

EXPRESSÃO DO GENE DA OSMOTINA DE *Solanum nigrum* EM CULTIVAR ELITE DE SOJA OBTIDA A PARTIR DO SISTEMA DE TRANSFORMAÇÃO QUE INTEGRA BOMBARDEAMENTO/*Agrobacterium*

EXPRESSION OF THE *Solanum nigrum* OSMOTIN GENE IN SOYBEAN ELITE CULTIVAR OBTAINED FROM THE BOMBARDMENT/*Agrobacterium* TRANSFORMATION SYSTEM

WIEBKE-STROHM, B¹; BÜCKER-NETO, L.¹; ALVES, LB¹; BENCKE, M¹; PASQUALI, G²; DROSTE, A.³; GROSSI de SÁ, M.F.⁴; WEBER, R.L.M.¹; PASSAGLIA, L.P.¹; BODANESE-ZANETTINI, MH¹.

¹Depo. Genética, Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, BR; ²Centro de Biotecnologia, UFRGS; ³Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale; ⁴EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; e-mail: strohm@sinos.net.

Apoio financeiro: CNPq, FAPERGS, EMBRAPA.

Resumo

O presente estudo tem por objetivo a transformação da soja pelo sistema que integra bombardeamento/*Agrobacterium* para expressão de uma osmotina de *Solanum nigrum* var. *americanum*. Embriões somáticos secundários foram submetidos à transformação pelo sistema integrado utilizando o vetor pCAMBIA1390-UBQ-*SnOLP*. Foram obtidos três pontos verdes higromicina-resistentes e duas plantas da cultivar elite Vencedora foram regeneradas. Análises por PCR confirmaram a integração estável dos transgenes nas plantas. Ambas produziram flores e sementes. A presença dos transgenes foi detectada na descendência de apenas uma das plantas-mãe, obedecendo ao padrão Mendeliano dominante de 3:1. Análises por qRT-PCR, confirmaram a expressão da osmotina de *S. nigrum* nas plantas T1. Este é o primeiro estudo demonstrando que o sistema “bombardeamento/*Agrobacterium*” permite a transformação, regeneração e expressão de um gene de interesse em plantas de uma cultivar elite de soja.

Palavras-chave: *Agrobacterium*, doenças fúngicas, *Glycine max*, osmotina, PR-5, transformação genética.

Introdução

As doenças causadas por fungos são fatores limitantes para o aumento da produtividade da soja. O número limitado ou a inexistência de cultivares de soja com resistência a fungos, bem como a quebra da resistência devido à rápida evolução do patógeno, têm sido desafios para o melhoramento convencional. A transformação genética é uma alternativa para a obtenção de plantas com expressão constitutiva de altos níveis de proteínas ou compostos capazes de limitar o desenvolvimento de fungos.

As proteínas relacionadas à patogênese (PR) estão envolvidas tanto na resposta de hipersensibilidade quanto na sistêmica. As osmotinas pertencem à família das PR-5, são expressas em resposta a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos e prejudicam o desenvolvimento do patógeno, permeabilizando suas membranas celulares e impedindo a manutenção do gradiente de pH. Os genes de duas isoformas da osmotina, *SnOLP* e *SniOLP*, foram isolados a partir de *S. nigrum* var. *americanum* e, *in vitro*, suas proteínas apresentaram atividade anti-oomiceto e antifúngica (Campos *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2008). O objetivo do presente estudo é a transformação da soja pelo sistema que integra bombardeamento/*Agrobacterium* para a expressão de uma das isoformas de osmotina de *S. nigrum*, visando melhorar os mecanismos de defesa das plantas.

O sistema que integra bombardeamento/*Agrobacterium* foi adaptado para transformação de embriões somáticos secundários de soja em nosso laboratório (Droste *et al.*, 2000; Wiebke *et al.*, 2006). As vantagens deste sistema são (i) a regeneração de plantas completamente transformadas; (ii) a obtenção de várias plantas a partir de um único evento de transformação; (iii) a abertura de microferimentos nas células, permitindo a infecção; (iv) a introdução de um menor número de cópias dos transgenes no genoma vegetal com menor fragmentação; e (v) a aplicação do sistema a genótipos recomendados para plantio no Brasil.

Material e métodos

O vetor utilizado na transformação das plantas foi o pCAMBIA1390-UBQ3-*SnOLP*, que contém o gene marcador de resistência à higromicina (*hpt II*), regulado pelo promotor e terminador CaMV 35S, e o gene da osmotina (*SnOLP*) de *S. nigrum*, sob controle do promotor da ubiquitina-3 de *Arabidopsis thaliana* e do terminador do gene da nopaline synthase (*nos*).

Embriões somáticos da cultivar elite BRSMG 68 Vencedora e da modelo para transformação IAS5 foram obtidos a partir de cotilédones imaturos e proliferados por 6 meses. Embriões somáticos secundários foram submetidos à transformação pelo sistema que integra bombardeamento/*Agrobacterium*. A linhagem LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizada nas transformações. O número inicial de conjuntos embriogênicos do experimento pode ser observado na Tabela 1. Após a transformação, o material vegetal foi transferido para meio de seleção em higromicina. Os tecidos verdes, proliferantes, higromicina-resistentes foram separados e transferidos para novo meio para permitir a histodiferenciação dos embriões e sua conversão em plantas.

A presença dos transgenes (*SnOLP* e *hpt*) nas plantas regeneradas (T0) foi confirmada por PCR. As sementes obtidas a partir das plantas T0 foram semeadas, em contenção, para obtenção das plantas T1. DNA e RNA extraídos a partir destas plantas foram analisados por PCR e qRT-PCR, respectivamente.

O teste Qui-quadrado (χ^2) foi aplicado para plantas da geração T1 para confirmar se a segregação observada neste estudo estava de acordo com a frequência Mendeliana esperada (3:1), ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos a partir do experimento de transformação podem ser observados na Tabela 1. Duas plantas da cultivar elite BRSMG 68 Vencedora foram recuperadas com sucesso a partir de um único ponto verde, higromicina-resistente, indicando que as plantas pertencem ao mesmo evento de transformação.

Tabela 1. Número de conjuntos verdes higromicina-resistentes, de embriões histodiferenciados e plantas obtidas a partir da transformação com o gene da osmotina de *S. nigrum* via sistema que integra bombardeamento/*Agrobacterium*

	BRSMG 68 Vencedora	IAS5
Número de conjuntos embriogênicos submetidos à transformação	80	100
Número de conjuntos verdes higromicina-resistentes	1	2
Número de embriões histodiferenciados	96	18
Número de embriões regenerados (raiz e folha)*	8 (11,2%)	0
Número de plantas adultas*	2 (2,1%)	0

*A porcentagem corresponde à razão entre o total de embriões regenerados (ou plantas) e o total de embriões histodiferenciados.

O DNA extraído das folhas das duas plantas foi analisado por PCR para confirmar a integração estável dos transgenes no genoma vegetal. As duas amostras apresentaram os fragmentos de tamanho esperados de 500 pb de *hpt II* e 744 pb de *SnOLP*.

As plantas T0 foram capazes de produzir flores e sementes, que foram semeadas para obtenção das plantas da geração T1. Novamente, análises por PCR foram utilizadas para confirmar a presença dos transgenes no genoma da progênie e para avaliar sua segregação. Os dados referentes à obtenção das plantas T1 e segregação dos transgenes estão representados na Tabela 2. A presença dos transgenes foi detectada na descendência de apenas uma das plantas-mãe. De acordo com o teste estatístico do χ^2 , a frequência observada para a progênie da planta G está de acordo com o padrão de herança Mendeliana esperado para um locus dominante (3:1; transgênicas:não-transgênicas). Estes resultados sugerem a integração de uma cópia única do T-DNA no genoma da planta. Análises moleculares complementares confirmam esta hipótese. Para a segunda planta, toda a progênie foi PCR negativa, o que pode ser conseqüência do pequeno número de sementes e plantas ou de taxas de segregação excepcionais.

Tabela 2. Plantas T1 obtidas a partir da autofecundação de plantas T0 e a segregação do gene *SnOLP*

	Plantas T0	
	P	G
Número de sementes	6	70
Número de plantas T1 adultas	3	20
Número de plantas T1 PCR positivas	0	12
Número de plantas T1 PCR negativas	3	8
Freqüência observada	0:3	3:2

Até o momento, análises por qRT-PCR foram conduzidas para quatro plantas da geração T1 e a expressão da osmotina em nível de mRNA foi confirmada, como ilustra a Figura 1. A planta selvagem apresentou uma expressão basal de osmotina, que foi considerada com valor igual a 1. Todas as plantas PCR positivas para *SnOLP* e *hpt* mostraram níveis de mRNA superiores ao observado para a planta selvagem. Testes complementares serão realizados com outros genes referência. Testes *in vitro* e *in vivo* serão também conduzidos para comprovar a capacidade de resistência das plantas a fungos fitopatogênicos.

Este é o primeiro relato de expressão de um gene de interesse em plantas da cultivar elite de soja BRSMG 68 Vencedora e o primeiro estudo com o sistema de transformação que integra bombardeamento/*Agrobacterium*, comprovando a obtenção de plantas transgênicas férteis expressando um gene de interesse.

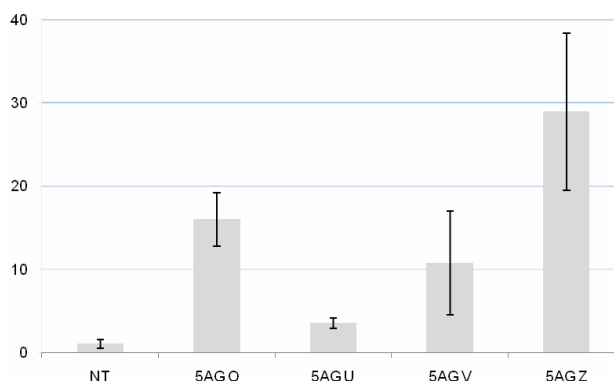


Figura 1. Análise de expressão em nível de mRNA da osmotina de *S. nigrum* em plantas transgênicas de soja por qRT-PCR. Gene referência: CYP.

Referências

- CAMPOS, M.A.; RIBEIRO, S.G.; RIDGEN, D.J.; MONTE, D.C.; GROSSI de SÁ, M.F. Putative pathogenesis-related genes within *Solanum nigrum* var. *americanum* genome: isolation of two genes coding for PR5-like proteins, phylogenetic and sequence analysis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, p. 205-216, 2002.
- CAMPOS, M.A.; SILVA, M.S.; MAGALHÃES, C.P.; RIBEIRO, S.G.; SARTO, R.P.D.; VIERA, E.A.; GROSSI de SÁ, M.F. Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, 2008.
- DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Integrated bombardment and *Agrobacterium* transformation system: an alternative method for soybean transformation. **Plant Molecular Biology Report**, v. 18, p. 51-59, 2000.
- WIEBKE, B.; FERREIRA, F.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; DROSTE, A. Influence of antibiotics on embryogenic tissue and *Agrobacterium tumefaciens* suppression in soybean genetic transformation. **Bragantia**, v. 65, p. 543-551, 2006.