

OBTENÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DA CULTIVAR DE SOJA BRS 184 GENETICAMENTE MODIFICADA COM A CONSTRUÇÃO SAT6 VISANDO TOLERÂNCIA A SECA

MOLINARI, M.D.C.¹; KANAMORI, N.²; FUGANTI-PAGLIARINI, R.³; MARIN, S.R.³; MERTZ-HENNING, L.M.³; FARIAS, J.R.B.³; NEUMAIER, N.³; URANO, K.⁴; SHINOZAKI, K.⁴; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.⁵; NAKASHIMA, K.²; NEPOMUCENO, A.L.². ¹Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina-PR, maylamolinari@hotmail.br; ²Japan International Research Center for Agricultural Sciences; ³Embrapa Soja; ⁴RIKEN Center for Sustainable Resource Science; ⁵Laboratory of Plant Molecular Physiology, Universidade de Tóquio.

Apesar dos números positivos, nos últimos anos devido ao aumento da frequência e intensidade dos períodos de seca, fato provavelmente associado às recentes mudanças climáticas globais, as perdas na produtividade de soja têm sido recorrentes e expressivas (EMBRAPA, 2014). Os valores acumulados em perdas decorrentes de períodos de déficit hídrico, nos últimos anos (safras 2003/2004 a 2012/2013), alcançam a cifra de US\$ 46,6 bilhões (FARIAS, 2014 dado não publicado). Neste contexto, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGMs) com genes que conferem tolerância a seca poderá contribuir para amenizar os problemas decorrentes do déficit hídrico. Além dos fatores de transcrição, que desencadeiam a expressão de genes em cascata, a manipulação de genes chaves em vias metabólicas específicas envolvidas na defesa vegetal ao déficit hídrico também vem sendo bastante utilizada no desenvolvimento de cultivares mais tolerantes.

Muitas evidências apontam, em plantas, para a presença de duas vias regulatórias de resposta ao déficit hídrico, uma dependente do ácido abscísico (ABA) e outra independente do ABA (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005). Este hormônio vegetal é peça chave na regulação de uma variedade de processos de desenvolvimento vegetal coordenando ainda uma complexa rede regulatória que possibilita a sobrevivência das plantas mesmo em condições de baixa disponibilidade de água (CUTLER et al., 2010; KIM et al., 2010).

Com o foco de desenvolver cultivares mais tolerantes à seca, alguns trabalhos disponíveis na literatura científica apontam que aumentos na expressão de genes que codificam enzimas que atuam na via biossintética de ABA melhoram o desempenho das plantas sob déficit hídrico (IUCHI et al., 2001; TAN et al., 2003; ENDO et al., 2008). Neste contexto, o objetivo do trabalho foi obter via *Agrobacterium tumefaciens* eventos de soja geneticamente modificadas com a construção gênica SAT6 e caracterizar molecularmente os eventos obtidos quanto ao número de inserções e segregação do transgene. O gene SAT6 faz parte da via biossintética do ABA.

O método de transformação genética utilizado foi descrito por Paz et al. (2006), com modificações. A cultivar convencional de soja BRS 184 foi utilizada nas transformações. DNA gênomico foi extraído do tecido foliar das plantas de soja transformadas de acordo com o protocolo proposto por Doyle & Doyle (1987) com modificações. Para confirmação dos eventos positivos uma amplificação por PCR convencional foi realizada utilizando-se pares de *primers* específicos para o gene de interesse. Para a realização do teste de segregação ou zigosidade, foram utilizadas amostras dos eventos da geração T₂. O teste do Qui-quadrado (X²) (p≤0.05) foi realizado para verificar se o gene exógeno apresentava segregação mendeliana.

A quantificação absoluta, para número de cópias inseridas, foi realizada utilizando o gene endógeno da lectina para a normalização (MEYER, 1994) e o sistema de detecção SYBR Green[®] (GIULIETTI et al., 2001). Para a quantificação do

número de cópias, nos eventos, na geração T₁, o método 2^{-ΔCt/2} foi utilizado (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; BARBOSA et al., 2012; ENGELS et al., 2013).

Um total de 184 explantes de soja convencional BRS 184 foram geneticamente modificados, via *Agrobacterium*, com a construção SAT6. Destes, 2 eventos foram obtidos e identificados como, 2HA1 e 2HA2, com uma eficiência de transformação de 1,1 %. Na geração T₁, 7 plantas foram identificadas como positivas, sendo 5 do evento 2Ha1 e 2 do evento 2Ha2 (Figura 1).

A análise de segregação do gene exógeno SAT6 nos eventos mostrou que o evento 2Ha1 apresentou segregação mendeliana 3:1, uma vez que o teste de X² (p≤0.05) mostrou-se não significativo. O evento 2Ha2-51 apresentou apenas uma planta com a inserção do gene SAT6 mostrando segregação não-mendeliana. No evento 2Ha2-52 a presença do transgene não foi confirmada.

Os dados do RT-qPCR mostraram a presença de 1 a 4 cópias do transgene no evento 2Ha1 e o evento 2Ha2-52 apresentou 1 cópia do transgene (Tabela 1).

Contudo, a construção gênica SAT6 foi inserida com sucesso no genoma da soja e 2 eventos positivos foram obtidos. Ainda, o protocolo de transformação genética de soja via *Agrobacterium tumefaciens* foi eficiente para introduzir a construção no genoma da soja e o evento 2Ha1 apresentou segregação conforme os padrões mendelianos. Por fim, como esperado quando se utiliza via *Agrobacterium tumefaciens*, os eventos obtidos apresentaram poucas cópias inseridas do transgene (1 a 4).

Referências

- BARBOSA, E.G.G.; PAGLIARINI, R.F.; NEPOMUCENO, A. L. Obtenção, seleção de eventos de soja contendo o gene AtAREB1 e análises da sinalização ABA-dependente. Dissertação UEL, Londrina – Paraná, IAPAR -EMBRAPA. 2012.
- CUTLER, S.R.; RODRIGUES, P.L.; FINKELSTEIN, R.R.; ADAMS, R. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review Plant Biology*, v. 61, p. 651-679, 2010.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull*, v.19, p.11-15, 1987.
- EMBRAPA Soja - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2013). Soja em números (safra 2010/2011). Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/index.php?cod_pai%2&op_page%294> Acesso em: 2014.
- ENDO, A., SAWADA, Y., TAKAHASHI H., OKAMOTO M., IKEGAMI K., KOIWA H., SEO M., TOYOMASU T., MITSUHASHI W., SHINOZAKI K., NAKAZONO M., KAMIYA Y., KOSHIBA T., NAMBARA E. Drought Induction of Arabidopsis 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Occurs in Vascular Parenchyma Cells. *Plant Physiology*, August 2008, Vol. 147, pp. 1984–1993. www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.108.116632.
- ENGELS, C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; MARIN, S.R.R.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.; OLIVEIRA, M.C.N.; KANAMORI, N.; NEPOMUCENO, A.L. Introduction of the rd29A:AtDREB2A CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. *Genetics and Molecular Biology*, v. 36, p. 556–565, 2013.
- GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, v. 25, p. 386-394, 2001.
- IUCHI S, KOBAYASHI M, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. 2001. A stress-inducible gene for 9 cis epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought tolerant cowpea. *Plant Physiol* 123:533-562.

KIM, T-H.;BOHMER, M.; HU, H.;NISHIMURA, N.; SCHROEDER, J.I. Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca⁺ signaling. Annual Review of Plant Biology, v. 61, p. 561-591, 2010.

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.

MEYER R, CANDRIAN U, LÜTHY J. Detection of pork in heated meat products by polymerase chain reaction. J AOAC Int. 1994; 77:617–622.

PAZ, M. M.; MARTINEZ, J. C.; KALVIG, A. B.; FONGER, T. M.; WANG, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation. Plant Cell Reports, v. 25, p. 206-213, 2006.

TAN, B. C.; JOSEPH, L. M.; DENG, W. T.; LIU, L. J.; LI, Q. B., CLINE, K.; McCARTY, D. R. Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. Plant J, v. 35, p. 44–56, 2003

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. The Plant Cell, Waterbury, US, v. 18, p. 1292-1309, 2005.

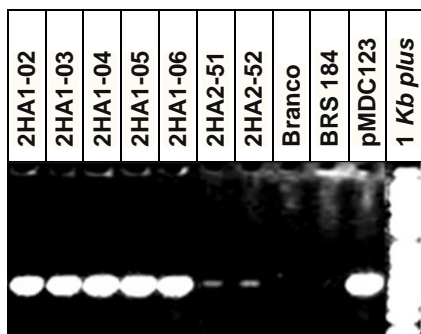


Figura 1. PCR convencional dos eventos T₁ de soja identificadas como positivas para a construção gênica SAT6. Legendas: 2HA1; 2HA2 (eventos transgênicos T₁); Branco; BRS 184 (controle negativo); pMDC123-iGUS (plasmídeo contendo o transgene SAT6) utilizado como controle positivo; ladder 1 Kb Plus nas extremidades do gel (1% de agarose).

Tabela 1. Taxa de segregação (χ^2) na geração T₂ para a construção SAT6. ($p \leq 0.05$). Legenda: Sim (S); Não (N).

Genótipo	Positiva	Negativa	χ^2	Segregação 3:1	Cópias
2Ha1-02	95	24	1,48	S	1 -2
2Ha1-03	71	24	0,00	S	1
2Ha1-04	182	57	0,18	S	3-4
2Ha1-05	5	1	0,06	S	1
2Ha1-06	22	8	0,01	S	1
2Ha2-51	-	291	-	N	-
2Ha2-52	1	46	-	N	1