

# Caracterização Molecular de Eventos Transformados com a Construção *rd29A*: DREB1A

---

MARTINS, M.T.B.<sup>1,2</sup>; NEPOMUCENO, A.L.<sup>2</sup>; MARCELINO, F.C.<sup>2</sup>; FARIAS, J.R.B.<sup>2</sup>; ABDELNOOR, R.<sup>2</sup>; MARIN S.R.R.<sup>2</sup>; SILVEIRA, C.A.<sup>2</sup>; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.<sup>3</sup>; YAMANAKA, N.<sup>3</sup>; NAKASHIMA K.<sup>3</sup>; PAIVA, A.A.R.<sup>4</sup>; BENEVENTI, M.A.<sup>5</sup>; STOLF, R.<sup>6</sup>; OLIVEIRA, G.B.A. DE<sup>7</sup>; <sup>1</sup>Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, PR, e-mail- maitebazzo@yahoo.com.br; <sup>2</sup>Embrapa Soja, Londrina, PR <sup>3</sup>Japan International Research Center for Agriculture Sciences – JIRCAS, <sup>4</sup>Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR; <sup>5</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; <sup>6</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP; <sup>7</sup> Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR.

No Brasil, a soja é um dos principais produtos da economia, refletindo em vários setores da sociedade (CONAB, 2007). Estresses abióticos, como a seca, podem reduzir significadamente os rendimentos das lavouras e restringir as latitudes e os solos onde espécies comercialmente importantes podem ser cultivadas (Nepomuceno et al., 2001).

A inserção do cassete de expressão *rd29A*: DREB1A de *A.thaliana* no genoma da soja é uma estratégia que tem demonstrado aumento de tolerância à seca em várias espécies, sendo importantes características dessa estratégia a utilização de um promotor estresse-induzido e a ativação de uma ampla categoria de genes envolvidos na defesa celular contra desidratação (Beneventi, 2006).

O objetivo deste trabalho foi gerar plantas contendo a construção *rd29A*: DREB1A, pelo método de biobalística, e verificar a estabilidade genética por meio da transmissão do transgene na geração T1, por caracterização molecular.

Os embriões foram co-transformados com a construção *rd29A*: DREB1A retirada do plasmídeo pela amplificação por PCR; e com o plasmídeo pAC321, que contém o cassete de expressão do gene AHAS, que confere resistência à herbicida da classe das imidazolinonas, utilizado para a seleção de plantas transformadas.

Foram transformados 2091 embriões, provenientes da cultivar BR16 sensível à seca, utilizando o protocolo desenvolvido por Aragão et al. (2002). Após o bombardeamento dos embriões, os eixos embrionários foram transferidos para meio que estimula o multibrotamento (MS/BAP) por 16 h. Depois desse período, foram transferidos para meio de seleção (MS/Imz), permanecendo por 40-60 dias com fotoperíodo de 16 h. Foram transferidos 1406 embriões para aclimação em substrato de areia: vermiculita (1:1), permanecendo por 15-30 dias, dos quais 1077 embriões foram para casa de vegetação.

Foram feitas análises de PCR de 942 indivíduos em T0, utilizando nas amplificações os conjuntos de *primers* Atrd29Dreb-R/ Atrd29Dreb-F, 29APH5-F / NostProx-R, para a construção *rd29A*: DREB1A e Ahas 1/ Ahas 2, para a construção pAC321 (Tabela 1). Confirmaram a inserção do transgene os eventos 3058B, 3069A e 3075D.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador, com parâmetros de ciclagem 95° por 5 min., 95° por 1 min., 55° por 1 min. e 72° por 2 min. As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 12,5 µl, contendo 2 µl de DNA molde; 10mM de Tris-HCl; 50mM de KCl; 1,6mM de MgCl<sub>2</sub>; 1,5mM de desoxinucleosídeotrfosfato – dNTPs; 1U de Taq-DNA polimerase e 2,5 µM de cada *primer Forward e Reverse*. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose 1 % (p/v), contendo brometo de etídeo para corar o DNA e visualizados por meio de luz ultravioleta.

Foram semeadas, em casa de vegetação, oito sementes de cada evento T0 para a análise de estabilidade genética na geração T1, sendo que no evento 3075D duas sementes não germinaram.

**Tabela 1.** Sequência dos *primers* utilizados para amplificação dos cassetes transgenes no genoma das plantas de soja transformadas e tamanho do produto de amplificação esperado.

| Primer       | Sequência                                     | Amplificação (kb) |
|--------------|---|-------------------|
| Ahas 1       | ACT AGA GAT TCC AGC GTC AC                    | 0,69              |
| Ahas 2       | GTG GCT ATA CAG ATA CCT GG                    |                   |
| Atrd29Dreb-F | CCA ATA GAC ATG GAC CGA CTA CT                | 0,59              |
| Atrd29Dreb-R | GTT CTC TAA CCT CAC AAA CCC ACT               |                   |
| 29AP5H-F     | GGG AAG CTT GCC ATA GAT GCA ATT CAA TCA AAC T | 1,67              |
| NostProx-R   | GTT TGA ACG ATC GGG GAA AT                    |                   |

Para a análise confirmativa da inserção do transgene na geração T1 extraiu-se o DNA seguindo o protocolo de Doyle e Doyle. Foram utilizados na amplificação os conjuntos de primers Atrd29Dreb-R/ Atrd29Dreb-F para a construção rd29A: DREB1A e o conjunto de primers Ahas 1/Ahas 2 para a construção pAC321. As reações de PCR foram realizadas em termociclador, com os mesmos parâmetros de ciclagem e condições de PCR citados anteriormente.

Na Fig. 1, observa-se a confirmação do transgene nos eventos 3058B, 3069A e 3075D(T0). De acordo com a Fig. 2 observa-se que em 11 indivíduos na geração T1 foi confirmada a inserção do transgene, sendo três indivíduos do evento 3058B, sete indivíduos do evento 3069A e um indivíduo do evento 3075D.

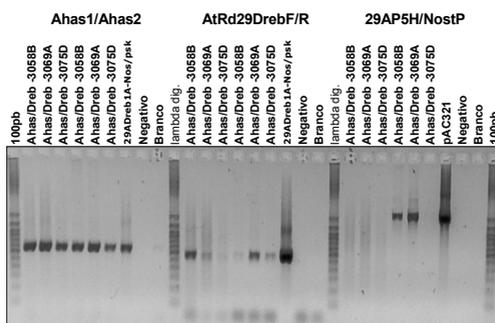
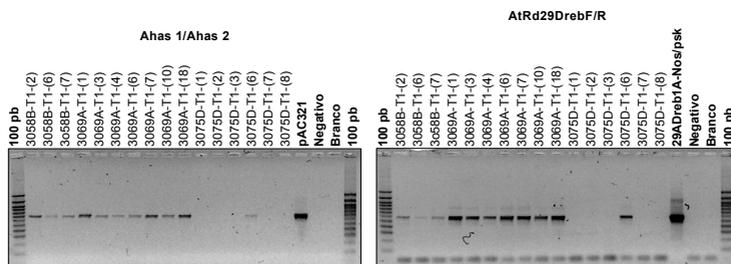


Fig. 1. Confirmação da presença do cassete transgene rd29A: DREB1A nos eventos 3058B, 3069A e 3075D. O DNA das plantas foi amplificado por PCR utilizando os primers Ahas 1/Ahas 2, 29APH5-F / NostProx-R e AtRd29Dreb-R/ Atrd29Dreb-F.



**Fig. 2.** Confirmação da presença do cassete transgene rd29A: DREB1A na geração T1 dos eventos 3058B, 3069A e 3075D. O DNA das plantas foi amplificado por PCR utilizando os primers Ahas 1/Ahas 2 e AtRd29Dreb-R/ AtRd29Dreb-F.

Por meio do processo de transformação por biobalística, foi possível inserir a construção rd29A: DREB1A em soja, gerando os eventos 3058B, 3069A e 3075D. A transmissão do transgene para a primeira geração foi verificada nos três eventos, confirmando a estabilidade genética.

## Referências

BENEVENTI, M.A. Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene rd29a e a região codante do gene DREB1A de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca. 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CONAB-Companhia Nacional de Pesquisa da Soja. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em agosto de 2007.

DOYLE, J. J. e DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* n°19, p.11-15, 1987.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento.* n° 23, p.12-18, 2001.