



# Detecção de Proteína Cry 1Ac em Soja

Maria Fernanda Antunes da Cruz<sup>1</sup>; Milena S. Homrich<sup>2</sup>; Maria Helena Bodanese-Zanettini<sup>2</sup>; Ana Christina Sagebin Albuquerque<sup>3</sup>; Paulo Roberto V.S. Vieira<sup>3</sup>; José Roberto Salvadori<sup>3</sup>; Paulo Fernando Bertagnoli<sup>3</sup>; Rita Maria Alves de Moraes<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Caixa Postal 611, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS, e-mail: fertunes@bol.com.br; <sup>2</sup>Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS; <sup>3</sup>Embrapa Trigo, Caixa Postal 451, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS.

## INTRODUÇÃO

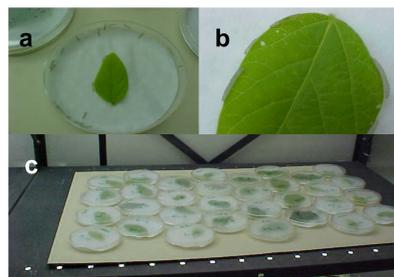
A produção de plantas resistentes a pragas e patógenos é um dos objetivos da transformação genética de plantas. Dentre esses, destaca-se a transferência de genes de resistência a insetos. Os genes *cry* isolados da entomobactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), são responsáveis pela codificação de proteínas Cry de atividade inseticida, através da qual a morte do inseto se dá, entre outros fatores, ao desequilíbrio osmótico e iônico do epitélio intestinal. A incorporação de genes *cry 1 Ac* na cultura da soja para o controle da lagarta *Anticarsia gemmatilis* visa a redução dos custos de produção e a proteção do ambiente, pela redução no uso de agroquímicos na lavoura.

## OBJETIVO

Detectar a presença da proteína Cry 1Ac de Bt em soja IAS-5 co-transformada, através do teste de fitas de fluxo lateral e a expressão da delta-endotoxina Cry 1Ac em bioensaio com a lagarta da soja, paralelo à presença do transgene gene *cry 1Ac* via Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo está sendo realizado conjuntamente pelo Departamento de Genética, Biologia Molecular e Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e o Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais (NBAC) da Embrapa Trigo. Em casa-de-vegetação, foram semeadas plantas T<sub>1</sub> da cultivar IAS-5 co-transformada com *cry 1Ac* de *B. Thuringiensis*, nas quais foi determinada a presença do referido transgene em geração T<sub>0</sub> (Fig.2). Para o teste de tiras de fluxo lateral, foram selecionadas 280 plantas T<sub>1</sub>, das quais foi retirado um disco foliar e macerado com tampão de extração em tubo 1,5mL para introdução da tira de detecção da proteína. Paralelamente, a presença do transgene, independente de sua expressão, é realizada pelo teste de PCR, utilizando um *primer* para *cry 1Ac* que amplifica um fragmento de 180 pb. Para o bio-ensaio (Fig.1), foram selecionadas 65 plantas T<sub>1</sub> e utilizadas 5 plantas da cultivar IAS 5 não-transformada como controle negativo, das quais foi colocado um folíolo/placa de Petri, arranjadas em delineamento completamente casualizado com 4 repetições. Em cada unidade experimental, foram depositadas 20 lagartas *Anticarsia gemmatilis* do 3º instar e as avaliações quanto ao índice de mortalidade das lagartas foram realizadas 24, 48, 72 e 120 horas após a inoculação.



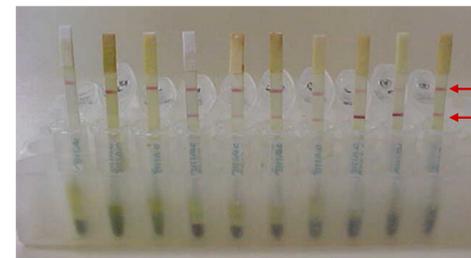
**Figura 1.** Bioensaio com lagartas *Anticarsia gemmatilis*: a) e b) inoculação, c) placas em câmara de crescimento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de tiras de fluxo lateral realizado, em 73 plantas (Tabela 1) expressaram o gene *cry 1Ac*, resultado da segregação do transgene na geração T<sub>1</sub>.

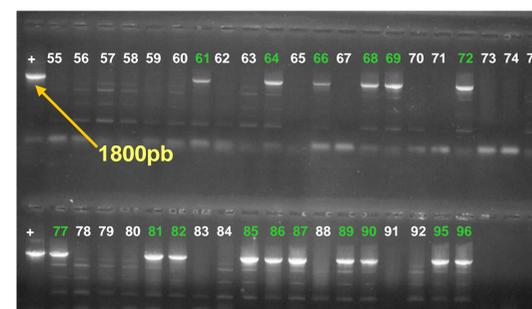
Planta-mãe (T <sub>0</sub> )	Progênie (T <sub>1</sub> ) transgênica
A	28
B	07
C	09
D	11
E	02
F	07
G	09

**Tabela 1.** Número de plantas transgênicas determinado por tiras de fluxo lateral para a proteína Cry 1Ac.



**Figura 2.** Plantas T<sub>1</sub> negativas (1linha) e positivas (2 linhas) para a expressão do transgene *cry 1Ac* em teste de tiras de fluxo lateral.

Através da amplificação de DNA via PCR, está sendo estimada a relação entre a presença do transgene e sua expressão (resultado positivo no teste de tira de fluxo lateral). Até o momento foi confirmada a presença do gene *cry 1Ac* em 16 plantas originárias da planta mãe A (Fig.3).



**Figura 3.** Amplificação de DNA em gel de agarose 1%, utilizando o plasmídeo pGEM4Z-Cry 1ac como controle positivo (+) para o gene *cry 1Ac*.

Plantas positivas originárias da planta-mãe A: 61, 64, 66, 68, 69, 72, 77, 81, 82, 85, 86, 87, 89, 90, 95 e 96.

A morte das lagartas ao se alimentarem dos folíolos de plantas transformadas observada no bio-ensaio realizado, em oposição às lagartas alimentadas com plantas não-transformadas, indica que a delta-endotoxina se expressa no tecido foliar. A morte destas lagartas pode ser explicada pelo mecanismo de ação das proteínas Cry, que inicia com a solubilização do corpo de inclusão, terminando pelo desequilíbrio iônico entre o citoplasma e o meio externo à célula; destruição das microvilosidades, hipertrofia das células epiteliais; vacuolização do citoplasma e lise celular, levando o intestino à paralisia e morte da larva (FIUZA, 2004).

## CONCLUSÃO

A presença das proteínas Cry em tecidos foliares de plantas de soja transformadas com o transgene *Cry 1Ac*, detectado via PCR, pode ser determinada via teste de tira de fluxo lateral e seu efeito sobre a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis*, sugere a importante contribuição desta biotecnologia para a preservação da biodiversidade, preservando o ambiente da ação tóxica de agroquímicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FIUZA, L.M. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n.32, p.84-89, jan-jun. 2004.