

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA COM UM GENE QUE CODIFICA UMA OSMOTINA DE *Solanum nigrum* var. *americanum*, VISANDO A RESISTÊNCIA A MOLÉSTIAS FÚNGICAS

SOYBEAN GENETIC TRANSFORMATION WITH A GENE THAT CODIFIES AN OSMOTIN FROM *Solanum nigrum* var. *americanum*, AIMING TO ENHANCE RESISTANCE TO FUNGAL PATHOGENS

WEBER, R.L.M.¹; GROSSI de SÁ, M.F.²; CAMPOS, M.A.²; PINHEIRO-MARGIS, M.¹; ZANETTINI, M.H.B.¹.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, CP 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, ²EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; e-mail: rlmweber@yahoo.com.br

Resumo

Visando o aumento da resistência a fungos patogênicos, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de introduzir o gene *SnOLP*, que codifica uma osmotina de *Solanum nigrum* var. *americanum*, em cultivares de soja. A estratégia escolhida foi a transformação por biobalística, utilizando o plasmídeo pCL1390-UBQ3-SnOLP, que contém o gene *SnOLP* e o gene *hptII*, que confere resistência ao antibiótico higromicina. Conjuntos de embriões somáticos globulares das cultivares IAS-5, Bragg e BRSMG 68 Vencedora foram utilizados como alvo. Os conjuntos bombardeados foram transferidos para meio seletivo visando obter material estavelmente transformado. Os conjuntos higromicina-resistentes correspondendo a cinco, 12 e 13 eventos de transformação independentes das cultivares Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora, respectivamente, foram sequencialmente transferidos para meio de proliferação (sem higromicina), maturação e regeneração. Um total de 114, 70 e 211 embriões histodiferenciados de Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora, respectivamente, foram obtidos. A partir destes, foram regeneradas duas plantas adultas de IAS-5, cada uma proveniente de um evento de transformação independente e 12 plantas de Bragg, todas do mesmo evento de transformação. A presença do transgene nas plantas foi detectada por PCR e a expressão da proteína recombinante através de *Western blot*. A herança do transgene seguiu o padrão Mendeliano, para um gene dominante, na linhagem I4 de IAS-5. As progênies das plantas transgênicas de Bragg apresentaram uma segregação excepcional, com deficiência de plantas transformadas. Resultados preliminares dos bioensaios utilizando extratos protéicos totais não mostraram atividade antifúngica dessas plantas transgênicas.

Palavras-chave: *Glycine max*, planta geneticamente modificada, osmotina, resistência a moléstias fúngicas

Introdução

Entre os diversos fatores que limitam os altos rendimentos da soja, as doenças estão entre os mais importantes e difíceis de controlar. A expansão da cultura para novas áreas, a monocultura e a utilização de práticas inadequadas têm aumentado o número de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. Apesar do uso de fungicidas e outras técnicas que visam o controle ou a eliminação dos patógenos, as moléstias fúngicas são responsáveis por grandes prejuízos nas colheitas todos os anos. Assim, o desenvolvimento de alternativas que contribuam para o controle das doenças fúngicas da soja, bem como de outras plantas economicamente importantes é de grande interesse, destacando-se a prospecção de novos compostos antifúngicos e a transgenia visando à resistência a esses patógenos.

Entre as estratégias desenvolvidas para aumentar a resistência a patógenos, incluindo fungos fitopatogênicos, encontra-se a obtenção de plantas que constitutivamente produzam altos níveis de proteínas ou compostos capazes de limitar o desenvolvimento dos microrganismos. Estes incluem proteínas relacionadas à patogênese, tais como as enzimas hidrolíticas, proteínas antifúngicas, peptídeos antimicrobiais, proteínas que inativam ribossomos e fitoalexinas (Punja, 2001). As osmotinas são proteínas de aproximadamente 26 kDa pertencentes à família PR-5. Estas proteínas são produzidas em plantas sob diferentes condições de estresse biótico ou abiótico. Como outras proteínas da família PR-5, as osmotinas atuam permeabilizando as membranas celulares dos fungos, impedindo a manutenção do gradiente de pH, resultando em prejuízo para o desenvolvimento do patógeno.

A aplicabilidade de genes da família PR-5 na transformação genética de plantas, com o objetivo de promover uma resposta mais efetiva das mesmas frente a fungos fitopatogênicos, representa uma alternativa ao emprego de técnicas tradicionais, tais como a aplicação de fungicidas. Os insumos químicos são notoriamente prejudiciais ao ambiente, onerosos e, principalmente para o controle de moléstias fúngicas, pouco eficazes.

Material e métodos

Embriões somáticos das cultivares de soja Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora foram induzidos a partir de cotilédones imaturos, proliferados e mantidos como descrito por Droste *et al.* (2002). O vetor de transformação genética utilizado nesse estudo foi o pCL1390-UBQ3-SnOLP, contendo o gene de resistência à higromicina (*hpt II*), regulado pelo promotor do RNA 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV 35S) e pelo terminador CaMV 35S, e o gene *SnOLP* de *Solanum nigrum* var. *americanum* sob controle do promotor UBQ-3 (*Arabidopsis thaliana*-ubiquitin3 promoter) e o terminador do gene da nopaline synthase.

O bombardeamento de partículas, utilizando o aparelho de baixa pressão *Particle Inflow Gun – PIG* (Finer *et al.*, 1992), a seleção dos tecidos transformados e a regeneração de plantas foram realizados como descrito previamente por Droste *et al.* (2002). Os regenerantes primários (T_0) se referem às plantas transgênicas recuperadas dos explantes originalmente submetidos ao bombardeamento de partículas. A geração T_1 é composta por plantas derivadas de sementes obtidas da autopolinização das plantas T_0 , que se desenvolveram em um telado, com luminosidade natural e temperatura ambiente. O teste Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para confirmar se os dados de segregação encontrados neste estudo estavam de acordo com a probabilidade Mendeliana esperada (3:1). O nível de significância foi determinado para valores de $\alpha = 0,05$.

A presença do transgene nas plantas foi detectada por PCR e a expressão da proteína recombinante através de Western blot. Os bioensaios para testar a atividade antifúngica da proteína SnOLP, produzida em plantas transgênicas de soja, foram realizados no Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa (CENARGEN / EMBRAPA). O micélio de fungos de espécies com importância agrônômica (*Macrophomina phaseolina*; *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Fusarium solani* f. sp. *glycines*) foram utilizados neste experimento.

Resultados e discussão

Os dados referentes à etapa de cultura *in vitro* e transformação genética estão sumarizados na Tabela 1. Um total de 90 conjuntos de embriões somáticos, de cada cultivar, foram bombardeados com o plasmídeo pCL1390-UBQ3-SnOLP. Após a etapa de seleção em meio contendo o antibiótico, foram obtidos conjuntos de embriões resistentes à higromicina correspondendo a cinco, 12 e 13 eventos de transformação independentes nas cultivares Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora, respectivamente.

Tabela 1 – Sumário dos dados referentes às etapas de cultura de tecidos e transformação genética com o vetor pCL1390-UBQ-SnOLP para as Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora.

Cultivar	CEB	EvT	EH	EG	ER	EvTAI	PACV
Bragg	90	5	114	78	30	1	12
IAS-5	90	12	70	23	8	2	2
BRSMG 68 Vencedora	90	13	211	76	0	0	0

Abreviações: CEB = conjuntos de embriões bombardeados, EvT = eventos de transformação, EH = embriões histodiferenciados, EG = embriões germinados, ER = embriões regenerados, EvTAI = eventos de transformação após incidente, PACV = plantas adultas na casas de vegetação.

Na etapa em que as plantas se encontravam em potes com vermiculita e solução nutritiva, ocorreu um imprevisto que quase interrompeu a realização deste trabalho. Uma solução nutritiva estava contaminada com um herbicida, o que levou à perda de grande número de indivíduos regenerados. Após esse incidente foram recuperadas apenas duas plantas de IAS-5, cada uma proveniente de um evento de transformação independente (plantas I3 e I4) e 12 plantas de Bragg (plantas B1 a B12), todas do mesmo evento de transformação. Essas

plantas adultas sobreviventes foram utilizadas para todos os demais experimentos descritos nesse trabalho.

Todas as plantas obtidas foram analisadas, através de PCR, para confirmar a integração dos genes *hpt II* e *SnOLP* no genoma das cultivares de soja. As plantas positivas apresentam os fragmentos de 462 e 744 pares de bases (pb) referentes aos genes *hpt II* e *SnOLP*, respectivamente. Os controles negativos, compostos por plantas não transformadas de ambas cultivares e a reação da PCR sem a adição de DNA não apresentam bandas referentes a produtos amplificados.

A confirmação da expressão do gene *SnOLP* foi obtida pela técnica de Western blot. Uma única banda de aproximadamente 27 kDa, detectada pela reação com anticorpo anti-osmotina de tabaco, foi detectada nas plantas PCR-positivas, indicando que a mesma corresponde à proteína SnOLP.

Para verificar o padrão de herança do gene *SnOLP* na geração T₁, entre 20 e 30 indivíduos das progênes da planta positiva de IAS-5 (I4) e de uma amostra de três plantas de Bragg (progênes das plantas B1, B7 e B12 da T₀) foram semeados e analisados através de PCR. Os dados estão sumarizados na Tabela 2. A progênie da planta I4 apresentou o padrão de herança Mendeliana esperado para um locus dominante (3:1; transgênicas : não-transgênicas). Nas progênes B7 e B12 foi verificada uma deficiência de plantas transformadas, sendo que a proporção das duas classes de plantas desvia do esperado de 3:1, aproximando-se da proporção 1:1. A análise da progênie da planta B1 indica que esta obedece à proporção esperada, embora o valor de χ^2 obtido esteja muito próximo do nível de significância. Taxas de segregação excepcionais podem resultar de inúmeros fatores, que incluem a inativação da expressão do transgene, inserções que levam a mutações letais e falhas na transmissão do transgene para a descendência.

Tabela 2 – Segregação do gene *SnOLP* em plantas da geração T₁ obtidas através de autofecundação de plantas T₀.

Planta T ₀	<i>SnOLP</i> ⁺	<i>SnOLP</i> ⁻	Total	Proporção testada	χ^2
I4	24	6	30	3:1	0,17
B1	11	9	20	3:1	3,26
B7	16	13	29	3:1	5,07*
B12	14	12	26	3:1	5,13*

Presença (*SnOLP*⁺) e ausência (*SnOLP*⁻) do gene foi determinada por PCR.

* P < 0,05

Resultados preliminares dos bioensaios utilizando extratos protéicos totais não mostraram atividade antifúngica dessas plantas transgênicas. Apesar do resultado dos bioensaios não terem sido positivos, é importante testar o efeito do extrato dessas plantas frente outros fungos *in vitro*. Testes *in vivo* estão sendo conduzidos, pois esses poderão comprovar a real eficácia dessas plantas frente a fungos fitopatogênicos.

Referências

- DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica* 127: 367-376. 2002.
- FINER, J.J.; VAIN, P.; JONES, M.W.; MC MULLEN, M.D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep* 11:323-328. 1992.
- PUNJA, Z.M. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 216-235. 2001.