

## Fatores que influenciam o processo de transformação genética em soja via *Agrobacterium tumefaciens*

CRUZ, G.E.N.<sup>1</sup>; SILVA, M.H.P.<sup>2</sup>; MOLINARI, M.D.C.<sup>3</sup>; MARIN, S.R.R.<sup>4</sup>; MERTZ-HENNING, L.M.<sup>5</sup>; NEPOMUCENO, A.L.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Unopar, Bolsista PIBIC/CNPq, geovanaelize2010@hotmail.com; <sup>2</sup>UNIFIL, Bolsista Embrapa;

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação, Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de

Londrina; <sup>4</sup>Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia Vegetal; <sup>5</sup>Pesquisador, Embrapa Soja

### Introdução

*Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria tipo bacilo aeróbico gram-negativa da família *Rhizobiaceae* comumente encontrada no solo, que apresenta a capacidade de infectar células vegetais e transferir parte de seu DNA (T-DNA) para o genoma da planta (Wang et al., 1984). O uso de *A. tumefaciens* para transformação genética de plantas vem sendo aplicado com sucesso para inserir genes visando à melhoria de espécies de interesse econômico como a soja. Essa metodologia apresenta vantagens como a inserção de um menor número de cópias do transgene no genoma da planta, poucos rearranjos das moléculas de DNA introduzidas e uma maior estabilidade fenotípica durante muitas gerações de cruzamento (Schubert et al., 2004; Meng et al., 2006).

Para uma metodologia eficiente de geração de plantas geneticamente modificadas via *A. tumefaciens*, alguns fatores devem ser avaliados especialmente em relação ao genótipo e estirpes de agrobactéria (Liu; Wei, 2005). As principais características a serem consideradas na seleção de genótipos são a possibilidade de infecção por *A. tumefaciens* e a capacidade de regeneração *in vitro*; também é desejável que o genótipo apresente um excelente desempenho agrônomico (Jia et al., 2015). Em função da especificidade genotípica na interação entre a estirpe de *A. tumefaciens* e o genótipo, que impacta na habilidade de transferência do T-DNA, é necessário avaliar diferentes estirpes e cultivares, a fim de se obter um processo de transformação eficiente.

Outro fator que pode melhorar a eficiência de transformação é o emprego de metodologias que aumentem a eficiência da infecção. Tratamentos físicos capazes de produzir microferimentos nos explantes promovem a geração de moléculas indutoras do processo de transferência do T-DNA durante a sín-

tese e reparação da parede da célula vegetal favorecendo a transferência do T-DNA, pois promovem um aumento no número de sítios de fixação da *Agrobacterium* (Santarém, 2000; Matsuda et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio da análise histoquímica da expressão do gene repórter *Gus*, o efeito dos fatores genótipo, estirpe e método de infecção na transferência do T-DNA, visando aumentar a eficiência do protocolo de transformação genética de soja via *A. tumefaciens*.

## Material e Métodos

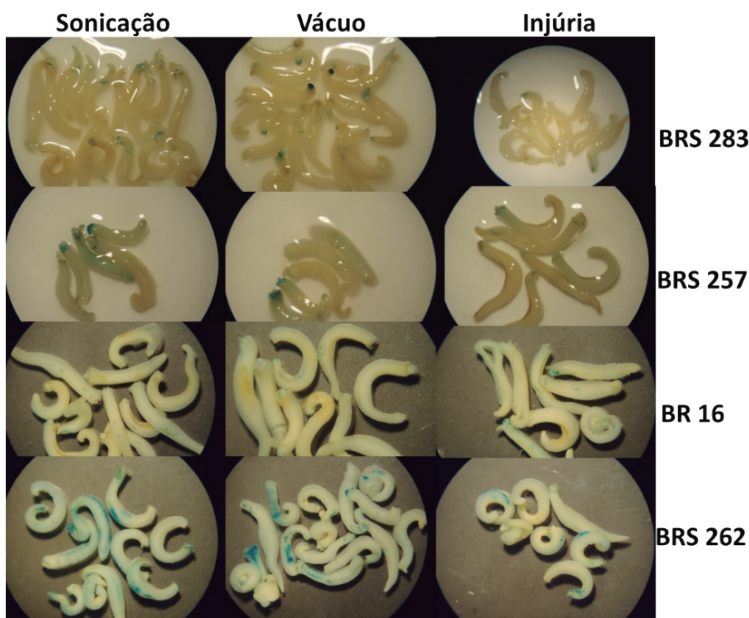
Foram avaliados oito genótipos de soja: BR 16, BRS 317, BRS 361, BRS 283, BRS 284, BRS 262, BRS 257 e BRS 184 quanto a suscetibilidade a infecção por duas estirpes de *A. tumefaciens*: EHA105 e GV3101 contendo o cassete que possui o gene *Gus* e as regiões necessárias para inserção, transcrição e tradução na planta, utilizando três métodos de infecção: injúria, sonicação e vácuo. Foi realizado teste de vigor de sementes (germinação, envelhecimento e tetrazólio) nos oito genótipos para garantir a qualidade das sementes a serem utilizadas no processo de transformação. Os meios de cultura para transformação utilizados foram preparados de acordo com o protocolo de Paz et al. (2006).

Para o processo de transformação, foi preparado um inóculo a partir de uma colônia de *A. tumefaciens* em meio YEP líquido suplementado com 50 mg.L<sup>-1</sup> de canamicina, e incubado com agitação orbital a 150 rpm, em temperatura de 28°C por 24h. Após esse período as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos e ressuspendidas em 40 mL de meio de co-cultivo (MCC). Foi realizado assepsia nas sementes com gás cloro (3,5 mL de 12N HCl em 100 mL de hipoclorito de sódio comercial 2,0%) durante 16h; após esse período as sementes foram colocadas para hidratar em meio de germinação durante 16h. Com auxílio de pinça e bisturi foram retirados os eixos embrionários e os primordes foliares. Os embriões foram transferidos para placa de petri contendo MCC líquido e, então, foi realizada a injúria na região do meristema apical, os embriões permaneceram nesse meio por aproximadamente 10 min. Nos tratamentos de sonicação e vácuo, imediatamente após a injúria, as placas de Petri foram tampadas e levadas para o sonicador e dessecador com vácuo respectivamente e mantidas por aproxi-

madamente 10 min. Após o processo de infecção foi realizado teste histoquímico para detectar a atividade da beta-glucuronidase (GUS) nos embriões e determinar a quantidade de embriões transformados e o número de células transformadas em cada embrião.

## Resultados e Discussão

A eficiência da transformação de cada genótipo foi calculada considerando-se o número de embriões transformados em relação a quantidade de embriões que apresentaram expressão do gene *Gus* (Figura 1), que variou entre 1% e 18%. A eficiência relacionada ao método de infecção foi analisada segundo as porcentagens estabelecidas na eficiência de transformação de cada genótipo e estirpe de *A. tumefaciens*.

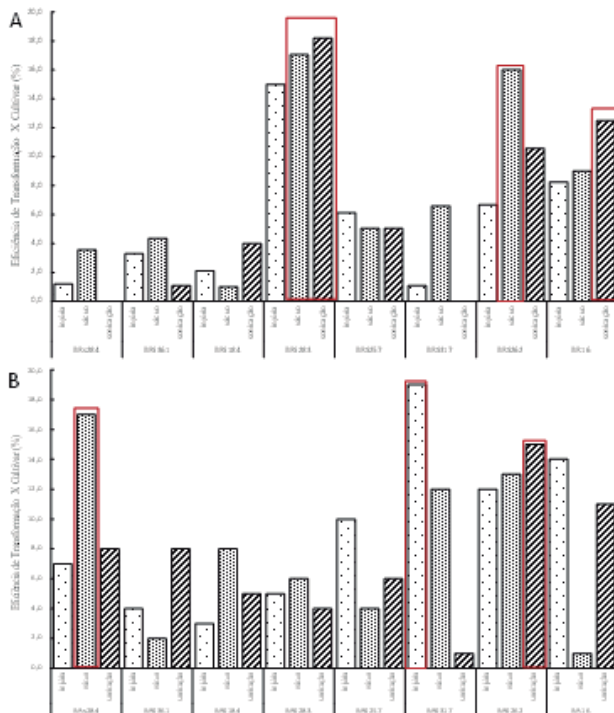


**Figura 1.** Análise histoquímica da expressão do gene repórter *Gus* com a estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 à partir da infecção pelos métodos de sonicação, vácuo e injúria em quatro genótipos de soja.

Considerando as transformações realizadas com a estirpe EHA 105, a cultivar BRS 283 foi aquela que apresentou a melhor eficiência de transformação com um aumento gradual dentre os métodos utilizados: injúria, vácuo e so-

nicação. A cultivar com a segunda melhor eficiência de transformação foi a BRS 262 pelo método a vácuo. O terceiro melhor desempenho foi da cultivar BR16 pelo método de sonicação (Figura 2A). Já nas transformações com a estirpe GV 3101, a melhor eficiência de transformação foi obtida na cultivar BRS317 por injúria, seguida pela cultivar BRS284 por vácuo e em terceiro pela cultivar BRS 262 pelo método de sonicação (Figura 2B).

A interação entre o genótipo e a estirpe de *A. tumefaciens* foi evidenciada por uma taxa de eficiência variável, revelando que o emprego da mesma estirpe em genótipos diferentes proporciona respostas divergentes na efetividade das infecções. Isso ocorre devido a variabilidade genética da soja, que promove diferentes respostas à eficiência de infecção pela agrobactéria, desenvolvimento e regeneração na cultura in vitro (Donaldson; Simmonds, 2000; Yang et al., 2016).



**Figura 2.** Eficiência de Transformação entre diferentes cultivares por técnica de transformação. A) Genótipos transformados com a estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. B) Genótipos transformados com a estirpe de *A. tumefaciens* GV3101.

Comparando-se o efeito dos métodos de infecção em cada estirpe de *A. tumefaciens* pode-se observar que a sonicação e infiltração a vácuo são técnicas que poderiam ser empregadas para melhorar a eficiência de infecção para alguns genótipos (Figura 2). Esse efeito também foi observado na transformação de soja com *Agrobacterium rhizogenes* (Theboral et al., 2017) e para cultivares de soja indianas com *A. tumefaciens* (Arun et al., 2015).

## Conclusão

Os resultados mostraram que existem diferenças entre os genótipos de soja quanto à suscetibilidade às estirpes de *A. tumefaciens* e o método empregado para infecção. As melhores eficiências de transformação obtidas foram para a estirpe de *A. tumefaciens* GV3101 com o genótipo BRS 317 por meio do método de injúria e, para a estirpe de *A. tumefaciens* EHA105 com o genótipo BRS 283 pelo método de sonicação. Assim o desempenho do processo de transformação depende da determinação prévia da relação entre o genótipo a estirpe de *A. tumefaciens* e o método empregado para infecção.

## Referências

- ARUN, M.; SUBRAMANYAM, K.; MARIASHIBU, T. S.; THEBORAL, J.; SHIVANANDHAN, G.; MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A. Application of sonication in combination with vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 4, p. 2266-2287, 2015.
- DONALDSON, P. A.; SIMMONDS, D. H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 5, p. 478-484, 2000.
- JIA, Y.; YAO, X.; ZHAO, M.; ZHAO, Q.; DU, Y.; YU, C.; XIE, F. Comparison of soybean transformation efficiency and plant factors affecting transformation during the *Agrobacterium* infection process. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 18522-18543, 2015.
- LIU, H. C.; WEI, Z. M. Recent advances in soybean genetic transformation. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 31, p. 126-134, 2005.
- MATSUDA, F.; MORINO, K.; MIYASHITA, M.; MIYAGAWA, H. Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in wound-healing potato tuber tissue using stable isotope-labeled tracer and LC-MS spectroscopy. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, p. 510-517, 2003.
- 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.

- PAZ, M. M.; MARTINEZ, J. C.; KALVIG, A. B.; FONGER, T. M.; WANG, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. **Plant Cell Reports**, v. 25, p.206-213, 2006.
- SANTARÉM, E. R. SAAT: Transformação de plantas mediada por ultra-som e *Agrobacterium*. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 725-730, 2000.
- 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.
- THEBORAL, J.; ARUN, M.; MANICKVASAGAM, M.; NATESAN, S.; GANAPATHI, A. Sonification and vacuum infiltration enhanced *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation in soybean. **Innovare Journal of Agriculture Science**, v. 5, n. 2, p. 1-8, 2017.
- WANG, K.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSK, P. Right 25pb terminus of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of the DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. **Cell**, v. 38, p. 455-462, 1984.
- YANG, J.; XING, G.; DU, Q.; SUI, L.; GUO, D.; NIU, L. Effects of different soybean genotypes on the transformation efficiency of soybean and analysis of the t-DNA insertions in the soybean genome. **Soybean Science**, v.35, p. 562–567, 2016.