



## SELEÇÃO DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA RESISTÊNCIA AO HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMÔNIO

BARBOSA, D.A.<sup>1</sup>; MOLINARI, M.D.C.<sup>1</sup>; FUGANTI-PAGLIARINI, R.<sup>2</sup>; MARIN, S.R.R.<sup>3</sup>; CARANHATO, A. L. H.<sup>1</sup>; MERTZ-HENNING, L.M.<sup>3</sup>; NEPOMUCENO, A.L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina-PR, danielbarbosa238@gmail.com; <sup>2</sup>Bolsista CNPq, Embrapa Soja; <sup>3</sup>Embrapa Soja.

Nos últimos anos, o avanço das metodologias de biotecnologia, permitiu através do desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGM), a possibilidade de solução de alguns problemas de interesse agrônomo, sejam eles fatores bióticos, abióticos, nutricionais entre outros. No entanto, os protocolos de obtenção de PGMs exigem, para maior facilidade de identificação de plantas positivas, um sistema de gene marcador/agente seletivo (Souza junior et al., 2001), que podem ser co-transferidos (transformados) juntamente com outros genes que irão conferir as características de interesse. Usualmente, estes genes conferem resistência à antibióticos ou a herbicidas. Um dos genes mais utilizados como marcador é o gene *bar* ou *pat* [isolados respectivamente de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987), e *S. viridochromogenes* (Wohlleben et al., 1988), que conferem resistência ao glufosinato, um herbicida de uso comercial, de amplo espectro de ação e alta eficiência (Nandula et al., 2007; Franco et al., 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar um sistema de seleção de plantas GMs através da pulverização do glufosinato de amônio, em casa de vegetação. O experimento foi conduzido nas instalações da Embrapa Soja. Sementes de dois eventos GMs, obtidos independentemente e com diferentes construções gênicas, e da cultivar convencional de soja BRS 184 (*background* genético das linhas transgênicas GM1 e GM2) e da cultivar convencional de soja BRS 283 (*background* genético das linhas transgênicas GM3 e GM4) foram germinadas em papel Germitest® umedecidos. As construções inseridas nos eventos GMs contém como gene marcador de seleção o gene *bar*, que codifica a enzima fosfinotricina acetil transferase, a qual confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio. Após a germinação, as sementes foram transferidas para vasos de 8L preenchidos com terra:areia:composto orgânico (3:2:2). Um total de 16 plantas por evento GM e das plantas controle foram amostradas. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação até atingiram o estágio de desenvolvimento V4, quando o herbicida foi aplicado por pulverização, em concentração de campo de 1,5 l.ha<sup>-1</sup> FINALE™ (200g ingrediente ativo por litro de glufosinato de amônio). Sete dias após a aplicação, as plantas foram avaliadas quanto à resistência ao herbicida, sendo consideradas plantas positivas para o gene de interesse, as plantas que sobreviveram à aplicação, uma vez que a seleção positiva da resistência, pressupõe a seleção do gene de interesse, inserido juntamente com o agente seletivo.

Os resultados obtidos mostraram que para o evento GM1 de soja (Figura 1A), nenhuma das plantas amostradas sobreviveu à aplicação do herbicida. Já para o evento GM2 (Figura 1B) 7 plantas (43,75%) sobreviveram à aplicação do herbicida. As plantas da cultivar convencional BRS 184 (*background* genético) não sobreviveram à aplicação do glufosinato de amônio (Figura 1C). Já para o evento GM3 (Figura 1D) 3 plantas (18,75%) sobreviveram à aplicação. Para o evento GM4 (Figura 1E) nenhuma planta sobreviveu. As plantas da cultivar BRS 283 (*background* genético) não sobreviveram à aplicação herbicida (Figura 1F). Várias culturas já foram transformadas utilizando o gene *bar* como agente de seleção tais como maracujá (Martinez, 2005), milho (Vidigal, 2014) e soja (Honna, 2016; Molinari, 2016).



Os resultados obtidos com a aplicação do glufosinato de amônio sugerem que o gene *bar* está sendo expresso em diferentes níveis nos eventos GMs, conferindo assim, diferentes níveis de resistência ao herbicida. Cabe ressaltar que a confirmação da presença do gene *bar* e do gene de interesse no genoma foi realizada via PCR convencional em ambos os eventos GMs, confirmando a inserção. Assim como os dados obtidos aqui, Lopes et al. (2016), ao transformar tabaco utilizando o gene *bar* como agente de seleção também identificou uma expressão variável entre os eventos GMs. Os níveis de expressão gênica estão usualmente relacionados a alguns fatores como o genótipo e a construção utilizada, mas principalmente ao local de integração do transgene no genoma vegetal (Joyce et al. 2014), que pode ser em regiões promotoras de genes transcricionalmente ativos (Bourras et al., 2015) ou não, bem como em diferentes regiões do genoma que possam apresentar baixos níveis de transcrição (Gelvin; Kim, 2007), e também ao número de cópias inseridas, resultando em variações nos níveis de expressão ou até mesmo no silenciamento da expressão gênica. Estes mecanismos podem ter gerado as respostas variáveis de tolerância ao glufosinato de amônio observadas aqui para os eventos GMs.

A aplicação do herbicida seletivo na identificação de plantas transformadas e positivas para um gene de interesse co-transformado com o agente marcador pode ser uma metodologia rápida e eficiente de seleção, poupando tempo e a utilização de metodologias mais laboriosas como a identificação como PCR. Para eventos com alta expressão do transgene esta metodologia de seleção pode acelerar o processo de melhoramento genético e a obtenção de cultivares superiores, contendo as características desejadas. No entanto, é importante identificar a presença do transgene de interesse e do gene marcador e ainda se possível, quantificar os níveis de expressão, que podem variar em função de algumas particularidades de cada evento GM. Neste trabalho, devido à baixa expressão do gene de seleção *bar*, a aplicação do herbicida apresentou baixa seleção de plantas transformadas, não sendo portanto, uma ferramenta interessante.

## Referências

- BOURRAS, S.; ROUXEL, T.; MEYER, M. Agrobacterium tumefaciens gene transfer: How a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. **Phytopathology**, 1-14, 2015.
- FRANCO, D.A.S.; ALMEIDA, S.D.B.; CERDEIRA, A.L.; DUKE, S.O.; MORAES, R.M.; LACERDA, A.L.S.; MATALLO, M.B. Avaliação do uso de Glyphosate em Soja Geneticamente Modificada e sua Relação com o Ácido Chiquímico. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 30, n. 3, p. 659-666, 2012.
- GELVIN, S. B.; KIM, S. I. Effect of chromatin upon Agrobacterium T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1769:410–421, 2007.
- HONNA, P. T. Obtenção e caracterização molecular e fisiológica de plantas de soja contendo o Gene *AtGols2* Sob Déficit Hídrico. Jaboticabal, 2015.
- JOYCE, P.; HERMANN, S.; O'CONNELL, A.; DINH, Q.; SHUMBE, L.; LAKSHMANAN, P. Field performance of transgenic sugarcane produced using Agrobacterium and biolistics methods. **Plant Biotechnology Journal**, 12:411–424, 2014.
- LOPES, S. S. Análise Funcional do Gene *pstol1* de Arroz e de seus Homólogos em Milho e Sorgo em Plantas Transgênicas de Tabaco. Dissertação de mestrado da Universidade Federal de São João del Rei, MS, 2016.
- MATINEZ, C. O. et al. Glifosato e Glufosinato como genes seletivos para transformação genética de maracujá amarelo (*Passifora edulis f. flavicarpa Deg.*) **Revista Brasileira de Herbicidas**, n. 3, pp. 18-34, 2005.



MOLINARI, M. D. C. Obtenção e Análise Molecular e Fisiológica de Soja Contendo a Construção 35S:AtNCED3 Visando Tolerância a Seca. Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual de Londrina-UEL, 2015.

NANDULA, V. K. et al. Glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 9, p. 3540-3545, 2007.

VIDIGAL, T. M. A.; SCHUSTER, I.; TEXEIRA, L. R.; COLAUTO, N. B. Regeneração de Plantas a partir de dois tipos de explantes de milho submetidos à transformação genética por biobalística. **Ciência Rural**, v.44, n.10, out, 2014.

SOUZA JUNIOR, M. T.; VENTUROLI, M. F.; COELHO, M. C. F.; RECH FILHO, E. L.. Análise de sistemas gene marcador/ agente seletivo alternativos para seleção positiva de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro. **Ver. Bras. Fisiol. Veg.** vol.13, n.3, 2001.

THOMPSON, C. J., MOVVA, N. R., TIZARD, R., CRAMERI, R., DAVIES, J. E., Lauwereys, M., & Botterman, J. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. **The EMBO Journal**, 1987.



**Figura 1.** Aspecto das plantas de soja após 07 dias da aplicação do herbicida glufosinato de amônio (concentração de campo de 1,5 l/há<sup>-1</sup> FINALE™ - 200g ingrediente ativo por litro de Glufosinato de Amônio). Em A: evento GM1 e em B: evento GM2 em C: cultivar convencional de soja BRS 184, em D: evento GM3 e em E: evento GM4, e em F: cultivar convencional de soja BRS 283. \*Todas as plantas receberam a mesma aplicação do herbicida.