

## CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA OBTIDAS COM A FORMA CONSTITUTIVA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *AREB1*

CHARACTERIZATION OF SOYBEAN TRANSGENIC PLANTS OBTAINED FROM ESTABLISH THE FORM FACTOR TRANSCRIPTION *AREB1*

LEITE, J.P.<sup>1</sup>; BARBOSA, E.G.G.<sup>2</sup>; MARIN, S.R.R.<sup>3</sup>; MARINHO, J.P.<sup>2</sup>; FUGANTI-PAGLIARINI, R.<sup>3</sup>; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.<sup>4</sup>; NEPOMUCENO, A.L.<sup>3</sup>; DESIDÉRIO, J. A.<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Bolsista de Mestrado CAPES programa PGMP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp-FCAV, Jaboticabal, SP; e-mail: [jubspaula@hotmail.com](mailto:jubspaula@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR;

<sup>3</sup> Embrapa Soja, Londrina, PR;

<sup>4</sup> Centro Japonês de Pesquisa Internacional para Ciências da Agricultura, Tsukuba, Ibaraki, Japão;

<sup>5</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp-FCAV Jaboticabal, SP.

### Resumo

O melhoramento genético da soja busca, atualmente, o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a condições ambientais adversas, como períodos de seca, cada vez mais severos e frequentes no cenário de mudanças climáticas. A forma constitutivamente ativa *AtAREB1ΔQT* consiste em uma forma mutante do fator de transcrição *bZIP AREB1*, que está envolvido na via ABA dependente de resposta à seca nas plantas. Estudos feitos em *Arabidopsis* mostraram que a forma mutante de *AREB1* aumentou a tolerância à seca nestas plantas. Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi inserir a construção gênica *pBI35SΩ:AtAREB1ΔQT* (*35S:AtAREB1ΔQT*) em soja pelo método de biobalística e caracterizar molecularmente os eventos quanto ao número de cópias e nível da expressão relativa do transgene. Foi também avaliado a segregação dos eventos na geração T<sub>1</sub>. A caracterização molecular quanto ao número de cópias inseridas no genoma vegetal foi realizada pelo uso das metodologias de *Southern blot* e PCR quantitativo (qPCR). Para análise do nível da expressão relativa também se utilizou do método de RT-qPCR. Os resultados confirmaram a integração do transgene no genoma da soja em 12 linhagens independentes, no entanto, o número de cópias inseridas foi diferente para cada linhagem GM obtida, considerando-se ambas as técnicas empregadas. O transgene foi transferido para a primeira geração, porém a segregação nos eventos T<sub>1</sub> não acompanhou as leis Mendelianas. A geração e caracterização molecular dos eventos obtidos auxiliaram na escolha de eventos promissores que serão futuramente avaliados quanto o efeito do transgene na cultura da soja sob condições de deficiência hídrica.

### Introdução

Nos últimos anos, o déficit hídrico nas lavouras de soja tem reduzido consideravelmente os rendimentos do grão, provocando perdas financeiras significativas aos produtores. Em 2012, já se fala em um aumento de 10% no preço da cultura devido à seca que ocorreu em parte do território nacional, diminuindo em até 20% a produtividade no sul do país CONAB (2012).

Atualmente a biotecnologia através da tecnologia do DNA recombinante se tornou mais uma ferramenta viável na obtenção de plantas mais tolerantes a estresses abióticos, como o déficit hídrico. Nos vegetais, a tolerância a esta adversidade ambiental consiste em uma característica controlada por múltiplos locos, tornando a adaptação a esta condição um fenômeno altamente complexo e relativamente difícil de ser trabalhado por métodos clássicos de melhoramento genético. Nesse sentido, as plantas evoluíram para se adaptar a essas diferentes condições através do desenvolvimento de diversas estratégias de defesa, incluindo a regulação da expressão de genes envolvidos na tolerância ao estresse (STOLF-MOREIRA et al., 2011). Deste modo, em resposta a um estresse abiótico, diversas proteínas que atuam

como fatores de transcrição são responsáveis por ativar ou reprimir a expressão de genes de respostas secundárias, resultando assim na tolerância ao estresse (AGARWAL & JHA 2010). O fator de transcrição *AREB1ΔQT* consiste em uma forma constitutivamente ativa do gene *AREB1*. Esse fator possui deleções na região N-terminal da proteína, mas mantém em sua construção o domínio conservado P (região de ativação transcricional) e o domínio nativo de ligação ao DNA *bZIP*. A superexpressão da construção *35S-AREB1ΔQT* em *Arabidopsis* levou à indução da expressão de genes de resposta ao estresse de déficit hídrico como o *RD29B*, mesmo na ausência de ABA, além de aumentar a tolerância à seca nestas plantas GM (FUJITA et al., 2005). Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo introduzir em soja a construção gênica *35S-AREB1ΔQT* e caracterizar molecularmente os eventos quanto ao número de cópias e análise da expressão relativa do transgene. A caracterização dos eventos permitiu a seleção de eventos promissores que serão utilizados em trabalhos futuros para avaliar o efeito do transgene na soja em condições de déficit hídrico.

## Material e Métodos

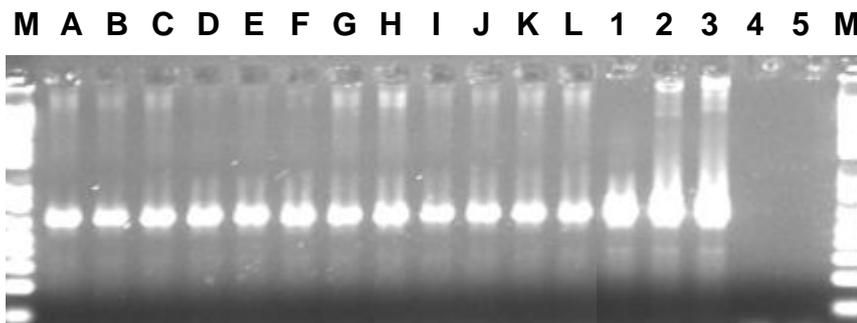
Dois vetores foram co-transformadas via biobalística na cultivar de soja BR16, segundo o protocolo proposto por RECH et al., (2008). O vetor pAC321 contém o gene de seleção *ahas* que confere resistência ao herbicida imazapir, e o vetor *pBI22135S-AREB1ΔQT* contém o gene de interesse. As plantas transformadas foram avaliadas por PCR convencional utilizando 3 diferentes conjuntos de *primers* que amplificam diferentes regiões do gene alvo. *Primers* para o gene de seleção foram também utilizados. Após a identificação dos eventos positivos, as plantas foram levadas para casa de vegetação para aclimação e avanço de geração. Para a análise da segregação foi utilizado o teste do qui-quadrado.

Para análise do número de inserções do transgene foi utilizado a metodologia de *Southern blot*, sendo que o DNA foi digerido com a enzima *HindIII* e em seguida foi hibridizado com uma sonda de DNA radioativo correspondente ao transgene, que foi preparada por ampliações por PCR. A quantificação do número de cópias inseridas foi feita através da metodologia de qPCR, onde o método de detecção utilizado foi o sistema *Taqman*. Para o cálculo do número de cópias foi utilizada a equação  $2^{-\Delta Ct}$ . Para determinar o nível da expressão relativa, o RNA das plantas foi extraído segundo o protocolo com Trizol (*Invitrogen Life Technologies*) conforme as instruções do fabricante, e a seguir as amostras foram tratadas com o kit *DNAse I Amplification Grade*, (*Invitrogen Life Technologies*) para a eliminação de qualquer DNA remanescente nas amostras. Cerca de 200 ng de RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA utilizado o kit *Superscript<sup>®</sup> III First Strand Synthesis System for RT-PCR* (*Invitrogen Life Technologies*). A determinação dos níveis de expressão do gene alvo foi realizada pela quantificação relativa (RT-qPCR) utilizando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

## Resultados e Discussão

Um total de 12 eventos independentes de soja (170, 193, 673, 822, 895, 2619, 2639, 2651, 2654, 2658, 2769, 2770) foram obtidos com a construção *35S-AREB1ΔQT* (Figura 1), levando uma eficiência de transformação de 0,59%. Quando foi avaliada a presença do gene de seleção *ahas*, nenhuma das 12 plantas confirmaram a presença do gene de seleção. A ausência do gene *ahas* pode ter tido várias razões, como a diferença de tamanho entre as construções utilizadas, uma vez que os plasmídeos do gene de interesse *35S:AtAREB1ΔQT* (4.486 pb) e do gene marcador *ahas* (8.673 pb) são discrepantes em mais 4.100 pb, o que pode implicar em uma competição entre os plasmídeos a nível celular. Outro fator a ser considerado, é que visando um melhor enraizamento e recuperação das plantas, uma baixa concentração de 2,5x menor do agente seletivo imazapir foi utilizada no processo de seleção dos tecidos transformados em relação ao protocolo de RECH et al., (2008), o que pode ter resultado em um escape maior do que o esperado, dificultando a seleção dos tecidos transgênicos. Outra hipótese é que, como somente as plantas positivas para o gene alvo foram testadas quanto à presença do gene de seleção *ahas*, plantas contendo o gene *ahas* podem ter sido descartadas. Das 12 plantas identificadas em T<sub>0</sub>, somente 3 (2639, 2651 e 2654) segregaram e passaram o gene para os seus descendentes. Entretanto nenhum dos eventos

segregou conforme a lei de Mendel (3:1) e com isso mostraram uma segregação bastante complexa: 2639 (1:6), 2651 (2:3) e 2654 (1:3). A não transmissão do gene alvo para os descendentes pode ter sido devido a possíveis mecanismos envolvidos na eliminação de transgene, os quais envolvem recombinações intracromossomais, instabilidades genéticas provenientes das manipulações da cultura de tecido e co-eliminação dos transgenes ativada por algum processo de defesa do genoma vegetal (ROMANO et al., 2005). Um total de 28 plantas provenientes dos eventos 2639, 2651 e 2654 foram confirmados como positivas na geração T<sub>1</sub>. A análise pela metodologia de *Southern blot* mostrou que nas 10 plantas T<sub>0</sub> avaliadas para cada evento, o número de inserções variou de 2-7, enquanto que nas 28 plantas T<sub>1</sub>, o número de inserções variou de 2-5. Após as devidas interpretações do número de inserções com os dados da quantidade de transgene pelo método de RT-qPCR foi estimado o número de cópias do transgene para os eventos T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>. Nas plantas T<sub>0</sub>, o número de cópias variou de 2-16 cópias, enquanto que nas plantas T<sub>1</sub> variou de 1-17. A diferença do número de cópias de uma geração para outra pode ser explicado devido ao processo de autofecundação das plantas T<sub>0</sub>, que pode levar a recombinações e rearranjos do transgene. A análise da expressão relativa das plantas T<sub>1</sub>, mostrou que todos os 28 eventos estão expressando o transgene inserido, sugerindo que o local de inserção não está influenciando a expressão do mesmo. Para seleção dos eventos, levou-se em consideração a quantidade de cópias, o nível de expressão relativa e a produção das plantas. Dessa forma os eventos escolhidos para serem utilizados em experimentos futuros foram os: 2639-14 (2-3 cópias), 2651-2 (1-2 cópias) e o evento 2654-14 (11-12 cópias). Estes eventos serão avaliados quanto a resposta do transgene no genoma da soja (Tabela 1).



**Figura 1.** Plantas transgênicas obtidas com o gene de interesse *AtAREB1ΔQT*. 12 eventos foram identificados como positivos para a construção inserida. A reação de PCR foi realizada utilizando o conjunto de iniciador que amplifica um fragmento de 639 pb do gene alvo. M: marcador molecular 1kb plus. A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L: correspondem respectivamente aos eventos positivos 170, 193, 673, 822, 895, 2619, 2639, 2651, 2654, 2658, 2769, 2770. 1, 2, 3, 4, 5 correspondem respectivamente: ao controle positivo *AREB1* construção inteira, controle positivo da construção deletada *AtAREB1ΔQT*, terceiro controle positivo *AREB1*, controle negativo BR16, e branco.

Tabela 1. Eventos escolhidos para experimentos futuros sob condição de déficit hídrico.

	Número de inserções por <i>Southern blot</i>	Quantidade do transgene por qPCR	Número de cópias	Produção de sementes T <sub>2</sub>
2651-2	3	3	1-2	34
2639-14	3	3	1-2	34
2654-14	4	23	11-12	24

## Conclusões

- Foram obtidas plantas de soja com a construção *35S-AREB1ΔQT* e uma eficiência de transformação de 0,59% foi alcançada.
- De um total de 12 plantas positivas T<sub>0</sub>, somente 3 segregaram e passaram o gene para seus descendentes: 2639, 2651 e 2654. No entanto a segregação não seguiu o padrão Mendeliano 3:1 esperado.
- A caracterização molecular dos eventos indicou que o transgene foi inserido e o número de cópias variou de 1-17 entre os eventos.
- Análise de expressão relativa revelou que o transgene foi expresso em todos os eventos avaliados.
- Os eventos selecionados para análises futuras foram os: 2639-14 (2-3 cópias), 2651-2 (1-2 cópias) e o evento 2654-14 (11-12 cópias).

## Referências

AGARWAL, P. K.; JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 201-212, 2010.

CONAB. **CONAB** Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_01\\_10\\_10\\_53\\_02\\_boletim\\_graos\\_40\\_levantamento.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_53_02_boletim_graos_40_levantamento.pdf)> Acesso em 07 de fev de 2012.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATOH, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M. M.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; SHINOZAKI, K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 17 p. 3470-3488, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

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

ROMANO, A.; VAN DER PLAS, L. H. W.; WITHOLT, B.; EGGINK, G.; MOOIBROEK, H. Expression of poly-3-(R)-hydroxyalk-anoate (PHA) polymerase and acyl-CoA-transacylase in plastids of transgenic potato leads to the synthesis of a hydrophobic polymer, presumably medium-chain-length PHAs. **Planta**, v. 220, p. 45-464, 2005.

STOLF-MOREIRA R.; LEMOS E. G. M.; CARARETO-ALVES L.; MARCONDES, J.; PEREIRA, S. S.; ROLLA, A. P. P.; PEREIRA, R. M.; NEUMAIER, N.; BINNECK, E.; ABDELNOOR, R. V.; OLIVEIRA, M. C. N.; MARCELINO, F. C.; FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.



Transcriptional profiles of roots of different soybean genotypes subjected to drought stress.  
**Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, p. 19–34, 2011.