

VALIDAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE SILENCIAMENTO GÊNICO VISANDO INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Meloidogyne incognita* E *Heterodera glycines* EM SOJA GM

FERREIRA, A.J.^{1,2}; FRAGOSO, R.R.^{3,4}; LOURENÇO, I.T.^{1,4}; MEZZALIRA, I.^{1,4}; DIAS, W.P.⁵; CARNEIRO, R.M.D.G.¹; NEPOMUCENO, A.L.⁵; BORÉM, A.²; GROSSI-DE-SA, M.F.^{1,6}

¹ Bolsista Mestrado CNPq, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, e-mail: eng.andre.julio@gmail.com;

² Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG;

³ Embrapa Cerrados, Planaltina, DF;

⁴ Universidade de Brasília, Brasília, DF;

⁵ Embrapa Soja, Londrina, PR;

⁶ Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF.

Resumo

Nematoides parasitas de plantas representam o maior estresse biótico da agricultura, causando perdas anuais maiores que US\$ 100 bilhões. Baseado nas limitações dos métodos de atuais de controle, o desenvolvimento de novas estratégias deve ser uma prioridade. Recentemente, a estratégia de silenciamento gênico, por interferência mediada por RNA dupla fita, tem-se mostrado muito promissora para o controle de nematoides. Nesse trabalho foi inserida em embriões de soja, pela técnica de biobalística, uma construção de RNAi correspondente a uma fusão de regiões de dois genes que codificam para fatores de processamento de mRNA de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne incognita*, visando a obtenção de eventos de soja GM resistentes à esses fitonematoides. Para averiguar o efeito do silenciamento, 6 eventos GM foram desafiados com *M. incognita*. Seis semanas após a inoculação, as raízes das plantas foram avaliadas quanto à indução de resistência. Quando comparados ao tratamento controle, os eventos transgênicos mostraram uma redução significativa entre 71% a 92% no número de ovos por grama de raiz. Os eventos transgênicos não foram estatisticamente diferentes quando comparados entre si, exceto o evento GmFSMiHg – 4IT3. Trabalhos publicados até o momento demonstram silenciamento *in planta* de 12 genes-alvo de *Meloidogyne* spp. ou *Heterodera* spp., resultando em redução de nematoides estabelecidos, fêmeas em desenvolvimento e/ou número de ovos de 68-95% em relação ao controle. Os resultados aqui apresentados mostram claramente a capacidade da soja transgênica em reduzir o potencial reprodutivo de *M. incognita* por meio de silenciamento gênico. A completa redução de *M. incognita* continua a ser o objetivo final, mas a redução parcial, como observado no bioensaio, pode ter aplicações importantes no controle de NFGs.

Introdução

Entre os principais fatores que contribuem para a queda do rendimento da cultura da soja, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, estão as doenças, com destaque para aquelas causadas por fitonematoides. As doenças causadas por fitonematoides são responsáveis por um dano anual a agricultura maior que US\$ 100 bilhões. As técnicas atuais de controle de fitonematoides apresentam diversas limitações, sendo que é essencial o desenvolvimento de técnicas mais efetivas, seguras e duráveis. Recentemente, a estratégia de silenciamento gênico, ou interferência mediada por RNA dupla fita (dsRNA), tem se mostrado muito promissora para o controle de nematoides (MCCARTER, 2008). Tal estratégia se baseia na transformação genética de plantas para que essas expressem dsRNA com sequência específica de genes-alvo do fitonematoide. Podem ser considerados como genes-alvo, os genes essenciais ao fitonematoide ou genes envolvidos com o parasitismo, migração, formação ou manutenção do sítio de alimentação (MCCARTER, 2008).

Neste cenário, o trabalho teve como objetivo validar a estratégia de silenciamento gênico visando indução de resistência a *M. incognita* e *H. glycines* em soja GM.

Material e Métodos

Para a obtenção de plantas de soja GM, embriões de soja da cultivar BR16 foram co-transformados, via biobalística (RECH *et al.*, 2008), com o vetor de RNAi contendo uma sequência correspondente a fusão de regiões de dois genes que codificam para fatores de processamento de mRNA de *H. glycines* e *M. incognita*, e com vetor contendo gene Ahas, que confere resistência ao herbicida Imazapir. Após o bombardeamento, os embriões foram mantidos em meio seletivo, em câmara de crescimento a temperatura de 28° C, com 16 horas de fotoperíodo, luminosidade 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e umidade relativa acima de 80%. Após aproximadamente 45 dias, os embriões multibrotados foram transferidos para copos plásticos contendo areia:vermiculita (1:1) autoclavadas e umedecidas com solução nutritiva. Eles foram então mantidos em câmara climatizada, cobertos com saco plástico e irrigados com solução nutritiva a cada 7 dias, por um período de 28 dias. Após este período eles foram transferidos para casa de vegetação em vasos contendo uma mistura de terra e areia esterilizada (5:3), cobertos com saco plástico durante sete dias para aclimação, sendo substituído por saco plástico furado por mais cinco dias. Após esse período de aclimação os sacos plásticos foram retirados para o desenvolvimento normal das plantas até o início das análises moleculares para a identificação de plantas positivas pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction).

A fim de avaliar a indução de resistência a *M. incognita* nos eventos de soja GM foi realizado um bioensaio em casa de vegetação. Neste bioensaio, plantas da geração T3, no estágio de 2-3 trifólios, foram inoculadas com uma população aproximadamente 1.000 J2 de *M. incognita* raça 1. Plantas da cultivar BR-16 (não transgênica), foram utilizadas como controle. Aos 45 dias após inoculação (DAI) as raízes de soja foram processadas individualmente para a extração dos ovos. Para o processamento, as raízes foram individualmente lavadas para retirada de solo, secas com papel toalha, pesadas, trituradas em liquidificador com 0,5% NaClO por 2 minutos, lavadas com jato d'água e os ovos foram separados em peneira de 500 Mesh. Após contagem de ovos usando microscópio e lâmina de Peters, a contagem foi normalizada com a massa da raiz, determinando o número de ovos por grama de raiz. Todos os dados obtidos do bioensaio foram avaliados estatisticamente por meio do procedimento de modelos lineares generalizados (GLM) utilizando pacotes estatísticos do Programa R.

Resultados e Discussão

No período de 3 meses foram bombardeados 2946 embriões, sendo que 31 eventos sobreviveram ao meio de cultivo contendo o agente de seleção. Considerando todas as etapas realizadas, foi obtida uma eficiência de transformação de aproximadamente 1%, considerando as o número de plantas GM PCR-positivo em relação ao número de embriões bombardeados. As sementes na geração T3 dos eventos transformados foram germinadas e as plantas que se transplantadas para vasos em casa de vegetação. Quando atingiram o estágio de 2-3 trifólios, as plantas foram genotipadas por PCR para a detecção do transgene. As plantas que não apresentaram o fragmento correspondente foram descartadas, sendo que apenas as plantas positivas foram utilizadas nos bioensaios.

Ao comparar-se o número de ovos por grama de raiz entre o tratamento controle e os eventos transgênicos expressando dsRNA, foi verificada uma redução de de 71% a 92% nos eventos transgênicos (**Figura 2A**), sendo essa diferença significativa pela análise de contrastes ($p < 0,05$). Os eventos transgênicos não foram estatisticamente diferentes quando comparados entre si, exceto o evento GmFSMiHg – 4IT3 (**Figura 2B**).

O silenciamento gênico tem sido testado em vários trabalhos como ferramenta biotecnológica para indução de resistência a fitonematoides em plantas geneticamente modificadas (LI *et al.*, 2011). Trabalhos publicados até o momento mostram silenciamento *in planta* de 12 genes-alvo de *Meloidogyne spp.* ou *Heterodera spp.*, resultando em redução de

nematóides estabelecidos, fêmeas em desenvolvimento e/ou número de ovos de 68-95% em relação ao controle.

Os resultados obtidos com esses eventos de soja GM, são semelhantes aos resultados obtidos em fumo GM para expressão de dsRNA para o mesmo gene-alvo do nematóide (YADAV *et al.*, 2006).

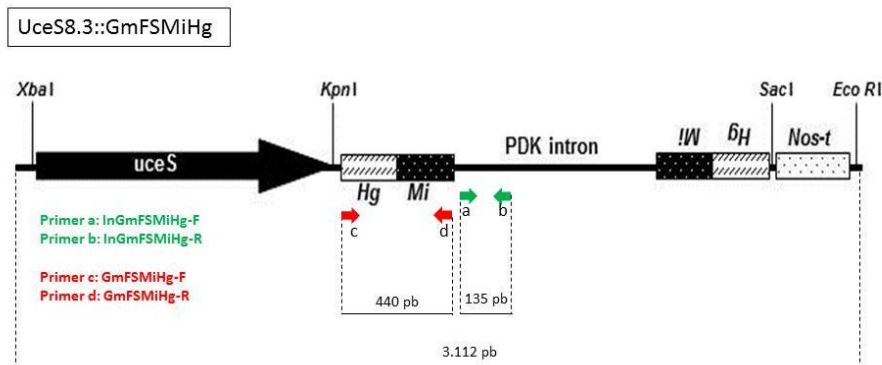
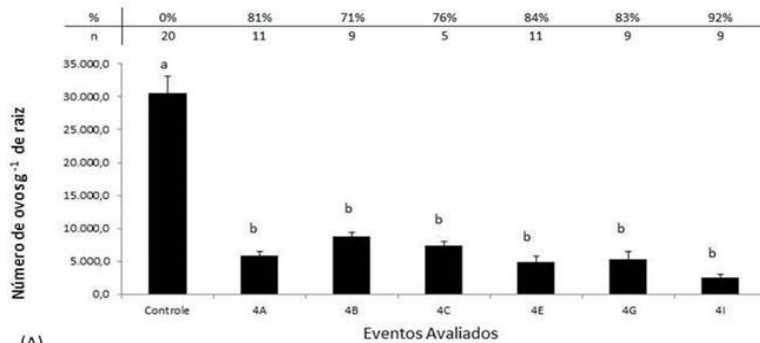
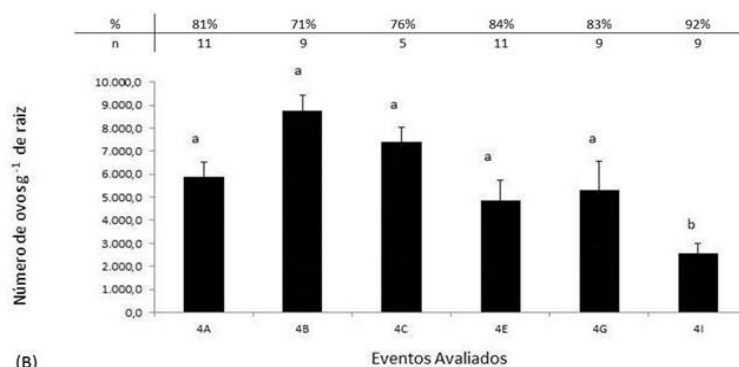


Figura 1. Construções utilizada na transformação, UceS8.3::GmFSMiHg. Os primers utilizados para amplificação dos fragmentos, suas sequências e o tamanho dos produtos gerados estão indicados na figura.



(A)



(B)

Figura 2. Biensaio de resistência de eventos de soja GM a *M. incognita*. Seis eventos transgênicos de soja GM expressando dsRNA para silenciamento gênico do fator de processamento por meio da construção gênica UceS8.3::GmFSMiHg foram desafiados com *M. incognita*. O número de ovos por grama de raiz de *M. incognita* coletados aos 45 DAI foi determinado e comparado com o controle BR16 (A) e comparado entre os eventos de soja GM (B). n representa o número de plantas utilizado nos bioensaios. % representa o percentual de redução na contagem de ovos em relação ao controle. 4A, 4B, 4C, 4E, 4G, 4I são indivíduos da terceira geração de eventos independentes de transformação genética de soja.

Conclusões

- A construção (UceS8.3::GmFSMiHg) para silenciamento gênico (RNAi) em plantas foi introduzida no genoma de soja por biobalística, resultando em 31 eventos transgênicos independentes (1% de eficiência).
- Os eventos de soja GM expressaram o RNA dupla fita de genes de processamento de mRNA de nematoides e houve indução de resistência a nematoides, observada pela alto grau de redução (71-91%) no número de ovos/g raiz .
- Pela primeira vez um promotor da própria soja (UceS8.3) foi aplicado em transformação genética de soja visando silenciamento gênico de fitonematoide. Assim como, pela primeira vez se utilizou um promotor induzido por nematoide para indução de resistência a nematoide.
- Pela primeira vez eventos estáveis de soja GM foram gerados com o intuito de controlar *M. incognita*, assim como é a primeira vez que o gene-alvo do fator de processamento é introduzido estavelmente em soja.
- Pela primeira vez regiões gênicas de diferentes espécies (*M. incognita* e *H. glycines*) foram sequencialmente fusionadas objetivando o co-silenciamento gênico e a indução de resistência a fitonematoides de dois gêneros distintos.
- Os resultados aqui apresentados demonstram que a estratégia de silenciamento gênico tem potencial de reduzir populações de *M. incognita*.

Referências

LI, J.; TODD, T. C.; LEE, J. & TRICK, H. N. Biotechnological application of functional genomics towards plant-parasitic nematode control. *Plant Biotechnol Journal*, v. 9, n. 9, p. 936-44, Dec 2011.

MCCARTER, J. Molecular approaches toward resistance to plant parasitic nematodes. In: (Ed.). *Plant Cell Monographs* v.15, 2008. p.239-267.

RECH, E. L.; VIANNA, G. R. & ARAGAO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols*, v. 3, n. 3, p. 410-418, 2008.

YADAV, B. C.; VELUTHAMBI, K. & SUBRAMANIAM, K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, v. 148, n. 2, p. 219-22, Aug 2006.