

# **Análise da segregação da progênie de plantas de soja transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* para tolerância a seca**

MATSUO, D. T.<sup>1</sup>; MARIN, S.R.R.<sup>2</sup>; SILVEIRA, C.A<sup>2</sup>; FUGANTI-PAGLIARINI, R.<sup>2</sup>; NEPOMUCENO, A. L.<sup>3</sup>;

<sup>1</sup>Universidade Norte do Paraná- Bolsista CNPq/PIBIC, Embrapa Soja, Londrina, Paraná. <sup>2</sup>Embrapa Soja, Londrina, Paraná. <sup>3</sup>Pesquisador, Embrapa Soja, Londrina, Paraná.

## **Introdução**

Com o desenvolvimento da engenharia genética, muitos genes relacionados com estresses abióticos como tolerância a seca, salinidade, calor e com estresses bióticos, como resistência a doenças, além de outras características de interesse agrônômico têm sido incorporados em plantas de interesse econômico como a soja. Esses genes podem ser isolados de outras plantas, microrganismos ou animais (Visarada et al., 2009). As plantas transgênicas obtidas pelo método indireto de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* geralmente apresentam baixo número de cópias do transgene, fato vantajoso para o desenvolvimento de eventos elite a serem repassados

ao programa de melhoramento, para introgressão da característica em cultivares comerciais.

Quando uma planta é transformada com um gene de interesse, o transgene é integrado no genoma em somente um dos dois cromossomos homólogos na primeira geração ( $T_0$ ), neste caso o transgene está em hemizigose. De acordo com as leis de segregação de Mendel, após autofecundação de uma planta  $T_0$  abrigando uma única cópia do transgene (A), são esperados na geração  $T_1$  que 25% das plantas sejam homozigotos (AA), 50% sejam heterozigotas (Aa) e 25% das plantas não contenham o gene. Sendo assim, após a obtenção das plantas transgênicas, faz-se necessária a caracterização molecular dos eventos quanto ao número de cópias inseridas, estudo de herança e a análise da expressão gênica, uma vez que o local de integração e quantidade de cópias inseridas do transgene pode influenciar, positivamente ou negativamente, na resposta da planta.

É importante verificar se a segregação do transgene ao longo das gerações segue as leis de segregação de Mendel com resultado esperado de 3:1, indicando que, provavelmente, a planta transformada contenha apenas uma cópia do transgene. Assim, para a descendência  $T_1$  pode-se inferir o número de cópias de acordo com sua zigosidade. Entretanto, esse dado só pode ser confirmado com a análise da geração  $T_2$  observando se a prole é toda homozigota pela presença do transgene. Cabe ressaltar que a inserção de múltiplas cópias do transgene pode levar à desarranjos cromossômicos no genoma, silenciamento gênico e outros efeitos que dificultam a interpretação da real interação entre os produtos gênicos (MENG et al., 2006; SCHUBERT et al., 2004).

A transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, auxilia no desenvolvimento de estratégias visando à obtenção de cultivares de soja mais tolerante ao déficit hídrico, uma vez que alguns pontos como a herança poligênica da característica e a baixa variabilidade genética da cultura dificultam o uso do melhoramento genético da soja e de suas técnicas clássicas. Assim, o presente trabalho objetivou

analisar a segregação da progênie de plantas de soja transformadas com transgene para tolerância à seca por meio de infecção de *Agrobacterium tumefaciens*.

## Material e métodos

Foram utilizados sementes T<sub>1</sub> de 5 eventos GMs diferentes, transformados para tolerância a seca via infecção de *Agrobacterium tumefaciens*. Foram analisadas 13 sementes do evento 1, 58 sementes do evento 2, 52 sementes do evento 3, 41 sementes do evento 4 e 37 sementes do evento 5.

As sementes foram semeadas em vasos de 8L com substrato constituído de terra:areia:composto orgânico (3:2:2), em casa de vegetação. Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento vegetativo V2-V3, uma amostra de folhas jovens na região apical da planta foi coletada. As amostras foram pulverizadas em shake master na presença de nitrogênio líquido e o DNA genômico extraído de acordo com o protocolo descrito por DOYLE & DOYLE, (1987). A qualidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transluminador UV (Loccus Biotecnologia modelo LPIX). O DNA foi analisado via PCR convencional para confirmação da presença do inserto.

Para identificação do transgene, as amostras foram submetidas a um PCR convencional utilizando um par de *primers* específico para a região codante do gene de interesse (5´ ATGAACTCATTTTCTGCTTTTTCTG3´ e 5´TTAATAACTCCATAACGATACGTCG3´) com produto de amplificação de 649pb. A reação foi realizada em volume de 25µL, composta de 5µM de cada primer F e R, 0,4mM de dNTP's, 2 mM cloreto de magnésio, 1U de Taq DNA polimerase e 60 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador modelo Veriti Applied Biosystems e a ciclagem utilizada foi composta por desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg e 72°C por 7 min. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo e visualizados em transluminador

UV (Loccus Biotecnologia modelo LPIX). A análise da segregação foi feita identificando a presença ou ausência de bandas específicas no gel de agarose. O teste do  $\chi^2$  ( $p \leq 0.05$ ) foi realizado para verificar se o transgene apresentava segregação mendeliana.

## Resultados e discussão

Dos cinco eventos T<sub>1</sub> avaliados, dois (eventos 1 e 3) apresentaram amplificação da progênie (Figura 1) e segregaram de acordo com as Leis de Mendel, apresentando segregação de 3:1 (Tabela 1). Supõe-se, considerando a segregação mendeliana de 3:1 e o método de *Agrobacterium tumefaciens* utilizado para obtenção dos eventos, que geralmente insere baixo número de cópias, que foi inserido apenas uma cópia do transgene no genoma desses dois eventos. Contudo, é necessária a avaliação da geração T<sub>2</sub> para confirmação desse dado. Três eventos (2, 4 e 5) não transmitiram o transgene para sua descendência. De acordo com Romano e colaboradores (2005) os possíveis mecanismos envolvidos na eliminação de transgenes são recombinações intracromossomais, instabilidades genéticas provenientes das manipulações da cultura de tecido, e co-eliminação dos transgenes ativado por algum processo de defesa do genoma da planta. Assim algum desses mecanismos pode ter promovido à eliminação do transgene na progênie desses eventos.

## Conclusão

A análise de segregação permitiu selecionar dois eventos (1 e 3) que na geração T<sub>1</sub> se comportaram de acordo com as Leis de Segregação de Mendel, possibilitando o avanço de geração nesses eventos para análises complementares para confirmação do número de inserção, expressão gênica relativa para avaliação do efeito do transgene e posição de inserção para posterior seleção de um evento “elite”. Os eventos 2, 4, 5 não apresentaram a presença do transgene na geração T<sub>1</sub> e foram descartados.

## Referências

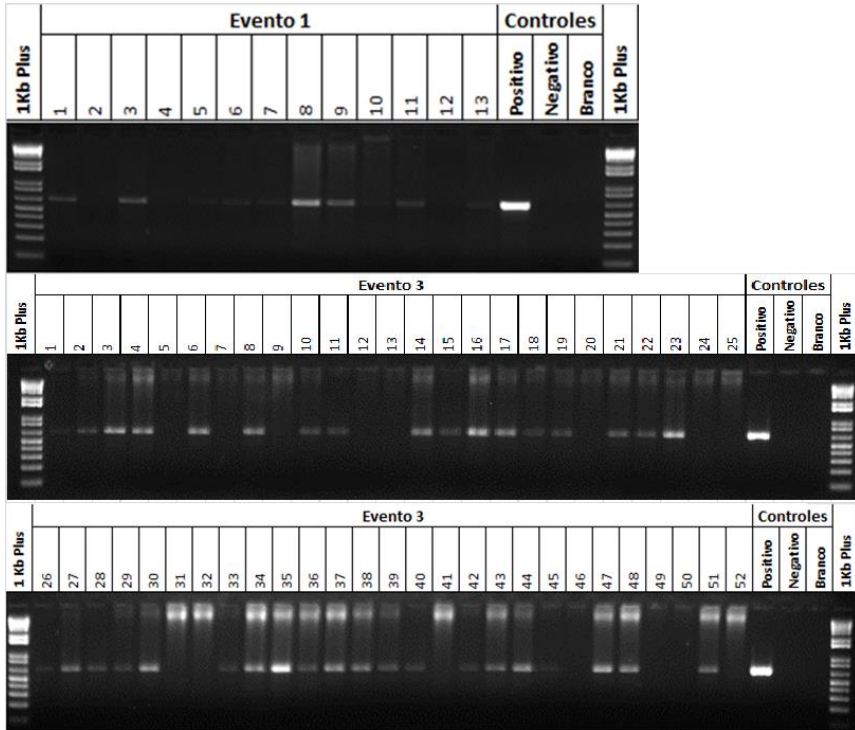
DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bull**, v.19, p.11-15, 1987.

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.

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.

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.

VISARADA, K. B. R. S.; MEENA, K.; ARUNA, C.; SRUJANA, S.; SAIKISHORE, N.; SEETHARAMA, N. Transgenic breeding: Perspectives and prospects. **Crop Science**, v. 49, n. 5, p. 1555-1563, 2009.



**Figura 1.** PCR convencional realizado com *primers* específicos para a região codante do transgene em plantas de soja transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* para seleção de eventos positivos. Produto de amplificação esperado de 649pb.

**Tabela 1.** Proporção da segregação do transgene na geração T<sub>1</sub> dos cinco eventos GMs obtidos com a construção específica para tolerância à seca.

	Total de plantas T <sub>1</sub>	Positivas (Fo)	Negativas	Fe	Proporção da segregação	$\chi^2$	P(%)
Evento 1	13	10	3	9,75	3:1	0,00641	NS
Evento 2	58	0	58	43,5	0	43,5	S
Evento 3	52	38	14	39	3:1	0,025641	NS
Evento 4	41	0	41	30,75	0	30,75	S
Evento 5	37	0	37	27,75	0	27,75	S

**Legenda.** Fo = Frequência observada; Fe = Frequência esperada;  $\chi^2 = (Fo-Fe)^2/Fe$ ; NS = Não Significativo; S = Significativo.