

Efeito do genótipo e da construção gênica na eficiência de transformação de soja via *Agrobacterium tumefaciens*

ANDREATA, E.C.¹; MOLINARI, M.D.C.²; MARIN, S.R.R.³; BARBOSA, D.A.²; QUEIROZ, A.A.¹; FUGANTI-PAGLIARINI, R.⁴; FARIAS, J.R.B.⁵; NEUMAIER, N.⁵; NEPOMUCENO, A.L.⁵; MERTZ-HENNING, L.M.⁵

¹UNOPAR, Bolsista Embrapa, Londrina, PR, elizandra.andreata@hotmail.com; ²UEL, Bolsista CAPES;

³Analista, Embrapa Soja; ⁴Pós-Doutoranda, Embrapa Soja; ⁵Pesquisador, Embrapa Soja

Introdução

O melhoramento genético de plantas está relacionado à criação de variabilidade, seleção de genótipos com características desejáveis e a realização de testes para avaliação de genótipos superiores. Na busca de cultivares com características agrônomicas, fisiológicas e metabólicas de interesse agrônomico, a transformação genética via *Agrobacterium* possibilita a transferência de genes isolados de qualquer organismo para espécies vegetais, proporcionando a quebra da barreira sexual entre diferentes espécies, de forma a gerar variabilidade genética não disponível pelos métodos de melhoramento convencionais (JONES; CASSELLS, 1995).

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria fitopatogênica proveniente do solo, tipo bacilo aeróbico gram-negativo, da família *Rhizobiaceae*. A bactéria possui um plasmídeo (DNA extracromossômico, chamado plasmídeo Ti), o qual possui a habilidade de transferir parte de seu DNA para a célula vegetal que está infectando. Esse plasmídeo possui duas regiões de extrema importância, sendo elas: T-DNA (*Transferred DNA*), onde se situam os oncogenes, sendo a única parte transferida do plasmídeo à célula vegetal, e a região *vir* (região de virulência ativada pela presença de compostos fenólicos e moléculas sinalizadoras), fundamental para a transferência do T-DNA (WANG et al. 1984). Os genes introduzidos codificam enzimas interligadas às sínteses de opinas e fitohomônios que induzem uma mutação celular na planta e a sobrevivência da bactéria, ocorrendo a formação de tumores, caracterizados como a doença da galha da coroa ou *crowngall* (NAM et al. 1999; TINLAND, 1996). Pelo seu mecanismo de ação, é muito utilizada em programas de melhoramento genético, onde há a substituição dos genes constituintes do T-DNA e a introdução de um gene exógeno de interesse de forma que a mesma possa transferi-la biologicamente acultura específica.

A transformação via *Agrobacterium* destaca-se como uma metodologia que permite a inserção de uma ou poucas cópias do transgene no DNA da planta hospedeira (BRASILEIRO, 1995), diminuindo a inserção de duplicatas, fator que pode resultar em desarranjos cromossômicos no genoma, como o silenciamento gênico (MENG et al., 2006; SCHUBERT et al., 2004). Alguns fatores podem eventualmente intervir na eficiência da transformação, sendo relacionados ao genótipo da planta, tipo de tecido transformado (BACHCHU et al., 2011; DUTT et al., 2012; KHAN et al., 2012), vigor dos explantes, estirpe da bactéria (DUTT; GROSSER, 2009; CHETTY et al., 2013), cultivar (MUNIZ et al., 2012), construção gênica (MIYATA et al., 2012; PORTO et al., 2014; MORAES, 2015), sistemas de seleção, cultivo e vetor utilizado.

O objetivo deste estudo foi analisar os fatores genótipo e gene empregado, relacionados à eficiência da obtenção de plantas de soja geneticamente modificadas.

Material e Métodos

Os plasmídeos foram produzidos pelo Centro Internacional Japonês de Pesquisa de Ciências Agrícolas (*Japan International Research Center for Agricultural Science* - JIRCAS) e transferidos para a Embrapa Soja. Foram utilizados, no processo de transformação, seis plasmídeos contendo os genes: AtGols2; AtNCED3; NFYC10; AtArebFL; GmDREB2A(FL); GmDREB2A(CA), todos sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S e contendo a presença da região terminadora poly A. Outro elemento importante e de função específica presente nas construções é o gene marcador de seleção BAR que codifica a enzima fosfinotricina acetil transferase e confere às plantas transformadas resistência ao herbicida glufosinato de amônio.

Para o processo de transformação, foi preparado um inóculo preliminar, a partir de uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105, contendo o cassete que possui o gene de interesse e as regiões necessárias para inserção, transcrição e tradução na planta. As etapas da transformação foram realizadas com os genótipos BRS 388 e BRS 282, segundo o protocolo de Paz et al. (2006) com modificações, sendo estas as concentrações de reagentes utilizados nos meios de cultivo: CCM I- (*Co-Cultivation Medium*), líquido e sólido com os mesmos reagentes (exceto pela presença de 4g/L de ágar no meio sólido) composto por Gamborg B5 Basal (Medium1/10X)0,32g/L; Vitamina B5 (1/10X)1ml/L; sacarose 30 g/L; MES ou MOPS (2-N-Morfolino) 4,26 g/L; pH 5,4; suplementado com GA (ácido giberélico 1mg/mL) 250 μ L; BAP (benzilaminopurina)334 μ L; L-CYS (cisteína 100gm/mL) 4mL; DTT (ditiotrietol, 1M)1mL; STS (Tiosulfato de sódio, 1M) 1ml; Acetoseringona (1M) 200 μ L; Silwet L-77 200 μ L. GM (*Germination Medium*) composto por Gamborg B5 Basal Medium (3,2g/L); Vitamina B5 1X(1ml); sacarose 30 g/L; MES ou MOPS 0,64 g/L; phytaagar 6,5 g/L, PPM 500 μ l; pH 5,6. SIM 1- (*Shootinductio Medium*), que possui meio de seleção presente (composto por Gamborg B5 Basal Medium 1X(3,2g/L); vitamina B5 1X(1mL);sacarose 30 g/L; MES 0,64 g/L ; phytaagar 7 g/L, pH 5,6 suplementado com BAP(concentração de 5mg/mL) 334 μ L;pHde 5,6;PPM 500 μ L e Meropene 2 mg/L (concentração de 12,5mg/mL);

SIM2 - (*ShootinductionMedium*) ,o qual contém a mesma composição do meio SIM1, porém suplementado com o agente seletivo GLU (glufosinato de amônio-10mg/mL) 300 μ L; SEM-(*ShootElongationMedium*), composto por MS (*MurashigeeSkoog*)4,4g/L; vitamina B5(1x) -1mL; sacarose 30 g/L; MES ou MOPS 0,64 g/L; phytaagar 7 g/L, pH 5,6 e suplementado com GA (ácido giberélico, - 1mg/mL) 500 μ L, A (asparagina-50mg/mL) 1 mL, P (ácido piroglutâmico) 100mg/L)- 1mL, IAA (ácido indol acético 1mg/mL) -100 μ L, TZ (trans-zeatina 0,5mg/mL)- 1mL, M (Meropene 12,5mg/mL) -2mL e GLU (glufosinato de amônio10 mg/L)- 600 μ L, PPM 500 μ L; RM- (*RootingMedium*) MS 2,2g/mL; vitamina B5 (1X) 1 mL, sacarose 20 g/L;MES ou MOPS 0,64 g/L e phytaagar 7 g/L, pH 5,6, GLU (glufosinato de amônio-10mg/mL) 300 μ L, 2mL do antibiótico Meropene (12,3mg/mL), IBA (ácido indol butírico,1mg/mL) 1mL, PPM 500 μ L.

As plantas obtidas por esse processo foram transferidas para casa de vegetação para que se desenvolvessem. Posteriormente, foram coletadas amostras de tecido foliar para extração de DNA e, utilizando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), a presença do transgene foi confirmada via reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizando primers específicos para cada gene. Após a PCR, os fragmentos foram separados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e visualizados em fotoiluminador UV. Os dados adquiridos referente à proporção de plantas positivas e negativas foram arquivados no período de 2 anos, sendo posteriormente utilizados neste trabalho.

Resultados e Discussão

Os genótipos utilizados foram submetidos ao mesmo protocolo de transformação e mesmas condições ambientais. Além disso, os cassetes utilizados na transformação eram idênticos, diferindo apenas quanto ao gene de interesse, reduzindo-se assim, a influência de fatores externos na eficiência de transformação. Os transgenes avaliados no estudo representam genes que atuam sobre a tolerância à seca por vias diferentes. Os genótipos foram submetidos à transformação via *Agrobacterium tumefaciens* no período decorrente de dois anos. A média da eficiência de transformação de cada genótipo transformado foi calcula-

da considerando o número de explantes transformados e a quantidade de plantas positivas obtidas (Tabela 1). A eficiência relacionada ao gene foi analisada segundo as porcentagens estabelecidas na eficiência de transformação de cada genótipo (Tabela 2). Foi também considerado o tamanho do gene em pares de bases (pb) e a porcentagem de bases C (citosina) e G (guanina) presentes em cada gene (Figura 1A e 1B).

A cultivar BRS 283 apresentou maior eficiência de transformação para todas as construções gênicas utilizadas em comparação com as transformações utilizando a cultivar BRS 388 RR (Tabela 1). O genótipo utilizado no processo de transformação via *Agrobacterium* exerce grande influência na efetividade da transformação gênica (BACHCHU et al., 2011; DUTT et al., 2012; KHAN et al., 2012). Isso ocorre devido à variabilidade genética da soja que promove diferentes respostas à eficiência de infecção pela *Agrobacterium* e no desenvolvimento e regeneração na cultura in vitro (DROSTE et al., 2002). Diversos trabalhos têm mostrado que a regeneração de soja é genótipo-específica, sendo que a maioria das cultivares permanece recalcitrante à cultura in vitro e à transformação. Sendo assim, não existe um sistema de transformação eficiente para a maior parte das cultivares (HOFMANN et al., 2004; KO et al., 2004; SANTOS, 2012). Isto explica, em parte, a escassez de publicações relacionadas à transformação genética de cultivares comerciais de soja. A transformação genética realizada desta leguminosa apresenta baixos índices de eficiência, sendo os protocolos utilizados geralmente genótipo específico (SOMERS et al., 2003; SANTOS, 2012).

O efeito do genótipo ficou bem evidenciado nos resultados obtidos, onde a cultivar BRS 283 apresentou em geral maior eficiência de transformação em relação a cultivar BRS 388 RR (Tabela 2). Entretanto, não se deve considerar apenas o efeito do genótipo, mas cultivares que possam apresentar características importantes e de fácil transformação. O tipo de construção gênica utilizada também está interligada com o genótipo utilizado, podendo ocorrer uma interferência na eficiência

de transformação (MIYATA et al., 2011; PORTO et al., 2014). Desta forma, considerando o efeito do gene, foi observada variação entre as eficiências de transformação nas diferentes construções gênicas para ambas as cultivares (Tabela 2). No entanto, não foi possível relacionar esse efeito ao tamanho ou composição de bases CG presentes no gene. Uma hipótese a ser investigada é a relação entre a eficiência de transformação e a função do gene. A interação ocorrida entre a cultivar BRS 283 e a construção 35S; AtGols2 foi positiva, apresentando melhor eficiência de transformação (2,31%), enquanto a eficiência encontrada para o mesmo gene na cultivar BRS 388 RR foi reduzida para 0,08%. O mesmo ocorreu com as construções 35S; GmDreb2A (FL) e 35S:NFYC10, que também tiveram eficiência reduzida na cultivar BRS 388 RR. As construções gênicas 35S:GmDREB2A (CA) e 35S:AtNCED3, no entanto, apresentaram melhor eficiência para a cultivar BRS 388 RR. Sobre todos os aspectos apresentados, se evidencia uma efetividade diferente do transgene inserido para cada genótipo, onde o transgene pode estar inter-relacionado com o genótipo utilizado. Sendo assim, o protocolo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* empregado para a cultura da soja deve considerar esses aspectos para melhor otimização da eficiência de transformação.

Conclusão

A eficiência de transformação foi fortemente influenciada pelo genótipo e pela construção gênica utilizada, porém o tamanho do gene e a composição de CG do gene não parecem ter influência na eficiência de transformação. A cultivar BRS 283 apresentou maior eficiência de transformação comparada à cultivar BRS 388 RR. Entre as construções gênicas utilizadas, a que apresentou melhor eficiência foi a 35S:AtGols2.

Referências

BACHCHU, M. A. A.; JIN, S. B.; PARK, J. W.; SUN, H. J.; YUN, S. H.; LEE, H. Y.; LEE, D. S; HONG, Q. C. KIM, Y. W.; RIU, K. Z.; KIM, J. H. *Agrobacterium*-mediated transformation using embryogenic calli in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) cv. Miyagawa wase. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 170-175, 2011.

BRASILEIRO, A.C.M. Transformação mediada por *Agrobacterium* sp. In: **Métodos de transferência e análise da expressão de genes em plantas**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. Cap. 3. p. 7-22.

CHETTY, V. J.; CEBALLOS, N.; GARCIA, D.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J. ; LOPEZ, W.; OROZCO-CÁRDENAS, M. L. Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. **Plant Cell Reports**, v. 32, p. 239-247, 2013.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. **Euphytica**, v. 127, p. 367-376, 2002.

DUTT, M.; ANANTHAKRISHNAN, G.; JAROMIN, M. K.; BRLANSKY, R. H.; GROSSER, J. W. Evaluation of four phloem-specific promoters in vegetative tissues of transgenic citrus plants. **Tree Physiology**, v. 32, n. 1, p. 83-93, 2012.

DUTT, M.; GROSSER, J. W. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, n. 3, p. 331-340, 2009.

HOFMANN, N.; NELSON, R. L.; KORBAN, S. S. Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 157-163, 2004.

JONES, P. W.; CASSELLS, A. C. Criteria for decision making in crop improvement programmes: technical considerations. **Euphytica**, v. 85, p. 465-476, 1995.

KHAN, E. U.; FU, X. Z.; LIU, J. H. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants using leaf segments as explants in Valencia sweet orange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 2, p. 383-390, 2012.

KO, T. S.; NELSON, R. L.; KORBAN, S. S. Screening multiple soybean cultivars (MG 00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons. **Crop Science**, v. 44, p. 1825-1831, 2004.

MENG, L.; ZIV, M.; LEMAUX, P. G. Nature of stress and transgene locus influences transgene expression stability in barley. **Plant Molecular Biology**, v. 62, p. 15-28, 2006.

MIYATA, L. Y.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; SCARPARE FILHO J. A.; ZAMBON, F.; BASSAN, M. M.; MENDES, B. M. J.; HARAKAVA, R. Eficiência de transformação genética de citrange 'carrizo' com duas construções gênicas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, Epub Mar 11, 2011.

MORAES, T. de S. **Transformação genética de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom') e de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene Csd1 (superóxido dismutase do cobre e do zinco), isolado de *Poncirus trifoliata***. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MUNIZ, F. R.; SOUZA, A. J.; STIPP, L. C.; SCHINOR, E.; FREITAS JUNIOR, W.; HARAKAVA, R.; STACH-MACHADO, D. R.; REZENDE, J. A. M.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* with *Citrus tristeza virus* (CTV) derived sequences and reaction of transgenic lines to CTV infection. **Biologia Plantarum**, v. 56, p. 162-166, 2012.

NAM, J.; MYSORE, K. S.; ZHENG, C.; KNUE, M. K.; MATTHYSSE, A. G.; GEIVIN, S. B. Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. **Molecular & General Genetics**, v. 261, n. 3, p. 429-438, 1999.

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 Report**, v. 25, p. 206-213, 2006.

PORTO, M. S.; PINHEIRO, M. P. N.; BATISTA, V. G. L.; SANTOS, R. C. dos; FILHO, P. A. M.; LIMA, L. M. Plant promoters: an approach of structure and function. **Molecular Biotechnology**, v. 56, p. 38-39, 2014.

SANTOS, R. B. **Embriogênese somática e transformação genética de soja via biobalística**. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

SCHUBERT, D.; LECHTENBERG, B.; FORSBACH, A.; GILS, M.; BAHADUR, S.; SCHMIDT, R. Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. **Plant Cell**, v. 16, p. 2561-2572, 2004.

SOMERS, D. A.; SAMAC, D. A.; OLHOFT, P. M. Recent advances in legume transformation. **Plant Physiology**, v. 131, p. 892-899, 2003.

TINLAND, B. The integration of T-DNA into plant genomes. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 178-184, 1996.

WANG, K; HERRERA-ESTRELLA, L; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSK, P. Right 25pb terminus of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of the DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. **Cell**, v. 38, p. 455-462, 1984.

Tabela 1. Total de explantes transformados e totais de plantas positivas obtidas para cada uma das construções gênicas utilizadas nas transformações nas cultivares de soja BRS 283 e BRS 388 RR e suas respectivas médias de eficiência de transformação.

Construção	EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO					
	BRS 283	BRS 388 RR	BRS 283	BRS 388 RR	BRS 283	BRS 388 RR
	TE	TE	PP	PP	EF (%)	EF (%)
35:AtGols2	389	393	9	3	2.31	0.76
35S:GmDREB 2A (FL)	596	1308	3	2	0.50	0.15
35S:GmDREB 2A (CA)	2128	1182	5	1	0.23	0.08
35S: NFYC10	853	783	2	0	0.23	0.00
35S:AtNCED3	242	1470	0	0	0.00	0.00
35S:AtAreb FL	355	3919	0	0	0.00	0.00
TOTAL	4563	9055	19	6	3.27	0.99
MÉDIA	760.5	1509.17	3.17	1	0.55	0.17

TE: Total de explantes; PP: Plantas positivas; EF (%): Eficiência de Transformação em porcentagem).

Tabela 2. Eficiência de transformação do transgene empregado em ambos os genótipos.

EFICIÊNCIA DO TRANSGENE	
Construção	Et Média (%)
35:AtGols2	1.19
35S:GmDREB 2A (FL)	0.25
35S:GmDREB 2A (CA)	0.49
35S: NFYC10	0.11
35S: AtNCED3	0.07
35S:AtAreb FL	0

ET (%): Eficiência do transgene inserido em cada construção gênica.

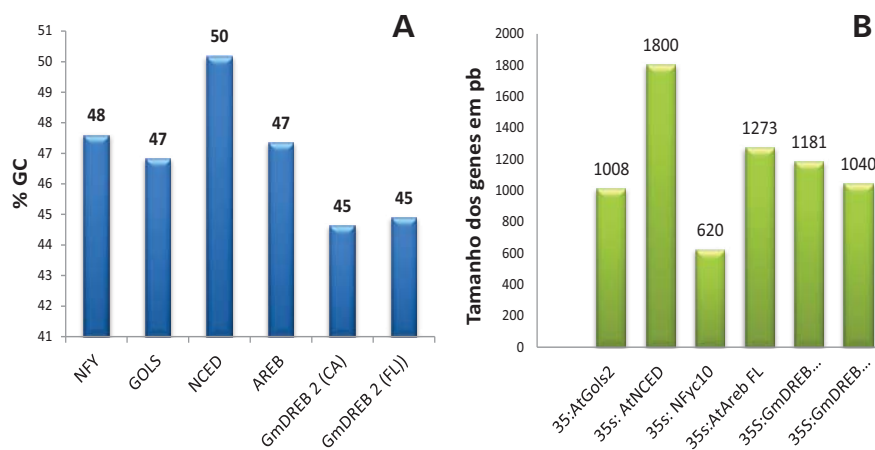


Figura 1. A) Porcentagem de bases C e G presente em cada gene. **B)** Tamanho em pares de bases da região codificadora dos genes utilizados na transformação de plantas de soja para tolerância ao déficit hídrico.

% GC: porcentagem de guanina-citosina. pb: Pares de bases.