

Otimização do Método de Transformação de Raízes de Soja por *Agrobacterium rhizogenes*

**Kátia Miki Kuma¹, Valéria S Lopes-Caitar², Luciano N Aoyagi¹, Luana M Darben³,
Mayra C C G de Carvalho⁴, Marcia K Kuwahara⁵, Francismar C Marcelino-Guimarães⁵**

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-Paraná, Cx. Postal 10.011, CEP 86.057-970 – E-mail:katiakuma@yahoo.com.br; ²Departamento de Ciência da Computação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Cornélio Procópio-Paraná; ³Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-Paraná; ⁴Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes-Paraná; ⁵Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Soja, Londrina-Paraná.

RESUMO

*Os métodos aplicados à análise funcional de genes são de fundamental importância na validação de resultados obtidos de estudos in silico e/ou da prospecção gênica. Os métodos de transformação gênica para a obtenção de tecidos com expressão transiente e de rápidos resultados são os de maior interesse. Dessa forma, a transformação via *A. rhizogenes* torna-se um método extremamente rápido para a obtenção de plantas contendo raízes transformadas, além de se mostrar eficiente em estudos de superexpressão de genes relacionados a estresses causados por fitopatógenos de raízes. Portanto, o objetivo desse estudo foi aperfeiçoar a metodologia de transformação por *Agrobacterium rhizogenes* em soja. Os principais pontos foram a elevação no número de plantas transformadas e a diminuição do tempo de condução do método, visando sua aplicação em estudos envolvendo a interação da soja com nematoides.*

Palavras-chave: Transformação genética, *Agrobacterium rhizogenes*, aperfeiçoamento do método, alta eficiência.

INTRODUÇÃO

A soja é um produto de grande importância mundial, sendo o Brasil e os Estados Unidos os maiores produtores. Há vários fatores, bióticos e abióticos, que afetam essa cultura, refletindo em sua qualidade e na produtividade de grãos¹.

Dentre os fatores bióticos, as doenças causadas por nematoides constituem as mais prejudiciais à cultura da soja no Brasil. As principais espécies de fitonematoides encontradas no Brasil são as de formadores de galhas (*Meloidogyne spp.*), de cisto (*Heterodera glycines*), de lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) e o reniforme (*Rotylenchulus reniformis*)². Para reduzir os prejuízos causados por esses e outros patógenos faz-se necessário estudos genéticos na tentativa de melhorar a resposta da planta aos estresses. O uso de métodos para estudos funcionais de genes de interesse têm sido amplamente aplicado, além de gerar resultados de extrema relevância para seus fins. Esses estudos podem, por exemplo, caracterizar genes relacionados à resistência a estes patógenos.

A expressão gênica transiente é uma alternativa eficaz, quando o intuito é analisar a função de um gene. A estratégia reduz o tempo para a obtenção dos resultados da pesquisa drasticamente, quando em comparação com os métodos transformação estável. Os métodos para a obtenção de tecidos geneticamente diferenciados de plantas são sistemas rápidos, flexíveis e considerados seguro, uma vez que o transgene não é transmitido para a prole³.

A transformação via *Agrobacterium* utiliza a capacidade desta bactéria de transferir fragmentos de DNA externo para as células das plantas sem danificar a parede celular da mesma⁴, utilizando o T-DNA ou o DNA de transferência. A *Agrobacterium rhizogenes* infecta dicotiledôneas, induzindo proliferação de raízes no local da infecção. A partir desta técnica é possível produzir raízes contendo e expressando o gene de interesse, de forma rápida e eficiente⁵, pois é capaz de gerar plantas quiméricas em que as raízes adventícias estejam transformadas com o transgene e o restante da planta não⁶.

O objetivo desse estudo foi aperfeiçoar a metodologia de transformação por *Agrobacterium rhizogenes* em soja, visando maior eficiência de transformação e recuperação de plantas, bem como a redução no tempo de condução do método.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a padronização do método de transformação de raízes de soja por *Agrobacterium rhizogenes* (cepa K599) foi utilizada a cultivar Williams 82, um genótipo modelo para a soja e amplamente utilizados em estudos genéticos, tendo como base o procedimento descrito por Li e colaboradores (2010).

Na etapa inicial, células de *A. rhizogenes* foram transformadas por eletroporação com o vetor pH7WG2D (Gateway). Esse vetor apresenta o gene *Egfp*, um gene marcador, que codifica para uma proteína de fluorescência verde (GFP - *green-fluorescent protein*) e genes de resistência aos antibióticos espectinomomicina e higromicina.

Sementes de Williams 82 foram esterilizadas (etanol 70% por 10 minutos, depois imersas em solução de hipoclorito 1% por 20 minutos e lavadas com água destilada três vezes). Logo após, foram colocadas em meio ½ MS sólido [8g/L de ágar, ½ MS (Murashige and Skoog 1962), vitamina B5, 1,90 g/LMES, pH5,7] para a germinação (Técnica adaptada Li e colaboradores (2010)).

As transformações das raízes de soja foram realizadas em triplicata, com 100 plantas cada, com 4 e 5 dias após a germinação. No total, 600 plântulas foram conduzidas ao processo de transformação.

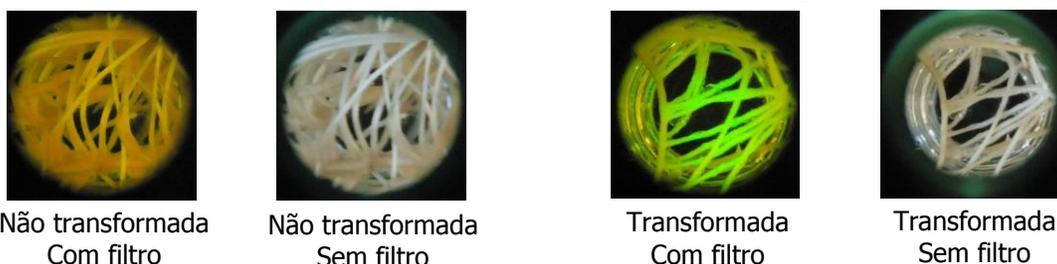
As células de *A. rhizogenes*, já com o vetor de interesse, foram injetadas, ~0,1 mL por planta, por três vezes paralelamente ao feixe vascular do hipocótilo. As plântulas inoculadas foram colocadas em meio de co-cultivo sólido [6g/L de ágar, ½ MS (Murashige and Skoog 1962), vitamina B5, 1,90 g/LMES, 5g/L de sacarose, 1mL/L Dithiothreitol e Tiosulfato de sódio, pH 7,0). Após sete dias de co-cultivo, as plantas foram transferidas para um meio de seleção [8g/L de ágar, MS (Murashige and Skoog 1962), vitamina B5, 1,90 g/L MES, 5g/L de sacarose, pH5,7] contendo 15ug/mL de higromicina e 100ugm/L de cefotaxime, onde foram mantidas por 10 dias. A seleção das raízes transformadas, por excisão das não transformadas ou descarte de plantas sem raízes transformadas, através da observação de *Egfp* em estereomicroscópio de fluorescência Leica MZIII (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Os filtros empregados para a detecção de *Egfp* apresentam um módulo de fluorescência que contém uma lâmpada Leica 106Z de 50 ou 100W de alta pressão e vapor de mercúrio, e dois conjuntos de filtros para *Egfp* (470/40 nm). Após a seleção das plantas com raízes transformadas, essas foram transplantadas para uma etapa de aclimação em hidroponia, por aproximadamente 10 dias. Ao final deste período, as plantas passaram por nova seleção por observação de *Egfp* em estereomicroscópio de fluorescência e excisão das raízes não transformadas ou descarte de plantas sem raízes transformadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de plantas recuperadas em cada etapa foi utilizado para estimar os rendimentos para a metodologia de transformação de raízes de soja por *A. rhizogenes*.

Na etapa inicial, a germinação levou a uma redução no número inicial de sementes utilizadas, sendo recuperadas 73,9% e 83% de plântulas após 4 e 5 dias, respectivamente (Tabela 1). Esses valores influenciaram no número final de plantas com raízes transgênicas obtidas. Durante a padronização, observou-se que a forma de inoculação da bactéria, paralelamente ao feixe vascular do hipocótilo, pode influenciar significativamente a eficiência de transformação. Após o período de co-cultivo das plantas com a *A. rhizogenes*, o rendimento de plantas viáveis foi de 91,5% (4 dias) e 95,7% (5 dias). As plantas viáveis foram transferidas para o meio de seleção, onde permaneceram pelo período de 10 dias. Durante a padronização do método observou-se que períodos prolongados de exposição no meio de seleção, acima de 10 dias, pode inviabilizar o desenvolvimento das plantas. Para a detecção de escapes foi empregado o método de excisão de raízes não transgênicas através da observação da fluorescência ao estereomicroscópio. As raízes transformadas apresentaram fluorescência facilmente observada sob o filtro do microscópio (Figura 1).

Figura 1. Perfil de expressão de GFP em raízes transformadas com *Agrobacterium rhizogenes*



As raízes não transformadas foram excisadas e as plantas que não apresentaram raízes transformadas foram excluídas nesta seleção. Dessa forma, foram transferidas para a etapa de hidroponia somente plantas com raízes transformadas. Os rendimentos da etapa de seleção, em relação ao número inicial de plantas inoculadas, foram de 80,8% para 4 dias e 85,2% para 5 dias.

Durante as padronizações foi observado que após a etapa de seleção (meio de seleção e excisão das raízes não transformadas) as plantas sofriam um estresse hídrico severo. Por esse motivo, foi inserida ao protocolo uma etapa de aclimação, por 10 dias, em sistema de hidroponia. Após a etapa de hidroponia foram contabilizadas as plantas que possuíam raízes viáveis, ou seja, que poderiam ser conduzidas para experimentos de infecção por patógenos como nematoides. Os rendimentos foram promissores, com um total de plantas com raízes transformadas e viáveis de 52,3% e 50,0% de 4 e 5 dia após a germinação, respectivamente. Ao final do processo de transformação foi obtido um rendimento médio de 39,8% de plantas quiméricas (raízes transformadas), considerando a germinação aos 4 e 5 dias. O tempo necessário para obtenção das plantas quiméricas foi reduzido, em 10 dias, quando comparado ao protocolo descrito por Li e colaboradores.

Tabela 1. Rendimento das etapas da transformação da raiz de soja por *Agrobacterium rhizogenes*, em plantas com 4 e 5 dias de germinação.

	Rendimento germinação	Rendimento do co-cultivo	Rendimento na primeira seleção	Rendimento na segunda seleção	Eficiência de transformação após hidroponia
4 dias germinação	73,9	91,5	80,8	52,3	38,5
5 dias germinação	83,0	95,7	85,2	50,0	41,1
Média	78,5	93,6	83,0	51,2	39,8

CONCLUSÕES

Após a padronização do método de transformação os níveis de eficiência alcançados em cada etapa foram superiores aos descritos anteriormente por Li e colaboradores (2010), que obtiveram em média 20% de eficiência na transformação. Na germinação de 5 dias houve maior rendimento, e conseqüentemente, maior número de embriões a serem transformados. A eficiência de transformação não demonstrou diferença quando utilizadas plântulas com 4 ou 5 dias após a germinação. A adição da etapa de hidroponia contribuiu significativamente para maior recuperação das plantas, bem como obtenção de plantas com sistema radicular mais vigoroso. O método se mostrou eficiente, alcançando 39,8% de eficiência geral além de uma redução de 10 dias quando comparado ao apresentado por Li e colaboradores (2010). Espera-se que com este incremento na eficiência obtido, a metodologia possa ser utilizada de modo prático e rápido para estudos de análise funcional de genes em tecido radicular, como por exemplo, de genes envolvidos a resposta à nematoides.

REFERÊNCIAS

- [1] BONATO, E. R. **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000, 254p.
- [2] DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. de S. Nematoides de soja: identificação e controle. **Embrapa: Circular Técnica, 76**. ed.1, 2010.
- [3] VOINNETY, O.; RIVAS, S.; MESTRE, P.; BAULCOMBE, D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*. n.33, p.949–956. 2003.
- [4] LI, J.; PARK, E.; VON ARNIM, A. G.; NEBENFÜHR, A. The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. **Plant Methods**. v.5.n.6. 2009.
- [5] ALPIZAR, E.; DECHAMP, E.; ESPEOUT, S.; ROYER, M.; LECOULS, A.C.; NICOLE, M.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; ETIENNE, H. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. **Plant cell reports**, v 25, n. 9, p. 959-67, set. 2006.
- [6] WEBER, R. L. M.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1070-1075, 2011.
- [7] LI, J.; TODD, T. C.; TRICK, H. N.. Rapid in planta evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants. **Plant Cell Rep**. vol 29. p.113–123, 2010.