



TRANSFORMAÇÃO DA CULTIVAR DE SOJA BR16 VIA *Agrobacterium tumefaciens*, COM A CONSTRUÇÃO 35S:AREB1

Agrobacterium-MEDIATED TRANSFORMATION OF SOYBEAN CULTIVAR, BR16, GENE
35S:AREB1

GIROTTI, L.¹; SOLDERA, M.C.A.¹; HONNA, P. T.²; KANAMORI, N.³; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.⁴; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.³; NEPOMUCENO, A.L.⁵.

¹ Técnica JICA (*Japanese International Corporation Agency*), Embrapa Soja, Londrina, PR. e-mail: larissagirotto@yahoo.com.br

² Bolsista PIBIC-CNPq, Embrapa Soja, Londrina, PR;

³ Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), Tsukuba, Japan.

⁴ Embrapa Soja, Londrina-PR.

⁵ US LABEX Plant Biotechnology - SRI - EMBRAPA - MAPA – BRAZIL, Albany, CA, USA.

Resumo

A seca é, atualmente, um importante fator responsável por perdas na produção brasileira de soja. A busca por cultivares adaptadas a esta condição pode ser realizada através do melhoramento genético, pela inserção de genes por diferentes métodos de transformação de plantas, entre outros. Sucessos obtidos com a transformação de *Arabidopsis thaliana* com gene AREB1 evidenciou importantes respostas das plantas à seca e a alta salinidade. Visando a obtenção de genótipos de soja geneticamente modificada para tolerância à seca e a alta salinidade, este trabalho teve como objetivo inserir a construção 35S:AREB1 em cultivares de soja BR 16 pela técnica de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Neste trabalho foram transformados 8731 embriões imaturos, dos quais 2138 foram testados via PCR, confirmando a presença do gene AREB1 inserido no genoma de 15 eventos. Após a multiplicação das sementes destes eventos, estudos serão realizados para confirmar a transmissão do transgene para as plantas T1.

Introdução

A soja é a fonte mais importante de óleo vegetal e proteína para a dieta humana e animal no mundo. A frequência da ocorrência de períodos de seca tem aumentado significativamente na última década, provavelmente associados às mudanças climáticas ocorridas devido ao aquecimento do planeta. Com isso, pesquisadores buscam por muito tempo melhorar e otimizar as características da cultura. Várias estratégias podem ser utilizadas para reduzir as perdas causadas pela seca, que vão desde o manejo adequado do solo e da lavoura, até o uso de irrigação. Outra possibilidade é o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas às condições de déficit hídrico e, neste aspecto, a biotecnologia tornou-se uma importante ferramenta no desenvolvimento de variedades adaptadas a diferentes condições de estresses bióticos e abióticos.

A soja geneticamente modificada pode ser transformada pela transferência direta de genes utilizando o bombardeamento de partículas (Biobalística), o qual insere várias cópias do transgene no genoma do hospedeiro, podendo causar a inserção de fragmentos do transgene, resultando na desativação de genes por silenciamento. Por outro lado, as plantas transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* geralmente apresentam baixo número de cópias do transgene. A transformação por este método facilita a expressão estável de um gene de interesse e permite uma fixação rápida do gene em plantas transgênicas.

Atualmente, estudos moleculares de regulação gênica em plantas submetidas ao déficit hídrico têm identificado genes que respondem à desidratação. Dentre os genes identificados, verificou-se a presença de famílias de genes que codificam fatores de transcrição ABA (Ácido abscísico) dependentes, denominados AREB (Abscisic Acid-responsive Element Binding

Protein1), MYC (myelocytomatosis), MYB (myeloblastosis) e ABA independentes, denominados DREB (*Dehydration Responsive Element Binding protein*) e NAC HD-ZIP (NAM, ATAF1/2, CUC2) (Shinozaki e Yamaguchi - Shinozaki, 2000).

O AREB é um importante fator de transcrição sinalizado pelo ABA, que atua na resposta de regulação da expressão de outros genes que estão envolvidos na tolerância à seca e alta salinidade (Fujita et al., 2005). Assim sendo, este trabalho teve como objetivo introduzir via *Agrobacterium tumefaciens* a construção 35S:AREB1 na cultivar de soja, BR 16, visando a geração de plantas geneticamente modificadas com níveis maiores de tolerância à seca e a alta salinidade.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, em Londrina – PR. O processo de transformação foi realizado segundo Kanamori et al., 2011, com modificações. A estirpe de *Agrobacterium* EHA105 contendo o vetor plasmidial pC3300J (Cambia Enabling Innovation, 2012), com o gene de seleção *bar* (*phosphinothricin acetyl transferase*) sob controle do promotor 35S (*Cauliflower Mosaic Virus*) e o gene AREB1 (35S:AREB1) foram usados para infecção.

Os explantes utilizados para transformação das plantas foram embriões imaturos da cultivar de soja BR 16. As sementes foram esterilizadas em etanol 70% e hipoclorito de sódio 1%, plaqueadas em meio de germinação e armazenadas a 25°C overnight. Os embriões retirados das sementes foram incubados em temperatura ambiente, no escuro, em meio líquido de infecção na presença da *Agrobacterium* (OD₆₀₀ 0,7-0,8). Após 30 minutos, os explantes foram transferidos para meio sólido e cultivados em câmara de crescimento (22°C/ escuro), por 5 dias. Posteriormente, os explantes foram lavados com antibiótico e transferidos para o meio de regeneração (28°C/ 16h fotoperíodo) e seleção (2mg/L Glufosinato de amônio). Amostras de DNA das plantas selecionadas foram submetidas a amplificação por PCR (*Polymerase chain reaction*), utilizando *primers* específicos para a detecção do gene AREB1.

Resultados e Discussão

O número total de explantes de soja transformados via *Agrobacterium* contendo a construção 35S:AREB1 foram de 8731 embriões. O gene *bar* presente na construção 35S:AREB1 é responsável por conferir tolerância ao glufosinato de amônio às plantas transformadas, uma vez que a soja é sensível a este herbicida (Sato et al., 2007). Dos explantes transformados, 2138 plantas foram selecionadas através do herbicida (Figura 1A), aclimatadas em substrato (Figura 1B) e testadas via PCR. A amplificação feita por *primers* específicos detectaram a presença do gene AREB1 em 15 diferentes eventos, 7 estão representados na Figura 1C. Após a confirmação do resultado, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação (Figura 1D), onde se desenvolveram até o estágio de maturação fisiológica. Até o momento o processo de transformação utilizando a cultura de embriões imaturos, da cultivar de soja BR 16 com a construção 35S:AREB1 via *Agrobacterium*, apresentou uma eficiência de transformação de 0,17%. Segundo Andrade (2003), a eficiência da transferência via *Agrobacterium* varia drasticamente para diferentes espécies vegetais, cultivares e tecidos. É freqüente obter cultura de células *in vitro* com alta capacidade de transformação, porém elas não são competentes, isto é, não são capazes de regenerar novas plantas. A otimização do processo de eficiência, para aumentar a frequência de eventos transformados, pode ser feito através de ajustes na manipulação da bactéria e do tecido alvo.

Atualmente o trabalho está em fase de teste das sementes T1. Considerando a complexidade do mecanismo de resposta ao déficit hídrico ocasionado por seca, que pode variar de acordo com a intensidade e tempo de estresse, análises mais precisas em níveis moleculares, fisiológicos e agrônômicos serão necessárias posteriormente para avaliar a eficiência da presença do gene nas plantas transformadas.

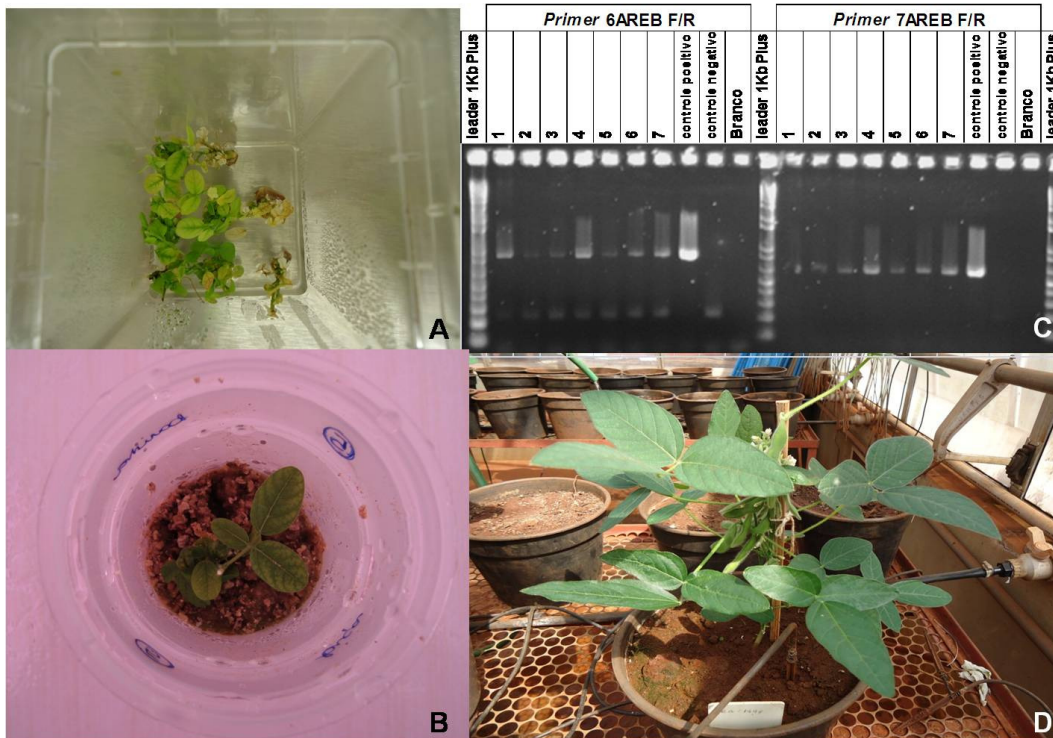


Figura 1. Etapas do processo de identificação das plantas positivas. **(A)** Plantas em meio de seleção (MS + glufosinato de amônio). **(B)** Aclimação das plantas em substrato para posterior transferência em casa de vegetação. **(C)** Perfil dos PCRs com os *primers* específicos (6AREB e 7AREB) em gel de agarose 1,2%. **(D)** Evento positivo na casa de vegetação.

Referências

ANDRADE, S.R.M. **Transformação de plantas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003.

CAMBIA ENABLING INNOVATION. <<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html>>. Acessado em 26 de março de 2012.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATOH, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M.M.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. **AREB1 is a transcription activator of novel ABRE dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis**. *The Plant Cell* 17, p. 3470–3488, 2005.

KANAMORI, N., GIROTTO, L.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A.L. **Agrobacterium-mediated transformation of Brazilian soybean variety, BR16**. JIRCAS Working Report 71, p. 75-79, 2011.

SATO, H.; YAMADA, T.; KITA, Y.; ISHIMOTO, M.; KITAMURA, K. **Production of transgenic plants and their early seed set in Japanese soybean variety, Karyutaka**. *Plant Biotech.* 24, p. 533-536, 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. **Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and crosstalk between two stress signaling pathways**. - *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, p. 217-223, 2000.