

Identificação do número de inserções via *Southern blot* em linhagens de soja geneticamente modificadas

Lima, LFS^{1,2}; Freitas, RA^{1,3}; Marin, SRR¹; Nepomuceno, AL¹.¹Embrapa Soja, Londrina; ²Centro Universitário Filadélfia/ Bolsista Embrapa*; ³Univ. Est. do Norte do Paraná/ Bolsista CNPq Brasil*;
*E-mail: lfernandodelima@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Atualmente, o melhoramento de plantas pode recorrer às técnicas de engenharia genética para acelerar o processo do melhoramento e transpor barreiras de incompatibilidade sexual através da hibridização somática ou da introdução de genes específicos em células vegetais, por métodos de transformação diretos ou indiretos (FALEIRO e DE ANDRADE, 2011). O método direto de transformação via biobalística é baseado na aceleração de micropartículas revestidas com o DNA exógeno, e apesar de estar sendo gradualmente substituído pela transferência indireta, ainda é uma alternativa utilizada na obtenção de culturas geneticamente modificadas (GM), principalmente devido ao fato de ser uma metodologia genótipo independente (ALTPETER et al., 2005). O emprego desta técnica pode resultar em integrações complexas com eventos apresentando múltiplas cópias do transgene, ou mesmo integração de cópia única, dependendo da concentração de DNA utilizada no processo (LOWE et al, 2009).

A integração de uma cópia única, intacta do cassete de expressão do transgene é desejável e benéfica, pois reduz a possibilidade dos eventos GMs apresentarem uma menor expressão, instabilidade ou mesmo silenciamento do transgene ou de genes endógenos, fenômeno em geral associado à eventos com múltiplas inserções. Uma única cópia integrada ao genoma também facilita a caracterização molecular e a transferência de traços transgênicos para gerações seguintes, além da aprovação de linhas comerciais, onde a inserção de uma única cópia do transgene é geralmente necessária (CHAWLA et al 2006;. MENG et al 2006;. SCHUBERT et al. 2004). Desta forma, plantas com uma ou até duas cópias do transgene são preferidas para uma expressão estável e de alto nível de um gene exógeno, uma vez que, a complexidade da integração do transgene no genoma destinatário pode ser um determinante importante na expressão do transgene e no desempenho em campo das lavouras transgênicas.

O número de cópias inseridas de um transgene pode ser estimado por meio de análises de *Southern Blot*, metodologia que permite a detecção de fragmentos específicos em amostras complexas. Os resultados desta técnica são de grande confiabilidade e uma prova molecular da integração de genes exógenos no genoma vegetal, auxiliando a seleção de eventos com menor número de inserções.

Sendo assim, é essencial identificar os eventos GMs que contêm o transgene, e determinar o número de cópias integradas ao seu genoma. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes eventos de soja geneticamente modificados obtidos via biobalística, comparando-os quanto ao número de inserções, através da técnica de *Southern blot*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja. Inicialmente, nove eventos de plantas de soja GMs, obtidos pelo método de transformação via biobalística, foram avaliados para a presença do transgene. O DNA genômico de folhas foi obtido empregando o protocolo Doyle-Doyle (1987), e quantificado por espectrofotometria (260nm/280nm) em NanoDrop. Uma análise de PCR convencional utilizando um conjunto de *primers* específicos para a região codante do transgene com produto de amplificação de 649pb foi realizada para seleção dos eventos positivos. A reação de PCR foi realizada em volume final de 25µL composta de 5µM de cada primer, 0,4mM de dNTP's, 2 mM cloreto de magnésio, 1U de Taq DNA polimerase e aproximadamente 60 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador modelo Veriti Applied Biosystems e a ciclagem utilizada foi composta por desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg e 72°C por 7 min. Os produtos das reações de amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,2% e visualizados em transluminador UV.

Sete eventos contendo o transgene foram selecionados e o número de inserções foi estimado através da técnica de *Southern Blot*. Aproximadamente 10µg de DNA total foram digeridos por 16h, a 37° C, com a enzima *HindIII*, que realiza corte único no plasmídeo, linearizando-o. Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 0,8%, com tampão TAE 1X por um período de 3h. Após eletroforese, o gel foi incubado por 10 min em solução de depurinação, seguido de incubação por 30 min em solução de desnaturação, e mais 30 min em solução de neutralização (REED e MANN, 1985). Após as lavagens o DNA foi transferido por capilaridade durante 20h em solução SSC 10X, para uma membrana de nitrocelulose carregada positivamente. Após a transferência a membrana foi exposta por 5 min a luz ultravioleta para fixação do DNA.

Para a construção da sonda, uma reação de PCR convencional conforme descrito acima foi realizada, e o produto de PCR foi purificado utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean UP (Promega). A marcação da sonda foi realizada utilizando o kit *DECAprime* (Ambion) e [32P] d-CTP. Após a marcação, a sonda foi purificada utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean UP (Promega). A reação de hibridização foi conduzida a 42°C, por um período de 18h, em solução de hibridização Hyb (Ambion), contendo aproximadamente 25µL de sonda. Após o período de incubação, a membrana foi lavada duas vezes durante 10 min, a 42°C com cada uma das soluções SSC 2X, SSC 1X e SSC 0,1X, para a retirada do DNA não hibridizado e do excesso de sonda. Finalmente, a membrana foi colocada para exposição em filme radiográfico Kodak *OXMat*. O filme foi revelado com solução reveladora (Kodak) e fixado com solução fixadora (Kodak).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O termo inserto se refere à presença física de um cassete de expressão no genoma, assim, uma planta diplóide homozigota com duas cópias tem na verdade quatro insertos, que podem estar no mesmo locus ou em loci diferentes; e uma planta hemizigota com duas cópias tem dois insertos, no mesmo locus ou em cromossomos distintos. A presença do transgene de interesse foi confirmada em sete eventos de soja geneticamente modificados (figura 1). Através da análise de *Southern blot* foi possível estimar a quantidade de inserções do transgene para os eventos positivos (figura 2). O número de bandas observadas variou de uma a seis ou mais, representando as inserções. Sendo assim, os eventos 1Ab27 e 1Ab3058 apresentaram apenas uma cópia, o evento 1Ab58 três cópias, os eventos 1Ab59 e 1Ab1333 apresentaram quatro cópias, enquanto os eventos 1AB1378 e 1Ab3069 apresentaram aparentemente seis bandas que pode representar várias cópias, pois devido a intensidade de algumas bandas fica difícil inferir com certeza o número exato, pois cada banda com alta intensidade pode representar mais de

uma inserção. O resultado de múltiplas inserções é esperado considerando que os eventos foram obtidos pela técnica de biobalística que pode proporcionar a inserção de múltiplas cópias no genoma.

Os eventos 1Ab1378 e 1Ab3069 que apresentaram alto número de inserções do transgene, provavelmente são eventos mais complexos, podendo estas plantas possuir inserções em diferentes loci, o que possibilita rearranjos muito complexos que podem levar a perda dos mesmos ou ao silenciamento. Além disso, cópias excessivas do transgene inserido podem comprometer o desenvolvimento e metabolismo da planta, pelo efeito posicional das inserções que podem comprometer genes do metabolismo primário (KIM *et al.*, 2004), além de outros possíveis desarranjos nos cromossomos.

A presença de poucas cópias é importante para a expressão estável e de alto nível do transgene, e em estudos de expressão gênica facilita a interpretação da real interação entre as moléculas, uma vez que muitas cópias podem levar à desarranjos cromossômicos, silenciamento e outros efeitos. Desta forma, os eventos com apenas uma inserção são fortes candidatos a evento "elite". Os eventos com alto número de inserções, no entanto, podem ser considerados promissores para estudos comparativos de expressão e possivelmente silenciamento gênico.

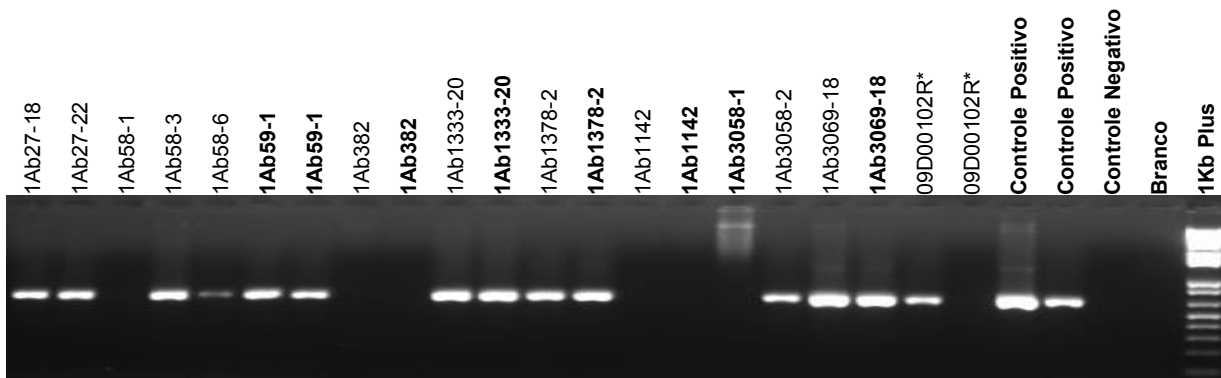


Figura 1 - PCR convencional realizado com *primers* específicos para a região codante do transgene em plantas de soja transformadas via biobalística para seleção de eventos positivos.

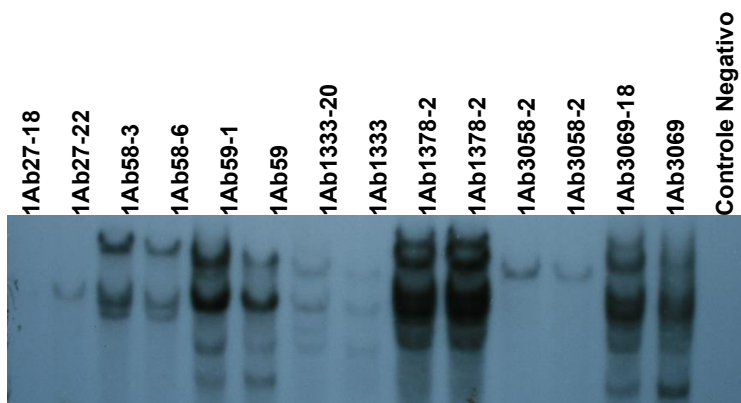


Figura 2 – SouthernBlot das plantas de soja geneticamente modificadas.

CONCLUSÃO

O número de cópias do transgene inseridas no genoma é um critério importante para determinar a qualidade de eventos transgênicos. A análise de *Southern blot* permitiu selecionar dois eventos que apresentaram apenas uma inserção: 1Ab27 e 1Ab3058, como candidatos quanto ao número de inserções, e dois eventos, 1Ab1378 e 1Ab3069, promissores para o estudo comparativo da expressão e silenciamento gênico. Sendo assim, em uma próxima etapa, estudos de expressão gênica relativa serão realizados para avaliação do efeito do número e posição das inserções e posterior seleção de um evento "elite".

REFERÊNCIAS

- ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K. et al. Panicle bombardment and the genetic enhancement of crops; myths and realities. **Molecular Breeding**, v.15, p. 305-327, 2005.
- CHAWLA, R.; ARIZA-NIETO, M.; WILSON, A.J.; MOORE, S. K.; SRIVASTAVA, V. Transgene expression produced by biolistic-mediated, site-specific gene integration is consistently inherited by the subsequent generations. **Plant Biotechnology Journal**, v.4, p. 209–218, 2006.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bull**, v.19, p.11-15, 1987.
- FALEIRO, F. G.; DE ANDRADE, S. R. M.; Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária, **Embrapa Cerrados**, Planaltina-DF, cap. 15, 2011.
- KIM, S.; KANG, J.Y.; CHO, D. I.; PARK, J. H.; KIM, S.Y. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its over expression affects multiple stress tolerance. **The Plant Journal**, v.40, p.75-87, 2004.
- LOWE, B. A.; SHIVA PRAKASH N.; WAY M.; MANN M. T.; SPENCER T. M.; BODDUPALLI R.S. Enhanced single copy integration events in corn via particle bombardment using low quantities of DNA. **Transgenic Research**. Dec;18(6), p.831-840, 2009.
- MENG, L.; ZIV, M.; LEMAUX, P. G. Nature of stress and transgene locus influences transgene expression stability in barley. **Plant Mol Biol**, v.62, p.15–28, 2006.
- REED, K.C.; MANN, D.A. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. **Nucleic Acids Research**, v.25, p. 7207-7221, 1985.
- 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.