

Obtenção de plantas de soja geneticamente modificadas via *Agrobacterium tumefaciens*

LEITE, J.P.¹; KANAMORI, N.²; FUGANTI, R.³; GIROTTO, L.³; ROLLA, A.A.P.⁴; ENGELS, C.⁴; MARINHO, J.P.¹; FARIAS, J.R.B.⁵; NEUMAIER, N.⁵; ABDELNOOR, R.V.⁵; MARCELINO, F.C.⁵; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K⁴; NEPOMUCENO, A.L.⁵
¹Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP; ²Japan International Research Center for Agricultural Sciences - JIRCAS; ³Bolsista CNPq; ⁴Universidade Estadual Londrina - UEL; ⁵Embrapa Soja

O agronegócio envolvido na produção de soja sofre, em consequência, grandes perdas, impactando a economia das regiões produtoras e a sociedade. As estratégias para reduzir os impactos causados pela seca vão desde o manejo adequado da cultura até o uso de ferramentas de engenharia genética aliadas aos métodos convencionais de melhoramento, objetivando-se a obtenção de cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico.

Nesse contexto, a obtenção de plantas transformadas com características de tolerância à seca poderá contribuir para amenizar os problemas decorrentes do déficit hídrico. Muitos métodos de transformação estão disponíveis, destacando-se o sistema via *Agrobacterium tumefaciens* e a técnica de biobalística (Aragão et al., 2000; Aragão, 2002; Rech et al., 2008), utilizados na inserção de genes envolvidos em resposta a desidratação celular.

Dentre os genes atualmente utilizados na obtenção de vegetais mais tolerantes ao déficit hídrico estão os genes que codificam fatores de transcrição denominados DREB (*D*ehydration *R*esponsive *E*lement *B*inding protein), envolvidos na ativação de vários outros genes que apresentam características de proteção das estruturas celulares durante a desidratação celular (Shinozaki e Yamaguchi – Shinozaki, 2000).

Esses genes, fusionados a promotores estresse induzidos (por exemplo *rd29*) ou a promotores constitutivos (por exemplo *35S*) vêm sendo amplamente utilizados na obtenção de plantas GMs, visando a maior tolerância a estresses abióticos.

Assim, seguindo essa tendência, a Embrapa e o Jircas (*Japan International Research Center for Agriculture Science*), vêm desenvolvendo em parceria, desde 2004, plantas de soja GMs contendo a construção gênica *rd29A:AtDreb1A*. Essa construção gênica contém o promotor estresse induzido *rd29A* e a região codante do fator de transcrição DREB1A, ambos elementos gênicos isolados de *Arabidopsis thaliana*.

Como resultado dessa parceria, a construção *rd29A:AtDreb1* foi introduzida em soja via biobalística, visando obter plantas com maior tolerância ao déficit hídrico. Os resultados promissores obtidos levaram essas instituições a assinar, em novembro de 2007, novo acordo, em complemento ao acordo anterior assinado para o gene DREB1A, para o desenvolvimento de soja GMs tolerantes à seca, contendo o gene DREB2A.

Segundo estudos conduzidos em espécies como arroz e tabaco, a construção gênica *rd29A:AtDREB2A* promove tolerância à seca e ao calor. Em *A. thaliana*, o fator de transcrição DREB2A mostrou induzir a expressão de vários genes de resposta à seca e à salinidade, no entanto, outros trabalhos mostraram que DREB2A pode induzir, também, a expressão de vários genes de resposta ao calor, estresse o qual DREB1A não confere tolerância.

Assim, este trabalho tem como objetivo otimizar o protocolo de transformação de plantas de soja via *Agrobacterium tumefaciens* (estirpe EHA105), introduzindo o vetor pGreenII0229 contendo o cassete 35S:GUS:NOS, em embriões da cultivar BR16 (Fig. 1). Este protocolo otimizado será utilizado para a futura introdução do fator de transcrição DREB2A em soja.

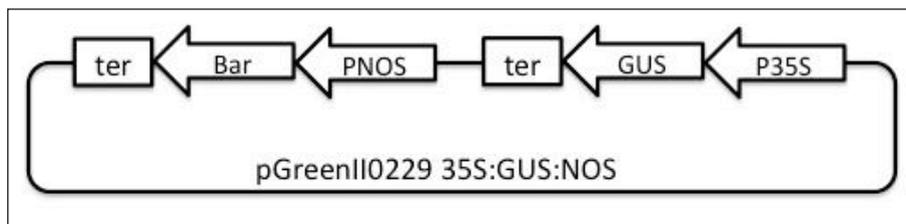


Fig. 1. Estrutura do plasmídeo pGreenII0229 35S:GUS:NOS. P35S. UENP / Embrapa Soja, 2009.

Para a otimização do protocolo foi utilizado o gene repórter *Gus* (β -glucuronidase). O gene *gusA* oxida o substrato "X-gluc" (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucuronídeo) e pode ser facilmente monitorado, usando uma grande variedade de glucuronídeos (Jefferson, 1987), resultando em um produto composto insolúvel de cor azul.

O processo de transformação genética iniciou-se com uma colônia de *Agrobacterium* isolada e colocada para crescer em 100 mL de meio YEP, permanecendo em agitação, *overnight*, a 26 °C. O meio crescido foi distribuído em tubos Falcon e centrifugado a 5000 rpm, a 20/25 °C. O *pellet* foi ressuscitado em 45 mL de meio líquido de incubação (CIM). Em seguida, foram adicionados 50 μ L de diclorodifeniltricloreto; 50 μ L de tiosulfato de sódio; 10 μ L de acetoseringona e 12,5 μ L de ácido giberélico, seguindo-se uma inversão da mistura por alguns minutos.

A assepsia de sementes foi realizada seguindo a retirada e injúria dos embriões. Em placa de Petri, embriões e *Agrobacterium* foram incubados por aproximadamente 1h no escuro. Após esse período, os embriões foram secos em papel filtro e transferidos para meio CIM sólido, permanecendo nessas condições por cinco dias, a 20 °C. A seguir, os embriões foram lavados em água destilada contendo 50 μ L de cefatoxina e 100 μ L de carbenicilina e transferidos para meio sólido de alongamento SEM1, permanecendo a 25 °C, por 7 dias.

Os explantes foram, então, cortados em fragmentos de um centímetro e transferidos para meio SEM2 contendo 5 μ L do agente de seleção glufosinato de amônio, por 7 dias, sendo posteriormente transferidos

para meio SEM4, contendo 10 μ L glufosinato de amônio, permanecendo nesse meio por aproximadamente 15 dias. Após esse período, os explantes foram transferidos para copos plásticos contendo o substrato areia e vermiculita (1:1) para crescimento.

O ensaio histoquímico do gene *Gus* foi realizado em pedaços de folhas coletados de plantas de soja transformadas. As amostras foram incubadas no escuro em solução contendo X-gluc, n-n-dimetilformamida, fosfato de sódio e Triton-X, *overnight* a 37 °C. Após esse período as amostras foram lavadas em etanol 70 %.

Até o momento foram transferidas 890 plantas para areia-vermiculita e destas foram testadas 187 por meio de ensaio histoquímico. Os resultados mostraram que 28 plantas foram identificadas como positivas pelo teste (Fig. 2), apresentando eficiência preliminar de aproximadamente 14,97 %. O restante das plantas ainda está em crescimento e será avaliado assim que seja atingida a fase de coleta.

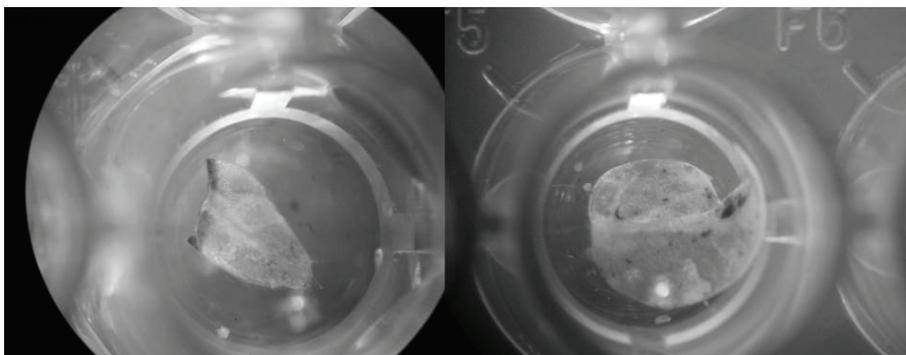


Fig. 2. Expressão do gene *Gus*. UENP / Embrapa Soja, 2009.