

NÚMERO DE CÓPIAS E PADRÃO DE SEGREGAÇÃO EM SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA VIA *Agrobacterium*

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

¹Universidade Estadual de Londrina (UEL), maylamolinari@hotmail.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 transformação genética de plantas mediada por *Agrobacterium* vem sendo amplamente utilizada em transformações genéticas de um grande número de culturas, incluindo monocotiledôneas e eudicotiledôneas (GELVIN, 2003). A técnica possui algumas vantagens se comparada a outras metodologias disponíveis atualmente, como o menor custo, sendo considerada uma opção viável para a expressão estável de um gene de interesse em gerações sucessivas (TRAVELLA et al., 2005). Esta metodologia pode ainda minimizar problemas de expressão decorrentes da inserção de múltiplas cópias em *locus* únicos ou distantes (GIROTTO et al., 2012), como o silenciamento gênico total ou uma baixa expressão. Selecionar eventos com apenas uma cópia do transgene possibilita também monitorar a segregação conforme as leis de Mendel e isso implica em maior facilidade de seleção de eventos homocigotos para programas de melhoramento. A importância da homocigose é facilitar a predição do comportamento das progênies e a obtenção de ganhos genéticos entre as gerações (MACHADO et al., 2016). Sabe-se que após a obtenção de um evento geneticamente modificado, algumas caracterizações devem ser realizadas, dentre elas a caracterização do padrão de segregação do transgene. Se uma única cópia do transgene for inserida em um *locus* único no genoma hospedeiro, o padrão de segregação mendeliana é esperado. No entanto, padrões de segregação excepcionais e a intransferibilidade do transgene para as gerações sucessivas podem ocorrer, respectivamente como resultado da inserção de mais de uma cópia do gene de interesse em *locus* distintos com frequência de recombinação e da instabilidade gênica devido ao local onde o gene de interesse foi inserido no genoma da planta (YIN et al. 2004). Estas dificuldades podem ser minimizadas na transformação via *Agrobacterium*, uma vez que, quando o trans-

gene é inserido em mais de uma cópia em um mesmo *locus* estas costumam co-segregar (ISHIDA et al. 1996), apresentando padrão mendeliano. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar molecularmente quanto ao número de cópias e padrão de segregação do transgene, eventos GMs obtidos independentemente, com a mesma construção gênica.

Material e Métodos

Inicialmente, sementes de dois eventos GMs (Geneticamente Modificados) GM1 e GM2 na geração T₁ e das respectivas plantas T₂, GM1-1, GM1-2, GM1-3, GM1-4, GM1-5 e GM2-1, GM2-2 foram semeados em casa de vegetação. Discos foliares de cada plântula foram coletados e o DNA genômico extraído utilizando-se o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Para confirmação dos eventos positivos uma amplificação por PCR convencional foi realizada utilizando-se pares de *primers* específicos para o gene de interesse. O teste do Qui-quadrado (X^2) ($p \leq 0.05$) foi realizado para verificar se o gene exógeno apresentava segregação mendeliana. A quantificação absoluta para número de cópias inseridas foi realizada utilizando o sistema de detecção SYBRGreen®, conforme instruções do fabricante (GIULIETTI et al., 2001). O gene endógeno da lectina (GmLectina, Acesso No. K00821) foi utilizado como gene referência para a normalização por ser espécie específico e apresentar apenas uma cópia no genoma haplóide de soja (FINER et al., 1996). O método $2^{-\Delta Ct/2}$ foi utilizado para a quantificação do número de cópias do transgene, onde o ΔCt é calculado pela diferença entre o valor de Ct do gene alvo pelo Ct do gene referência para o cálculo do número de cópias (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A reação foi realizada em termociclador Veriti® (Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos), e composta por 3 estágios, um período inicial de 50°C por 2 min seguido de 95°C por 10 min; o segundo estágio composto por

40 ciclos a 95°C por 15s, 60°C por 1 min, 95°C por 15s, 60°C por 15s e por fim um período de 95°C por 15s.

Resultados e Discussão

No presente estudo, em duas plantas irmãs provenientes de um mesmo evento geneticamente modificado (GM), aqui chamado GM2, a presença da banda de interesse positiva foi muito sutil na geração T_1 (Figura 1), e pode-se observar que não houve transferência do transgene para a geração T_2 (Figura 2). Estes dados obtidos a partir do evento GM na geração T_0 sugerem certa instabilidade da construção gênica inserida. Esta instabilidade pode estar relacionada ao local de inserção do transgene no genoma (YIN et al. 2004). Já para evento GM1, gerado de modo independente, os padrões de segregação seguiram a proporção 3:1 de acordo com o teste qui-quadrado (X^2) na geração T_2 . Todas as linhagens irmãs (plantas identificadas como GM1-1; GM1-2; GM1-3; GM1-4; GM1-5) do evento GM1 apresentaram segregação mendeliana.

Os resultados da quantificação do número de cópias por RT-qPCR mostraram que as plantas da geração T_1 do evento GM1 apresentaram entre 1 a 4 cópias inseridas do transgene, enquanto que no evento GM2, a presença de cópias do transgene não foi detectada, confirmando os dados de PCR convencional, de que o gene não foi transmitido da geração T_1 para T_2 . Para o evento GM1, a inserção das cópias pode ter ocorrido no mesmo *locus* gênico, exibindo o comportamento de um único gene dominante, mesmo com 4 cópias do transgene no genoma, segregando assim na proporção de 3:1. Quando múltiplas cópias são inseridas, elas podem co-segregar como um *locus* transgênico, integrando-se em um *locus* muito próximo ou no mesmo *locus* (PAWLOWISKI; SOMERS, 1996). Pelo fato do *locus* transgênico ser hemizigoto na planta transformada e a maioria dos genes de interesse promovem um ganho de função nas plantas, estes genes inseridos se comportam como genes dominantes, e tendem a segregar 3:1 conforme o padrão mendeliano (ZHAO et al., 2007). Embora a transformação via *Agrobacterium* normalmente insira poucas cópias no genoma, este processo de integração do transgene sofre influencia de outros fatores como, por exemplo, do transgene utilizado (SONG et al., 2003;

OLTMANN et al., 2010). Segundo WU et al. (2014), ao transformar embriões de sorgo via *Agrobacterium* utilizando cinco diferentes cassetes de expressão, 35% dos eventos obtidos apresentaram a inserção de múltiplas cópias no genoma, sendo que 66,7% das plantas apresentou segregação mendeliana. HONNA et al. (2016), transformou soja com o gene *AtGols2* e observou eventos transgênicos com múltiplas cópias que apresentaram segregação mendeliana na proporção 3:1 para o transgene, sugerindo que o transgene pode ter sido integrado no mesmo *locus* gênico, comportando-se como um gene dominante. Estes dados corroboram os obtidos no presente estudo.

Conclusão

Apenas o evento GM1 apresentou segregação na proporção 3:1, apresentando de 1 a 4 cópias do transgene, enquanto que no evento GM2, a presença de cópias do transgene não foi detectada, confirmando os dados de PCR convencional, de que o gene não foi transmitido da geração T_1 para T_2 .

Referências

- 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.
- FINER, J.J.; FINER, K.R.; SANTARÉM, E.R. Physical methods for plant cell transformation. In: MEYERS, R.A. (Ed.). **Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine**. Weinheim : VCH, 1996. p. 458-465.
- GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 67, p. 16-37, 2003.
- 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.

- GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-394, 2001.
- HONNA, P.T.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FERREIRA, L.C.; MOLINARI, M.D.C.; MARIN, S.R.R.; OLIVEIRA, M.C.N. de; FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N.; MERTZ-HENNING, L.M.; KANAMORI, N.; NAKASHIMA, K.; TAKASAKI, H.; URANO, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; DESIDÉRIO, J.A.; NEPOMUCENO, A.L. Molecular, physiological and agronomical characterization, in greenhouse and in field conditions, of soybean plants genetically modified with *AtGolS2* gene for drought tolerance. **Molecular Breeding**, v.36, p.157, 2016.
- ISHIDA, V.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y. KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, v. 6, p. 745-750, 1996.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MACHADO, E.L.; SILVA, S.A.; FERNANDES, L. dos S.; BRASILEIRO, H.S. Genetic variability and homozygosity in a F4 castor bean population by microsatellite markers. **Bragantia**, v. 75, n. 3, p. 307-313, 2016.
- OLTMANN, H.; FRAME, B.; LEE, L.Y.; JOHNSON, S.; LI, B.; WANG, K.; GELVIN, S.B. Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the *Agrobacterium* chromosome. **Plant Physiology**, v. 152, n. 3, p. 1158-1166, 2010.
- PAWLOWSKI, W.P.; SOMERS, D.A. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. **Molecular biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17-30, 1996.
- SONG, J.; BRADEEN, J.M.; NAESS, S.K.; HELGESON, J.P.; JIANG, J. BIBAC and TAC clones containing potato genomic DNA fragments larger than 100kb are not stable in *Agrobacterium*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, n. 5, p. 958-964, 2003.
- TRAVELLA, S.; ROSS, S.M.; HARDEN, J.; EVERETT, C.; SNAPE, J.W.; HARWOOD, W.A. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. **Plant Cell Reports**, v. 23, p.780-789, 2005.
- WU, E.; LENDERTS, B.; GLASSMAN, K.; BEREZOWSKA-KANIEWSKA, M.; CHRISTENSEN, H.; ASMUS, T.; ZHEN, S.; CHU, U.; CHO, M.J.; ZHAO, Z.Y. Optimized *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic sorghum plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 50, n. 1, p. 9-18, 2014.
- YIN, Z.; PLADER, W.E.; MALEPSZY, S. Transgene inheritance in plants. **Journal of Applied Genetics**, v.45, p.127-144, 2004.
- ZHAO, Y.; QIAN, Q.; WANG, H.; HUANG, D. Hereditary behavior of bar gene cassette is complex in rice mediated by particle bombardment. **Journal of Genetics and Genomics**, v.34, n.9, p.824-835, 2007.

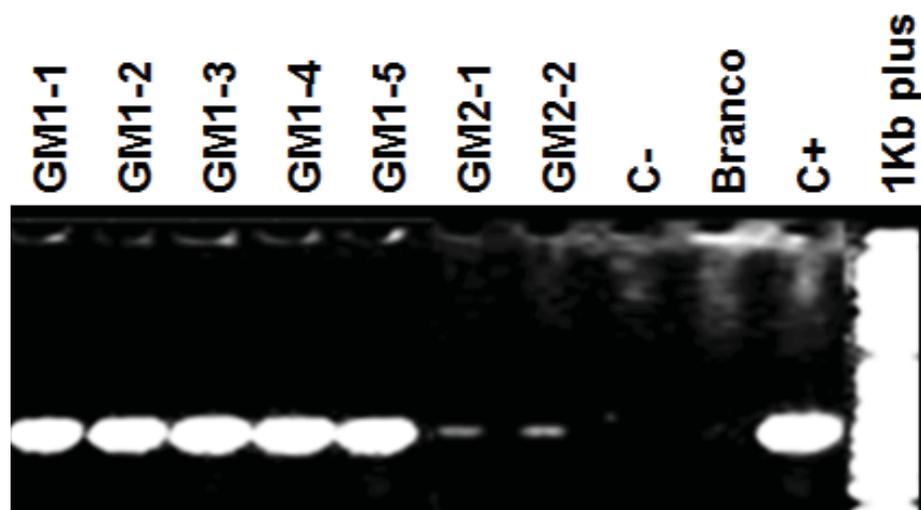


Figura 1. PCR convencional dos eventos de soja GM1 e GM2 na geração T_1 em gel de agarose 1%. As amostras foram amplificadas com o par de *primers* específicos para o transgene. Legendas: C+: controle positivo; C-: controle negativo.

Tabela 1. Teste de segregação (χ^2) e número de cópias via RT qPCR (método $2^{-\Delta Ct/2}$) ($p \leq 0.05$) das plantas filhas eventos GM1 e GM2 na geração T_2 . S: Sim.

Fenótipo T_1	Positiva T_2	Negativa T_2	χ^2	Segregação 3:1	Cópias
GM1-1	95	24	1,48	S	1-2
GM1-2	71	24	0,00	S	1
GM1-3	182	57	0,18	S	3-4
GM1-4	5	1	0,06	S	1
GM1-5	22	8	0,01	S	1
GM2-1	-	291	-	-	-
GM2-2	-	46	-	-	-