

TESTE DE SELEÇÃO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS COM O HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMÔNIO

BARBOSA, D.A.¹; MOLINARI, M.D.C.¹; FUGANTI-PAGLIARINI, R.²; MARIN, S.R.R.²; CARANHATO, A.L.H.¹; 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

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, atrás apenas dos EUA. Na safra 2016/2017, a produção brasileira alcançou 33,85 milhões de hectares, com uma expectativa de produção de 113,01 milhões de toneladas (CONAB, 2017). Apesar dos números positivos, a cultura, como qualquer outra enfrenta problemas relacionados à escassez ou excesso de nutrientes, solo, clima, pragas e insetos, doenças, entre vários outros desafios ambientais de ordem biótica e abiótica.

A biotecnologia pode contribuir para solucionar alguns dos principais problemas que afetam o potencial produtivo da soja. O desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGM) é uma alternativa, no entanto, a eficiência da metodologia depende da utilização de um sistema de marcador/ agente seletivo que auxilie na seleção positiva de células transformadas (SOUZA JUNIOR et al., 2001). Esses genes marcadores podem ser cotransferidos (transformados) juntamente com outros genes que irão conferir características agrônomicas de interesse. Usualmente, genes marcadores/seleção são de antibióticos ou de herbicidas. Um dos genes utilizados para este propósito é o gene *bar* ou *pat* [isolados respectivamente de *Streptomyces hygroscopicus* (THOMPSON et al., 1987), e *S. viridochromogenes* (WOHLLEBEN et al., 1988)], que conferem resistência ao glufosinato de amônio, um herbicida de uso comercial, de amplo espectro de ação e alta eficiência (NANDULA et al., 2007; FRANCO et al., 2012).

Os programas de melhoramento genético têm utilizado junto ao cassete de transformação que contém o gene de interesse, agentes de seleção, uma vez que, estes facilitam a identificação das células transgênicas, além de permitir monitorá-las e selecionar a progênie de interesse. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi otimizar um sistema de seleção

de plantas GMs por meio da pulverização do glufosinato de amônio em plantas transformadas, em casa de vegetação. A seleção positiva da resistência pressupõe a seleção do gene de interesse, inserido juntamente com o agente seletivo.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, nas instalações da Embrapa Soja. Sementes de dois eventos GMs, obtidos independentemente e com a mesma construção gênica, e da cultivar convencional de soja BRS 184 (*background* genético das transgênicas) foram germinadas em papel Germitest® umedecidos. A construção inserida nos eventos GMs contém como gene marcador de seleção o gene *bar*, que codifica a enzima fosfinotricina acetil transferase que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio.

Quatro dias após a germinação, as sementes foram transferidas para vasos de 1L preenchidos com terra:areia:composto orgânico (3:2:2). Um total de 16 plantas por evento GM e das plantas controle foram amostradas. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura programada a 28±2°C. Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento V4, o herbicida glufosinato de amônio foi aplicado por pulverização, em concentração de campo de 1500 l.ha⁻¹ FINALE™ (200g ingrediente ativo por litro de glufosinato de amônio). Sete dias após a aplicação, as plantas foram avaliadas quanto à resistência ao herbicida, sendo consideradas plantas positivas para o gene de interesse, as plantas que sobreviveram à aplicação.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos mostraram que para o evento GM01 de soja (Figura 1A), nenhuma das plantas amostradas sobreviveu à aplicação

do herbicida. Já para o evento GM02 (Figura 1B) sete plantas (43,75%) sobreviveram à aplicação do herbicida. As plantas da cultivar convencional BRS 184 (planta controle) não sobreviveram à aplicação do glufosinato de amônio (Figura 1C). A utilização deste herbicida por pulverização também vem sendo muito empregada a fim de facilitar a seleção em casa de vegetação. Várias culturas já apresentam o gene *bar* incluído no cassete de transformação como agente de seleção ou até mesmo plantas GMs de maracujá (MARTINEZ et al., 2005), milho (VIDIGAL et al., 2014) e soja (HONNA, 2016; MOLINARI, 2016) já foram selecionadas por esta metodologia.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem uma baixa expressão do gene *bar* nas plantas geneticamente modificadas, uma vez que, a confirmação da presença do gene *bar* e do gene de interesse no genoma foi realizada via PCR convencional em ambos os eventos GMs, confirmando a inserção. No entanto, a expressão do transgene e do gene de seleção depende de outros fatores, inerente ao genótipo, à construção, e ao local de inserção no genoma. Assim como os dados obtidos aqui, Lopes (2016), ao transformar tabaco utilizando o gene *bar* como agente de seleção presente no cassete de transformação, também identificou uma expressão variável entre os eventos GMs. Os níveis de expressão gênica estão usualmente relacionados, principalmente ao local de integração do transgene no genoma vegetal (JOYCE et al. 2014), que pode ser em regiões promotoras de genes transcricionalmente ativos (BOURRAS et al., 2015) ou não, bem como em diferentes regiões do genoma que possam apresentar baixos níveis de transcrição (GELVIN; KIM, 2007), e também ao número de cópias inseridas, resultando em variações nos níveis de expressão ou até mesmo no silenciamento da expressão gênica, e com isso respostas variáveis de tolerância ao glufosinato de amônio são observadas.

Conclusão

Neste trabalho, devido à baixa expressão do transgene, a aplicação do herbicida apresentou baixa seleção de plantas transformadas.

Este método de avaliação se mostrou eficaz para identificação das plantas em que a expressão do transgene é alta.

Referências

BOURRAS, S.; ROUXEL, T.; MEYER, M. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: How a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. **Phytopathology**, v.105, n.10, p.1288-1301, 2015.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, v. 4, Safra 2016/17, n. 8, oitavo levantamento, maio 2017. 144p. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_11_14_23_14_boletim_graos_maio_2017.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2017.

FRANCO, D.A.S.; ALMEIDA, S.D.B.; CERDEIRA, A.L.; DUKE, S.O.; MORAES, R.M.; LACERDA, A.L.S.; MATALLO, M.B. Avaliação do uso de glyphosate em soja geneticamente modificada e sua relação com o ácido chiquímico. **Planta Daninha**, v. 30, n. 3, p. 659-666, 2012.

GELVIN, S. B.; KIM, S. I. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica e Biophysica Acta**, v. 1769, p. 410-421, 2007.

HONNA, P. T. **Obtenção e caracterização molecular e fisiológica de plantas de soja contendo o Gene *AtGo/S2* sob déficit hídrico**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

JOYCE, P.; HERMANN, S.; O'CONNELL, A.; DINH, Q.; SHUMBE, L.; LAKSHMANAN, P. Field performance of transgenic sugarcane produced using *Agrobacterium* and biolistics methods. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 411-424, 2014.

LOPES, S. da S. **Análise funcional do gene *Pstol1* de arroz e de seus homólogos em milho e sorgo em plantas transgênicas de tabaco**. 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas.

MARTINEZ, C. O.; SANTEN, M. van; AYUB, R. A.; CORTEZ, M. G. Glifosato e glufosinato como genes seletivos para transformação genética de maracujá amarelo (*Passifora edulis f. flavicarpa* Deg.) **Revista Brasileira de Herbicidas**, n. 3, p. 18-34, 2005.

MOLINARI, M. D. C. **Obtenção e análise molecular e fisiológica de soja contendo a construção 35S:AtNCED3 visando tolerância a seca**. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

NANDULA, V. K. Nandula VK1, Reddy KN, Rimando AM, Duke SO, Poston DH. Glyphosate-resistant and -susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3540-3545, 2007.

SOUZA JUNIOR, M. T.; VENTUROLI, M. F.; COELHO, M. C. F.; RECH FILHO, E. L. Análise de sistemas gene marcador/ agente seletivo alternativos para seleção positiva de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 365-372, 2001.

THOMPSON, C. J.; MOVVA, N. R.; TIZARD, R.; CRAMERI, R.; DAVIES, J. E.; LAUWEREYS, M.; BOTTERMAN, J. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 9, 2519-2523, 1987.

VIDIGAL, T. M. A.; SCHUSTER, I.; TEXEIRA, L. R.; COLAUTO, N. B. Regeneração de Plantas a partir de dois tipos de explantes de milho submetidos à transformação genética por biobalística. **Ciência Rural**, v. 44, n. 10, p. 1804-1809, 2014.

WOHLLEBEN, W.; ARNOLD, W.; BROER, I.; HILLEMANN, D.; STRAUCH, E.; PUHLER, A. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from streptomyces viridochromogenes Tu494 and its expression in *Nicotina tabacum*. **Gene**, v. 70, n. 1, p. 25-37, 1988.

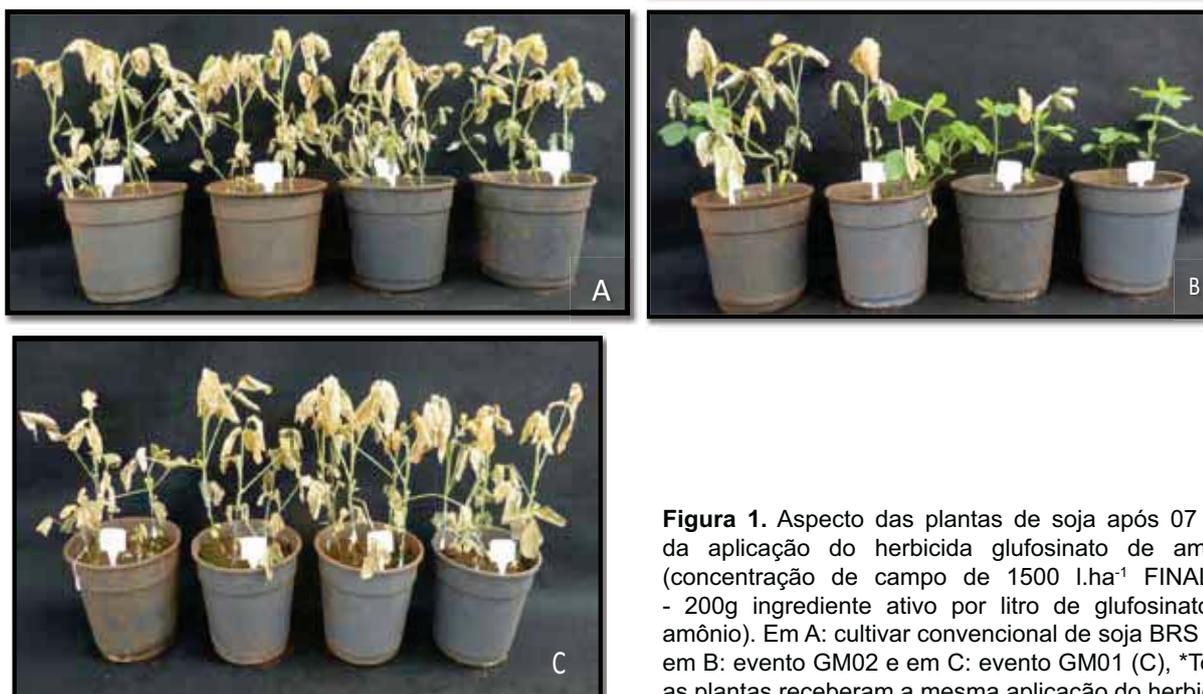


Figura 1. Aspecto das plantas de soja após 07 dias da aplicação do herbicida glufosinato de amônio (concentração de campo de 1500 l.ha⁻¹ FINALE™ - 200g ingrediente ativo por litro de glufosinato de amônio). Em A: cultivar convencional de soja BRS 184, em B: evento GM02 e em C: evento GM01 (C), *Todas as plantas receberam a mesma aplicação do herbicida.