

EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO VIA *Agrobacterium tumefaciens* E ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA

BARBOSA, D.A.¹; MOLINARI, M.D.C.¹; FUGANTI-PAGLIARINI, R.²; MARIN, S.R.R.²; CARNEIRO, E.A.³; QUEIROZ, A.A.³; MERTZ-HENNING, L.M.²; NEUMAIER, N.²; NEPOMUCENO, A.L.²

¹Universidade Estadual de Londrina (UEL), danielbarbosa238@gmail.com; ²Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass, Distrito de Warta, C.P. 231, CEP 86001-970, Londrina-PR; ³Universidade Norte do Paraná (UNOPAR)

Introdução

A soja é um importante grão comercial, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial. Utilizado em vários produtos e subprodutos da agroindústria, indústria química e de alimentos o grão é muito versátil (EMBRAPA SOJA, 2017).

A utilização da soja em diversas áreas da indústria permitiu aumento de produção e produtividade a cultura, muitas vezes obtido através de inovações genéticas, como a transgenia, que pela inserção de genes exógenos, pode facilitar o manejo da cultura, como também, melhorar o desempenho frente a estresses bióticos e abióticos (ROESSING; LAZZAROTTO, 2005), pela inserção de genes que conferem tal característica.

A produção de plantas transgênicas pode ser realizada por diferentes métodos. Um dos mais utilizados é o método indireto de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* capaz de inserir um baixo número de cópias do gene de interesse no genoma hospedeiro (CARRER et al., 2010). Espera-se que o transgene tenha sido integrado ao genoma em somente um dos dois cromossomos homólogos na primeira geração (T_0), estando assim em hemizigose. De acordo com as leis de segregação de Mendel, após o processo de autofecundação de uma planta T_0 abrigando uma única cópia do transgene (A), espera-se que na geração seguinte, T_1 25% das plantas sejam homozigotas (AA), 50% sejam heterozigotas (Aa) e 25% das plantas não contenham o gene (aa). Entretanto, este comportamento depende de uma série de fatores e, por estas razões, uma análise de segregação do transgene nas gerações subsequentes deve ser realizada. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi determinar a eficiência de transformação de três construções gênicas inseridas em soja e caracterizar molecularmente os eventos, quanto ao padrão de segregação dos mesmos na geração T_1 a

fim de selecionar os eventos homozigotos para os respectivos genes de interesse inseridos.

Material e Métodos

Foram transformados, via *Agrobacterium tumefaciens* de acordo com o protocolo de PAZ et al. (2006) com modificações, 239 explantes da cultivar convencional de soja BRS 184, 276 explantes da cultivar BRS 283 e um total de 519 explantes BRS 388RR. Foi utilizada uma construção gênica contendo gene candidato a conferir tolerância à seca. A eficiência de transformação foi calculada dividindo o número de plantas positivas obtidas pelo total de explantes utilizados nos processos de transformação.

Na geração T_1 , foram utilizadas 14 sementes provenientes do evento GM 2Oa5, 25 sementes do evento GM 2Oa4 sendo essas duas obtidas a partir dos explantes da cultivar de soja BRS 184; 13 sementes do evento GM 3Pa5, 34 sementes do evento GM 3Pa6, obtidas a partir dos explantes da cultivar de soja BRS 283; 14 sementes provenientes do evento GM 4Na2, 7 sementes provenientes do evento GM 4Na3, 26 sementes provenientes do evento GM 4Na4 e 9 sementes provenientes do evento GM 4Na5, obtidas a partir dos explantes da cultivar de soja BRS 388RR.

As sementes foram semeadas em vasos de 8L com substrato constituído de terra:areia:composto orgânico (3:2:2), em casa de vegetação. Para a realização do teste de segregação, discos foliares dos eventos na geração T_1 foram coletados, imersos em nitrogênio líquido e macerados no *shake master* para extração do DNA genômico de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Em seguida, o material foi analisado via PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) convencional utilizando pares de *primers* específicos para cada uma das construções inseridas. A reação de amplificação e a ciclagem utilizada seguiram padrões descritos na literatura. A

presença ou ausência de bandas específicas foi verificada em gel de agarose a 1% (p/v). Plantas de soja das gerações T₁ dos eventos 2Oa5, 2Oa6, 3Pa5, 3Pa6, 4Na2, 4Na3, 4Na4 e 4Na5 foram analisadas. O teste do X² (p≤0.05) foi realizado para verificar se o transgene apresentava segregação mendeliana (3:1).

Resultados e Discussão

A cultivar convencional de soja BRS 388RR (Tabela 1) apresentou a maior eficiência de transformação (2.3%) comparada às demais cultivares convencionais. Sabe-se que, a eficiência de transformação está intimamente relacionada a fatores como, o genótipo da planta, o tipo de tecido transformado, o vigor dos explantes, a estirpe da bactéria, o vetor utilizado, o sistema de seleção e as condições de cultivo (CHENG et al., 2004). Uma alternativa para melhorar a eficiência de transformação é a otimização do protocolo. Visando aumentar a frequência de eventos transformados, ajustes na manipulação da bactéria e do tecido alvo podem ser realizados (GIROTTO et al., 2012).

Os resultados do teste de segregação mostraram que para os eventos da geração T₁ (Tabela 2) seis eventos (2Oa6, 3Pa5, 3Pa6, 4Na2, 4Na4 e 4Na5) segregaram de acordo com as Leis de Mendel na proporção de 3:1, sugerindo baixo número de cópias inseridas no genoma hospedeiro. Esses eventos serão selecionados para o avanço de geração e análises complementares tais como, confirmação do número de cópias inseridas do transgene, expressão gênica relativa do transgene e sequenciamento do local de inserção no genoma hospedeiro. Dois eventos (2Oa5 e 4Na3) não segregaram na proporção esperada de 3:1 (Tabela 2), e portanto, não foram multiplicados para avanço da geração T₂.

De modo geral, padrões de segregação excepcionais ocorrem como resultado da inserção de mais de uma cópia do gene de interesse em locos distintos, com frequência de recombinação, ou ainda como consequência da intransferibilidade do transgene para as gerações sucessivas, que ocorre muitas vezes em razão do local onde o gene de interesse foi inserido no genoma da planta (YIN et al., 2004). Segundo Romano et al. (2005), os possíveis mecanismos envolvidos na eliminação de transgenes são recombinações intracromossômicas, instabilidades genéticas provenientes das manipulações da cultura de tecido,

e co-eliminação dos transgenes ativado por algum processo de defesa do genoma da planta. Sendo assim, algum desses mecanismos pode ter promovido a eliminação do transgene na progênie desses eventos.

Conclusão

A maior eficiência de transformação foi obtida para a cultivar BRS 388RR que apresentou um maior número de plantas positivas para a construção inserida.

A análise de segregação permitiu selecionar seis eventos (2Oa6, 3Pa5, 3Pa6, 4Na2, 4Na4 e 4Na5), que na geração T₁ apresentaram padrão de segregação mendeliano.

Os eventos 2Oa5 e 4Na3 não segregaram na proporção esperada, e portanto, não foram multiplicados para avanço da geração T₂.

A caracterização molecular, associada a fenotipagem sob déficit hídrico em casa de vegetação e campo, auxiliam na seleção de possíveis eventos elite com maior tolerância à seca.

Referências

- CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 149-164, 2010.
- CHENG, M.; LOWE, B. A.; SPENCER, T. M.; YE, X.; ARMSTRONG, C. L. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 31-45, 2004.
- 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.
- EMBRAPA SOJA. **Soja**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>>. Acesso em: 19 abr. 2017.
- GIROTTO, L.; SOLDERA, M. C. A.; HONNA, P. T.; KANAMORI, N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Transformação da cultivar de soja BR 16 via *Agrobacterium tumefaciens*, com a construção 35S:AREB1. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6., 2012, Cuiabá. **Soja: integração nacional e desenvolvimento sustentável: anais**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 3 p. 1 CD-ROM.

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.

ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J. Soja transgênica no Brasil: situação atual e perspectivas para os próximos anos. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 27., 2005. Cornélio Procópio. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2005. p. 31-32. (Embrapa Soja. Documentos, 257).

ROMANO, A.; VAN DER PLAS, L. H. W.; WITHOLT, B.; EGGINK, G.; MOOIBROEK, H. Expression of poly-3-(R)-hydroxyalkanoate (PHA) polymerase and acyl-CoA-transacylase in plastids of transgenic potato leads to the synthesis of a hydrophobic polymer, presumably medium-chain-length PHAs. **Planta**, v. 220, p. 45-464, 2005.

YIN, Z.; PLADER, W. E.; MALEPSZY, S. Transgene inheritance in plants. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, p. 127-144, 2004.

Tabela 1. Eficiência de transformação dos eventos GMs 2Oa5, 2Oa6, 3Pa5, 3Pa6, 4Na2, 4Na3, 4Na4 e 4Na5 em diferentes genótipos de soja (BRS 184, BRS 283 e BRS 388RR).

| Soja Convencional | Eventos | Explantes de Soja Convencional | Plantas Positivas | Eficiência de Transformação (%) |
|-------------------|---------|--------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| BRS 184 | 2Oa5 | 239 | 2 | 0,83 |
| | 2Oa6 | | | |
| BRS 283 | 3Pa5 | 276 | 2 | 0,72 |
| | 3Pa6 | | | |
| BRS 388RR | 4Na2 | 388 | 3 | 2,30 |
| | 4Na3 | | | |
| | 4Na4 | | | |
| | 4Na5 | | | |

Tabela 2. Proporção de segregação dos diferentes transgenes na geração T₁ dos eventos GMs obtidos com construções diversas.

| | Total de Plantas (T1) | Positivas (F0) | Negativas | Fe | Proporção da Segregação | X ² | P(%) |
|------|-----------------------|----------------|-----------|-------|-------------------------|----------------|------|
| 2Oa5 | 14 | 6 | 8 | 10,5 | 0 | 7,714 | S |
| 2Oa6 | 25 | 16 | 9 | 18,75 | 3:1 | 1,613 | NS |
| 3Pa5 | 13 | 8 | 5 | 9,75 | 3:1 | 1,256 | NS |
| 3Pa6 | 34 | 25 | 9 | 25,5 | 3:1 | 0,039 | NS |
| 4Na2 | 13 | 10 | 3 | 9,5 | 3:1 | 0,078 | NS |
| 4Na3 | 7 | 3 | 4 | 5,25 | 0 | 3,857 | S |
| 4Na4 | 25 | 22 | 3 | 18,75 | 3:1 | 2,253 | NS |
| 4Na5 | 9 | 7 | 2 | 6,75 | 3:1 | 0,037 | NS |

Fo = Frequência observada; Fe = Frequência esperada; $\chi^2 = (Fo - Fe)^2 / Fe$; NS = Não Significativo; S = significativo; *G=N-1=1
*Tabela do $\chi^2=3,84$.