



## QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE INIBIDOR DE TRIPSINA EM FOLHAS DE EVENTOS DE SOJA GM COM FATOR DE TRANSCRIÇÃO ABA INDUZIDO

BARBOSA, D.A.<sup>1</sup>; MOLINARI, M.D.C.<sup>1</sup>; FUGANTI-PAGLIARINI, R.<sup>2</sup>; MARIN, S.R.R.<sup>3</sup>; MANDARINO, J.M.G.<sup>3</sup>; MERTZ-HENNING, L.M.<sup>3</sup>; NEPOMUCENO, A.L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina-PR, danielbarbosa238@gmail.com; <sup>2</sup>Bolsista CNPq, Embrapa Soja; <sup>3</sup>Embrapa Soja.

Os inibidores de tripsinas podem ser encontrados em diversas culturas e em diferentes tecidos vegetais tais como raiz, caule, folhas e frutos e em maiores concentrações principalmente em sementes (Ribeiro, 2010). Em soja, estes inibidores dificultam o processamento do grão pela indústria, pois, para melhorar a qualidade nutricional, precisam passar por um tratamento térmico. Além disso, esses inibidores tem a capacidade de se ligar a tripsina inibindo sua ação sobre as proteínas. Assim, os inibidores de tripsina são enzimas que podem ser consideradas um fator anti-nutricional, sendo indesejados nos grãos destinados ao consumo (Crancianinov et al., 2005).

A quantificação de inibidores de tripsina faz parte da caracterização da equivalência substancial de plantas geneticamente modificadas (GMs). Estes procedimentos visam garantir não só a segurança dos OGMs mas também que substancialmente o alimento ou ingrediente GM seja equivalente ao alimento ou ingrediente convencional (Belem et al., 2000). Assim, o objetivo desse trabalho foi quantificar o nível de expressão gênica do fator de transcrição ABA dependente (FT) inserido nas linhagens (GMs) para tolerância à seca, relacionando com os níveis de inibidor de tripsina. Foram testadas as linhagens GMs 1Ea2939 e 1Ea15 e a cultivar convencional (BR16). Para realização deste trabalho foram utilizadas nove repetições biológicas de cada evento GM e da cultivar convencional. A coleta das folhas para as análises foi realizada no estágio reprodutivo R1-R2 (Fehr, 1971). A determinação dos níveis de expressão do transgene alvo foi realizada por quantificação relativa utilizando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta ct}$  (Livak; Schmittgen, 2001). O gene endógeno *Gm $\beta$ -actina* (Glyma.15G050200) foi utilizado como normalizador e a cultivar convencional BR 16 como amostra calibradora. A quantificação de tripsina foi realizada de acordo com Kakade e colaboradores (1974) no Laboratório de Análises Físico-Químicas e Cromatográficas da Embrapa Soja. Os dados obtidos apresentaram distribuição normal segundo teste de Shapiro-Wilk, sendo realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de separação de médias Tukey de 5% de significância, utilizando o *software* SASM-AGRI (Canteri et al., 2001).

Os resultados mostraram menores níveis de inibidor de tripsina nas linhas GMs quando comparada a cultivar convencional BR16 (Figura 1). A presença de inibidores de tripsina em sementes de soja limita sua utilização, tornando necessário o processamento térmico para melhorar sua qualidade nutricional (Miura et al., 2005). Nas folhas, os níveis de inibidores de tripsina são baixos (Tremacoldi, 2009) porém podem estar relacionados à digestibilidade de alguns insetos consumidores (Horm, D. J., 1978).

Os níveis de expressão (Figura 2) do transgene confirmaram sua presença nas cultivares GMs, sendo que o evento 1Ea2939 apresentou maior expressão do transgene. Os eventos GMs são obtidos de modo independente e portanto, podem apresentar respostas diferentes dependendo do local de inserção no genoma hospedeiro e da interação do genoma receptor com o gene exógeno (Altpeter et al., 2005). Com isso, resultados diversos para os eventos GMs podem ser esperados não apenas molecularmente, mas também em aspectos físico-químicos, anatômicos, morfológicos, metabólicos e modificações pós transcricional. Assim, a presença do



transgene nas cultivares GMs foi capaz de induzir a queda dos níveis de inibidor de tripsina nas folhas de soja se comparados aos níveis identificados na cultivar convencional não GM. Pode-se inferir que esta resposta ocorreu em razão da inserção do transgene, o qual se caracteriza por ser um FT de transcrição ABA induzido que ativa a transcrição de genes alvos pela ligação em regiões conservadas presentes na região promotora, especificamente, para esse FT, os *cis*-elementos ABRE (Dar et al., 2017).

O ABRE é um tetrâmero altamente conservado em promotores de genes ABA dependentes em diversas plantas como arroz, *Arabidopsis* e soja, sendo representado pela sequência ACGT (Yoshida et al., 2015). A atividade da regulação da transcrição gênica do FT inserido pela ligação ao ABRE, pode ocorrer como regulador positivo aumentando a expressão dos genes ou como regulador negativo inibindo a transcrição dos genes. Os dados obtidos neste trabalho, mostram que o gene que codifica para o inibidor de tripsina (Glyma.08G235400) contém em sua região promotora motivos ABRE, reconhecidos pelo FT inserido (Figura 3), sugerindo que os níveis do inibidor de tripsina nos eventos GMs podem estar sendo regulados negativamente, diminuindo ou inibindo sua expressão.

Os baixos níveis de inibidor de tripsina nos eventos transgênicos gerados, indicam que, em relação a esse fator anti-nutricional, as linhagens GMs seriam bem aceitas pela indústria de processamento da soja no caso de uma possível liberação comercial.

### Referências

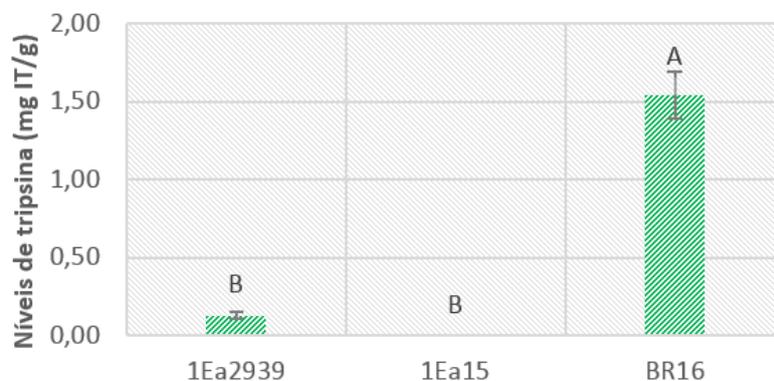
- ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K. et al. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, v.15, p.305-327, 2005.
- BELEM, M. A. F.; FELBERG, I.; GONCALVES, E. B.; CABRAL, L. C.; CARVALHO, J. L. V.; SUNDFELD, E.; NUTTI, M. R. Procedimentos para estabelecimento da equivalência substancial entre a composição de alimentos derivados de plantas geneticamente modificadas (PGMs). BIOWORK, 3., 2000, Viçosa, MG. **Biotecnologia e produção de sementes**. Viçosa, MG: UFV, 2000. p. 197-222.
- CANTERI, Marcelo G. et al. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.
- CRANCIANINOV, W.; SANTANA, A.; FREITAS, A.; MANDARINO, J.; BENASSI, V.D.T. Determinação do inibidor de tripsina de kunitz em soja crua e tratada de cultivares brasileiras. In: **Embrapa Soja-Artigo em Anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 2005, Londrina. Resumos expandidos. Londrina: Embrapa Soja, 2005.
- DAR, N.A.; AMIN, I.; WANI, W.; WANI, S.A.; SHIKARI, A.B.; WANI, S.H.; MASOODI, K.Z. Abscisic acid: A key regulator of abiotic stress tolerance in plants. **Plant Gene**, 2017.
- FEHR, W.R. et al. Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill 1. **Crop science**, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.
- KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E. and PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of improved procedure. **Cereal Chemistry**, v.51, p.376-383, 1974.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MIZUBUTI, I. Y.; IDA, E. I. Cinética de inativação de inibidores de tripsina e de insolubilização de proteínas de diferentes cultivares de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1659-1665, 2005.



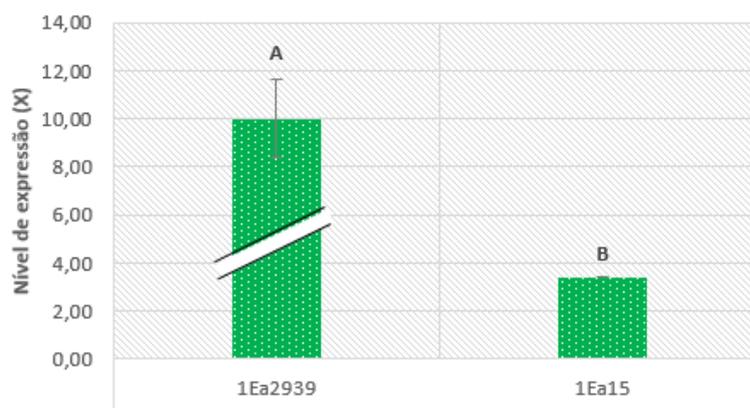
RIBEIRO, J. K. C. **Novas propriedades do SKTI (Inibidor de tripsina de soja):** inibição para elastase neutrofílica humana e efeitos no processo de injúria pulmonar aguda. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

YOSHIDA, T.; FUJITA, Y.; MARUYAMA, K.; MOGAMI, J.; TODAKA, D.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. **Plant, cell & environment**, v. 38, n. 1, p. 35-49, 2015.



**Figura 1.** Quantificação dos níveis de inibidor de tripsina em miligramas por grama de tecido foliar, nos eventos geneticamente modificados com fator de transcrição ABA induzido, denominadas 1Ea2939 e 1Ea15, e na cultivar convencional BR16.



**Figura 2.** Quantificação do nível de expressão do fator de transcrição ABA induzido em duas linhagens de soja geneticamente modificadas (GMs) denominadas 1Ea2939 e 1Ea15. Utilizou-se como endógeno o gene XXXX, sendo as amostras GMs calibradas pela cultivar convencional BR16.



ATGTGCTTTTTGGTTTGAACAATAAGTGAGATTATGTACGTAAATCTTTGGAGACATGATTACAGTTTAAATCAATAAAAAA  
 TAAAAATTATATCCAAAATTAATAAATCATTATTTATAATAAATTTTAAATTTAAAAGTGAAAAAGATTAAATAAAAAA  
 ATTTAAATTAAGAGATTAACTAAATATAATTAACCATAAATACATTTAGTCTATAGTTAATAAAATAACACTTTGTATTT  
 TCTCTAGTAACTTAACTCTATTATATTACATGAATATCTCTCCATATATTCTTTGGCAATTACAACCTAGTTATTTAGTATAAGTTT  
 TGTCTATGAAAGAAAATGATAAAATTAATAAATTGATTGCACAAAGATAAACGTTGTATTAATGTATGCGTCTGGCCGCT  
 GGATTGACTTTTTTTGTTATTGTAATAACAAAATTTCCAATTTGGGAGGTGTTCTCGTAGGTAGAGTAAATATTTCTACAAAATA  
 TATTCAATCAAAGCTTTATCCTTGAACGTAACCTCATCGACGATGAAAGCATTGTCTGCTAATTAGCAGTATTAGCCTTACAGT  
 ACAAGCAATGTCTAATTGGATAAGTCATGTTGAATTTGATTGAAATGTACCTCCTTTCTTGACCAAACCTCGTACGACATGC  
 CACACACAATCCCATCCACATATTCGGTGACCGATCTAAAAAAATTAATAAAATTTTAAATTTTAAATTTAAAGAAATAAAATAGATAAAAT  
 TATATTAAATTTTATAAAATATAATTTATAATAAAAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAAGAAATAAAATAGATAAAAT  
 AATATCAATTTGTTTTCTTTTTAAAGTTTTATCTTTATAACTTTTCATATCTTTTTTTTTTTAAAAAAGTTATTTTTAAAGA  
 ATATCTATTTTTATGAAAAAAAAGTACTAATTATTAATACATTTAA

**Figura 3.** Região de 1000 pb *upstream* da região promotora do gene que codifica para um inibidor de tripsina (colocar qual o Glyma). Em verde estão destacados os motivos ABRE e em cinza motivos ABRE-Like, presentes na região promotora do gene.