleira não transformada.

Tabela 1. Análise das raízes em cabeleira de soja transformadas.

| Número de cotilédones infectados | Raízes obtidas de cotilédones infectados | | Raízes transgênicas | | | |
|--|--|----|---------------------|----|---------------------------------------|------|
| | n ₁ | % | n ₂ | % | FT% (n ₂ /n ₁) | |
| Cotilédones infectados por <i>A. rhizogenes</i> transformada | 121 | 65 | 53,7 | 10 | 8,3 | 15,4 |
| Cotilédones infectados por <i>A. rhizogenes</i> selvagem | 77 | 11 | 14,3 | x | x | x |

n₁: número de cotilédones que induziram raízes-em-cabeleira.

n₂: número de raízes-em-cabeleira que expressaram GFP.

FT (Frequência de Transformação); raízes-em-cabeleira transgênicas/número de cotilédones que induziram raízes-em-cabeleira.

PERSPECTIVAS

Os testes com as raízes transgênicas, bem como a análise fenotípica e os estudos de expressão gênica das plantas superexpressando esta aquaporina nos propiciará melhor caracterizar e determinar a função deste gene em resposta aos diferentes estresses. A manipulação da expressão dos genes que codificam as aquaporinas pode auxiliar no desenvolvimento de plantas mais tolerantes a estresses abióticos e bióticos.

APOIO FINANCEIRO

- FAURGS
- BIOTEC SUR II (Ministério da Ciência e Tecnologia)
- GENOSOJA - CNPq
- Capes

