

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

Transformação de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]
com plasmídeos e cassetes gênicos contendo
o gene *chit1* de *Metarhizium anisopliae* visando a obtenção
de plantas resistentes a doenças fúngicas

Débora Todt Petry

**Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Bodanese-Zanettini
Co-orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia**

Porto Alegre, março de 2009

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos

Às minhas orientadoras: Não tenho palavras para dizer o quanto seu apoio foi vital, o quanto delas elas colocaram nesse trabalho, nem quantas vezes fui em suas salas buscando conselhos e obtive os mais sábios, e ainda dados com o maior carinho e atenção. Obrigada a vocês, principalmente, pela confiança em mim e pela liberdade na realização deste trabalho. Desde 2004, quando me aceitaram para um estágio sem nem me conhecer, até agora, quando posso dizer que elas continuam as mesmas pessoas de há 4 anos.

Ao Dr. Augusto Schrank e ao doutorando Juliano Boldo, do Laborat. de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da UFRGS, pela ajuda prestada para realização de análise de expressão gênica.

Às minhas maiores amigas: minha mãe e minha irmã. E ao meu maior amigo: meu pai. Felizmente vocês existem, e os tenho ao meu lado nesse momento tão importante. A todos os outros familiares.

Às minhas amigas e amigos: São muitos, com certeza poucos verdadeiros, mas esses fazem a vida ter algum sentido.

Às gurias mais nerds e amadas desse mundo: Ana, Ane, Ine e Mah, que seguirão comigo um novo caminho e farão de cada minuto, um prazer.

À Amber, porque sua simples presença ronronante me deixa alegre, e sua companhia dormindo em cima de meus livros enquanto eu estudava foi fundamental.

Ao biólogo futuro médico mais gurizinho, Fabio, por razões que nem a razão compreende.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	5
Resumo.....	6
Abstract.....	8
Introdução.....	10
Objetivos.....	25
Materiais e Métodos.....	26
Resultados e Discussão.....	34
Conclusões e Perspectivas.....	52
Referências Bibliográficas.....	54

Lista de Abreviaturas

DNA - Ácido desoxirribonucleico

RNA - Ácido ribonucleico

mRNA – RNA mensageiro

cDNA – DNA complementar

DNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

PCR - Reação em cadeia da DNA polimerase

RT-PCR – PCR com transcrição reversa

Resumo

A soja é uma das espécies cultivadas de maior importância econômica para o Brasil, atualmente o segundo maior produtor mundial deste grão. Contudo, doenças causadas por fungos são um dos principais problemas enfrentados pelos produtores de soja, o que leva a grandes perdas. Uma das alternativas para superar este problema é a utilização de cultivares com resistência genética. Com este objetivo, foram realizados quatro experimentos independentes de transformação genética de soja, em que o gene *chit1*, que codifica uma quitinase, enzima capaz de degradar paredes fúngicas, foi transferido para culturas embriogênicas, através da metodologia de biobalística. O gene marcador *hpt*, que confere resistência ao antibiótico higromicina, também foi utilizado. Em três dos experimentos realizados, uma nova metodologia foi testada, em que sequências desnecessárias, presentes nos vetores de transformação, não são colocadas na planta, e sim apenas os cassetes gênicos, contendo regiões regulatórias e codificadoras. No 1º Experimento realizado, foram obtidas plantas transgênicas transformadas com plasmídeos, mas estas não produziram sementes. No 2º Experimento, foi obtida uma linhagem transgênica, oriunda da transformação com plasmídeos. Foi confirmada a presença e a expressão do gene de quitinase em uma planta T₀. Esta planta gerou uma progênie de 16 plântulas. Destas, 10 foram analisadas por PCR e foi confirmada a transmissão do transgene marcador para seis plantas T₁. Análises moleculares complementares são necessárias para a determinação do padrão de herança dos transgenes. Como resultado do 3º Experimento realizado, foram obtidos 3.298 embriões histodiferenciados da cultivar Bragg (2.804 oriundos da transformação com plasmídeos e 494 da transformação com cassetes) e 2.286 para a cultivar IAS (759 com plasmídeos e 1.527 com cassetes). Do 4º Experimento realizado, foram obtidos 1.339 embriões histodiferenciados da cultivar Bragg (1.312 oriundos da transformação com plasmídeos e 27 da transformação com cassetes) e 1.035 para a cultivar IAS5 (851 com plasmídeos e 184 com cassetes). Mesmo considerando a possibilidade de alguns dos embriões obtidos serem escapes à seleção, a resistência ao

antibiótico é um forte indício de transformação estável. Já foram obtidos embriões germinados oriundos da transformação com cassetes, resultantes dos 3º e 4º Experimentos. Com a condição transgênica comprovada, será realizada uma comparação dos padrões de integração gerados por transformação com plasmídeos e cassetes gênicos.

Abstract

Soybean is one of the most important crops in Brazil, which is nowadays the second world largest producer. However, injuries caused by fungus are one of the main problems faced by the producers, causing great losses. One of the possibilities to deal with this problem is the utilization of cultivars with genetic resistance. With this goal, four independent soybean transformation experiments were performed. A chitinase gene, *chit1*, which can break fungal cell walls, was transferred to soybean embryogenic cultures, through the use of biolistic. The selection marker gene *hpt*, which confers hygromycin resistance, was also transferred to the embryos. In three of the performed experiments, a new methodology was tested, where unnecessary sequences, that are part of the transformation vectors, were not introduced into the plant, but only the gene cassettes, which contain regulatory and coding sequences. In the first experiment, transgenic plants were obtained, but they left no progeny. In the second experiment, one transgenic line was obtained from the plasmid transformation. The presence and expression of the chitinase gene in one T₀ plant was confirmed. 16 T₁ plantlets were obtained. 10 were analyzed by PCR, and the transmission of the marker gene to six T₁ plants was confirmed. Further molecular analyses are necessary in order to determine the inheritance pattern of the transgenes. As a result of the 3rd Experiment, 3.298 histodifferentiated embryos of the cultivar Bragg were obtained (2.804 from the plasmid transformation and 494 from the gene cassettes transformation) and 2.286 of the cultivar IAS (759 from the plasmid transformation and 1.527 from the gene cassettes transformation). From the 4th Experiment, 1.339 histodifferentiated embryos were obtained for cultivar Bragg (1.312 from the plasmid transformation and 27 from the cassettes) and 1.035 for IAS (851 from the plasmid transformation and 184 from the cassettes). Even considering the possibility that some of the embryos obtained may have escaped selection, the hygromycin resistance is a great indication of stable transformation. Plants transformed, resulting from the 3rd and 4th experiments, were already obtained with the minimal cassettes. Once their transgenic nature is proved, the

patterns of integration of plasmid transformed plants and cassette transformed plants will be compared.

1. Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma planta originária da China. Pertence à família Leguminosae e à subfamília Faboideae. É uma espécie poliplóide, com $2n=40$. É herbácea, anual, com ciclo de vida variando entre 75 e 200 dias, dependendo da cultivar (Embrapa Soja, 2000).

A agricultura é uma atividade econômica de grande expressão no Brasil e a soja é uma de suas principais culturas. O país é o segundo maior produtor mundial desse grão. No ano de 2008, a produção brasileira de soja foi de 60 milhões de toneladas, uma safra recorde no país, que ocupou 21,3 milhões de hectares (IBGE, 2008). O estado do Rio Grande do Sul se manteve como terceiro maior produtor nacional na safra 07/08, tendo produzido quase 8 milhões de toneladas, cerca de 13% da produção nacional (USDA - *United States Department of Agriculture*, 2008). Estimativas sugerem que o Brasil se tornará o maior produtor mundial nos próximos anos, por apresentar, ainda, condições de expandir a sua área de plantio, ao contrário de países concorrentes. Aproximadamente 70% da soja produzida no Brasil é exportada, embora, ultimamente, esteja havendo incentivos para incrementar o uso interno, principalmente por ser um dos vegetais cujo óleo pode ser utilizado como matéria prima para o biodiesel (Biodieselbr, 2008).

Um problema grave enfrentado pelos produtores de soja desde o estabelecimento deste plantio no Brasil é a infestação das lavouras por fungos, vírus, insetos e nematóides. Juntas, estas pragas são responsáveis pelo aparecimento de 40 doenças. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra (Embrapa Soja, 2000). O número de doenças continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como consequência da monocultura, ocasionando perdas de 15 a 20% da produção anual (Silva, 2004; Balardin, 2005; Campos, 2005).

As doenças causadas por fungos têm sido uma das principais causas de perdas agrícolas desde o estabelecimento da agricultura pelo homem (Melchers e

Stuiver, 2000). O patógeno mais importante atualmente na cultura da soja é o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, que causa a doença “Ferrugem Asiática”. Essa doença vem sendo detectada no Brasil desde a safra 2000/2001 e já se alastrou por quase todas as áreas cultivadas com soja, devido à fácil disseminação dos esporos pelo vento (Vencato, 2005). Desde então, sua presença vem sendo observada a cada nova safra. A “Ferrugem Asiática” se caracteriza pelo desfolhamento precoce das plantas, o que impede a completa formação dos grãos (Vencato, 2005).

A infestação das lavouras de soja leva a acentuadas perdas na produtividade, que têm reflexos bastante negativos na rentabilidade do produtor e na economia dos países produtores, além de afetar o custo dos produtos que chegam ao consumidor final. Na safra brasileira de 2003/2004, por exemplo, as perdas de grãos de soja devido à “Ferrugem Asiática” foram estimadas em 4,6 milhões de toneladas, o que correspondeu ao valor de US\$ 1,22 bilhão (US\$ 266,72/t). Essa doença esteve presente em 70% da área plantada com soja no Brasil. A realização média de 1,5 aplicação adicional de fungicida, em toda essa área, visando controlar a doença, e os gastos com o controle químico (despesas com aplicação), atingiram a estimativa de US\$ 860 milhões (US\$ 38,8/ha tratado). Portanto, o custo total da “Ferrugem Asiática” nessa safra atingiu a quantia de US\$ 2,08 bilhões (Yorinori e Lazzarotto, 2004).

A introdução de variedades com resistência genética a patógenos é uma das estratégias para proteger as plantações de doenças (Honée, 1999). Segundo Li e colaboradores (2004), o controle de doenças fúngicas pode ser efetivamente atingido com o desenvolvimento de cultivares resistentes, sendo esta a forma mais eficaz e econômica de se obter o controle de doenças (Silva, 2004; Silva e Silva, 2005).

Através do uso de melhoramento genético convencional, não se conseguiu o nível de resistência necessário, por causa da rápida evolução dos patógenos, surgindo novas linhagens resistentes. A engenharia genética acelera o processo de obtenção de linhagens resistentes e traz possibilidades de estratégias alternativas para o controle de doenças (Honée, 1999). A grande vantagem da tecnologia da transgenia é permitir ao melhorista cruzar a “barreira de espécie”,

permitindo que genes de outros organismos ou de plantas não relacionadas sejam introduzidos em plantas utilizadas na agricultura (Melchers e Stuiver, 2000).

A transformação genética envolve o isolamento do gene de interesse do genoma de um organismo doador, a clonagem desse gene em um vetor contendo sequências reguladoras para expressão no organismo a ser modificado e a introdução desse vetor nesse organismo (Borém, 2001). A transgênese abre perspectivas de se obter resistências de uma forma que com o melhoramento tradicional não seria possível, devido à ausência de base genética (Melchers e Stuiver, 2000).

Com a diminuição do uso de agrotóxicos, também os consumidores finais são beneficiados, tendo à disposição um alimento com menos resquícios de químicos e com menor preço. O uso de fungicidas e inseticidas provoca impactos no ambiente e é de alto custo, além de que, frequentemente, surgem linhagens resistentes (Melchers e Stuiver, 2000).

1. 1 Embriogênese Somática em Soja

Protocolos de transformação vegetal precisam contar com um sistema eficiente de cultura de tecidos, sendo que as células atingidas devem ser competentes não só para transformação (integração estável), mas, também, para a regeneração de plantas (Potrykus, 1990; Trick *et al.*, 1997). O sucesso na transformação de soja depende da habilidade conjunta de transformação eficiente e técnicas de regeneração (Trick *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2002).

Embriogênese somática é a formação de um embrião a partir de uma célula que não um gameta ou um produto da fusão de gametas. Esse é um processo que ocorre naturalmente em muitas espécies (Merkle *et al.*, 1995). Embriões somáticos possuem meristema apical e radicular, originando plantas completas em condições apropriadas de germinação (Trick *et al.*, 1997).

Em soja, o primeiro relato de embriogênese somática é de Christianson e colaboradores (1983). Em trabalhos de transformação de soja, por muitos anos, foram utilizadas culturas embriogênicas em suspensão como tecido-alvo (Finer e McMullen, 1991; Sato *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1996). Trick e colaboradores (1997)

propuseram um método de transformação que utiliza o estabelecimento e proliferação de embriões somáticos a partir de cotilédones imaturos (Santarém *et al.*, 1997), em um meio semi-sólido descrito por Wright e colaboradores (1991). Com este método, foram obtidas plantas transgênicas de soja em nosso laboratório (Droste *et al.*, 2002; Sachet, 2005; Wiebke, 2005; Weber, 2007; Homrich *et al.*, 2008).

O primeiro relato de plantas de soja transgênicas obtidas através de transformação de embriões somáticos é de Finer e McMullen (1991). Sato e colaboradores (1993) demonstraram que células embriogênicas são as mais adequadas para a produção de plantas de soja geneticamente modificadas, não-quimeras, através de biobalística. A vantagem de utilizar culturas embriogênicas (em suspensão ou em meio semi-sólido) como alvo na transformação de soja é a origem unicelular dos embriões secundários. Assim, uma única célula transformada de um embrião primário é capaz de originar, por embriogênese secundária, uma planta completamente transgênica (Finer, 1988).

Para gerar os embriões somáticos, é necessária uma etapa de indução, na qual cotilédones imaturos de soja são colocados em meio adequado (meio de indução) de embriogênese somática, onde permanecem por 30 dias. A indução de embriogênese somática envolve a alteração de um padrão de expressão gênica esporofítica no explante (nesse caso, os cotilédones) para um novo padrão de expressão nas células embriogênicas do explante (ou seja, os embriões somáticos). Para tanto, é utilizado um meio contendo auxina, que promove indução e proliferação de embriões e evita sua maturação.

Após a indução, os embriões que surgirem precisam ser proliferados, o que é feito em meio contendo menor concentração de auxina, por um período mínimo de 6 meses, com trocas para meio de cultura fresco a cada 15 dias. A cada troca de meio, o material é selecionado, e são mantidos em cultura apenas conjuntos formados por embriões em estágio globular (o primeiro estágio no desenvolvimento de embriões somáticos). Quando linhagens celulares mais jovens que seis meses são utilizadas, o número de eventos estáveis de transformação obtido é geralmente baixo (Hazel *et al.*, 1998).

O desenvolvimento de embriões somáticos envolve as mesmas etapas que embriões zigóticos. São estas: estágio globular, cordiforme, de torpedo e cotiledonar (Santos *et al.*, 2006). A transformação é feita quando os embriões estão em estágio globular e, após um período de seleção em meio contendo antibiótico, os clones transformados são proliferados por aproximadamente dois meses. O processo de seleção das células transformadas é essencial (Lacorte *et al.*, 1999).

Após o período de proliferação, os conjuntos embriogênicos são colocados em meio de maturação, onde ocorrerá a histodiferenciação. A partir dos embriões histodiferenciados pode-se, então, obter a regeneração de plantas.

Uma das desvantagens do uso de embriogênese somática em protocolos de transformação de plantas é a necessidade de se ter disponíveis constantemente no laboratório plantas com vagens e tecido embriogênico em proliferação (Trick *et al.*, 1997). Além disto, o potencial de desenvolvimento de embriões somáticos em soja e de conversão de embriões em plantas é genótipo-específico (Parrott *et al.*, 1989; Bailey *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001; Meurer *et al.*, 2001). Por este motivo, estão sendo continuamente testadas diversas cultivares de soja com o objetivo de identificar aquela(s) que apresente(m) maior potencial de regeneração de plantas via embriogênese somática (Meurer *et al.*, 2001; Droste *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2006).

Em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório, as cultivares IAS5, Vencedora e Bragg foram eficientes em todas as etapas necessárias: Indução de embriogênese somática, maturação/regeneração e conversão a plantas (Droste *et al.*, 2001, 2002; Sachet, 2005; Wiebke, 2005; Weber, 2007; Homrich *et al.*, 2008) e são recomendadas para plantio em vários estados do Brasil (Embrapa Soja, 2000; MAPA, 2007).

1.2 Transformação por Biobalística

Existem, atualmente, inúmeros métodos para introdução de genes em plantas. Os mais utilizados em transformação de soja são a biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* (Trick *et al.*, 1997). Cada um desses métodos

apresenta vantagens e desvantagens [para revisão das metodologias ver Potrykus (1990); Hansen e Wright (1999); Newell (2000); Bodanese-Zanettini e Pasquali (2004)].

A biobalística foi desenvolvida por Sanford (1988; 1990) com o objetivo de introduzir material genético no genoma nuclear de plantas superiores. Essa técnica consiste na aceleração de micropartículas carreando o DNA adsorvido. Essas partículas atravessam a parede celular e a membrana plasmática das células vegetais, de forma não-letal, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Posteriormente, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular, podendo ser integrado no genoma nuclear do organismo receptor (Aragão e Rech, 1998; Lacorte *et al.*, 1999). Esta técnica permite a transferência gênica estável e confiável para a maior parte das espécies de importância agrônômica (Vain *et al.*, 1993), além de ser uma técnica rápida e que envolve pouca manipulação das células em cultura (Potrykus, 1990; Lacorte *et al.*, 1999). Segundo Finer e colaboradores (1992), a maior vantagem desta técnica é a de permitir que tecidos vegetais intactos sejam utilizados como alvo. É uma técnica bastante versátil, podendo ser utilizada para transformação de diferentes tipos de tecidos e células, independentemente do genótipo, o que elimina incompatibilidades biológicas, que impedem a transformação de muitas espécies pelo método que utiliza *Agrobacterium tumefaciens* para a transferência de DNA (Trick *et al.*, 1997). De modo geral, a transformação de meristemas apicais e células embriogênicas tem demonstrado maior eficiência para a obtenção de plantas transgênicas (Lacorte *et al.*, 1999).

Podem ser utilizadas micropartículas de ouro ou de tungstênio como carreadoras de DNA. Estas precisam ter alta densidade, pouca reatividade química, assim como tamanho e formato adequados. Para células vegetais, partículas com diâmetro em torno de 0,2 a 1,5 μm são as mais indicadas (Aragão e Rech, 1998; Bodanese-Zanettini e Pasquali, 2004).

Para a utilização do método de biobalística, diferentes sistemas, capazes de acelerar micropartículas cobertas com sequências de DNA a velocidades superiores a 1.500 Km/h, foram desenvolvidos e construídos. Finer e colaboradores (1992) desenvolveram um equipamento que utiliza gás hélio sob

baixa pressão (*Particle Inflow Gun* ou PIG), cujas vantagens são a eficiência, a simplicidade de utilização e, principalmente, o baixo custo. Inúmeros trabalhos relatam transformação estável de soja utilizando esse equipamento (Vain *et al.*, 1993; Hunold *et al.*, 1994; Ponappa *et al.*, 1999), inclusive os realizados no Laboratório de Transformação Genética de Plantas do Departamento de Genética da UFRGS (Droste *et al.*, 2002; Sachet, 2005; Wiebke, 2005; Weber, 2007; Homrich *et al.*, 2008).

Mesmo nos melhores sistemas experimentais, apenas uma pequena fração da população total de células será atingida por uma partícula, e destas, nem todas irão expressar o gene introduzido. Esta baixa eficiência torna necessário o uso de um protocolo eficiente de seleção e regeneração das plantas transformadas. A frequência desfavorável entre o total de células bombardeadas e o total de células que foram estavelmente transformadas é, provavelmente, a maior limitação desta técnica (Hunold *et al.*, 1994). Ainda segundo Hunold e colaboradores (1994), apenas 7 a 10% das partículas bombardeadas penetram nas células, e a maior parte dessas atinge apenas as células epidérmicas. Estes mesmos autores observaram que apenas 0,04% de todas as células utilizadas no experimento, feito com um aparelho de *Particle Inflow Gun*, haviam sido transformadas de forma estável. Essa baixa eficiência de transformação foi atribuída ao fato de que a maioria das células que recebe uma partícula, seja esta de ouro ou tungstênio, morre nas primeiras 48 horas após o bombardeio. Estes autores observaram, também, que, em geral, as células que recebem uma partícula e sobrevivem, incorporam estavelmente o transgene.

Nos sistemas de transferência direta de DNA (eletroporação, biobalística e microinjeção), um fator limitante para obtenção de plantas transgênicas é a baixa frequência de integração estável do DNA. Esta integração pode variar de menos de 1 a 5% das células inicialmente transformadas (Lacorte *et al.*, 1999). O método de biobalística produz facilmente expressão gênica transiente, mas a transição de transformação transiente para estável é muito ineficiente. Entre milhares de eventos de expressão transiente, há apenas alguns poucos eventos de integração estável (Potrykus, 1990; Luthra *et al.*, 1997).

Uma vez que o DNA esteja dentro do núcleo, a sua integração depende de proteínas da célula vegetal envolvidas na replicação do DNA, na sua reparação e nos eventos de recombinação (Kohli *et al.*, 2003). No entanto, o mecanismo de integração do DNA exógeno ainda é pouco conhecido e a posição em que ocorre a integração e a estrutura do locus podem variar entre diferentes transformantes. A estrutura de um locus transgênico exerce grande influência no nível e na estabilidade de expressão de um transgene (Kohli *et al.*, 2003). A maioria dos eventos de integração ocorre em regiões teloméricas e subteloméricas, que são regiões normalmente ricas em genes (Kohli *et al.*, 2003). A biolística geralmente gera locus grandes e com muitas cópias do transgene (Kohli *et al.*, 2003).

1.3 Transformação com Cassetes Gênicos

A maior parte dos trabalhos publicados de transformação vegetal envolve a introdução nas plantas de vetores (plasmídeos) contendo o(s) gene(s) de interesse. Existem poucos relatos de experimentos de transformação realizados com **cassetes gênicos** (ou cassetes mínimos), os quais contêm apenas a sequência nucleotídica do gene de interesse, flanqueada pelas sequências reguladoras. Nestes trabalhos, observou-se que a ausência das sequências de DNA do vetor (*vector backbone sequences*) apresentou determinadas vantagens. Nandadeva e colaboradores (1999) fizeram uma comparação entre o uso de plasmídeos circularizados e linearizados; com os últimos, obtiveram um aumento de duas vezes na frequência de transformação estável. O primeiro trabalho com cassetes mínimos foi o de Fu e colaboradores (2000), que transformaram arroz (*Oryza sativa*) e observaram padrões de integração simples e em baixo número de cópias, com a eficiência de co-transformação mostrando-se inalterada. Outros trabalhos envolvendo a transformação com cassetes gênicos estão mostrados na **Tabela 1**, na qual estão salientados alguns dos principais resultados obtidos pelos autores.

Tabela 1: Resumo dos principais resultados obtidos nos trabalhos de transformação com cassetes gênicos disponíveis nos bancos de dados.

Ano	Autores	Cultura	Resultados Principais
2000	Fu <i>et al.</i>	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	- Com cassetes: Padrões de integração simples; baixo número de cópias; expressão estável - Mesma frequência de co-transformação com plasmídeos e cassetes
2002	Breitler <i>et al.</i>	Arroz (<i>O. sativa</i>)	- Com cassetes: Padrões de integração simples; baixo número de cópias - 70 a 80% da eficiência de transformação obtida com plasmídeos
2002	Loc <i>et al.</i>	Arroz (<i>O. sativa</i>)	- Com cassetes: Padrões de integração simples; maior expressão
2003	Romano <i>et al.</i>	Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	- Com cassetes: Taxa de co-transformação de 73% - Análise de expressão: Sem diferenças entre plasmídeos e cassetes
2006	Vidal <i>et al.</i>	Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	- Com cassetes: Expressão estável comprovada - Sem diferença no número de sítios de integração

Breitler e colaboradores (2002), transformando *O. sativa*, obtiveram com cassetes 70 a 80% da eficiência de transformação obtida com plasmídeos. Loc e colaboradores (2002) utilizaram o sistema de cassetes mínimos para introduzir duas proteínas inseticidas em *O. sativa*, sendo este o primeiro trabalho feito com cassetes para introduzir características de interesse agrônômico. Em trabalho feito com batata (*Solanum tuberosum*, Romano *et al.*, 2003), foram obtidas plantas transformadas com cassetes e uma taxa de co-transformação de 73% foi observada. Vidal e colaboradores (2006) utilizaram cassetes mínimos para

transformação de uva (*Vitis vinifera*) e confirmaram a eficiência desta técnica para a espécie em estudo.

Há vários motivos pelos quais a transformação com cassetes gênicos seria vantajosa em relação à transformação com plasmídeos, cujas sequências trariam efeitos negativos. Plantas transformadas por biobalística têm uma tendência a ter múltiplos eventos de integração. A presença de múltiplas cópias do transgene pode levar ao silenciamento. Além disto, pode ocorrer o rearranjo dos transgenes, pela presença de "pontos quentes" para recombinação. Já foram registrados na literatura, em várias espécies de plantas, diversos casos de silenciamento gênico dependente de homologia (Matzke *et al.*, 1996; Hadi *et al.*, 1996).

Analisando o silenciamento gênico em duas linhagens de soja transformadas por biobalística, Reddy e colaboradores (2003) detectaram um número extremamente alto (entre 60 e 100) de cópias dos transgenes. Nos casos em que o transgene estava silenciado, foi observado alto grau de metilação na região promotora e estrutural. Estes mesmos autores sugerem o uso de cassetes mínimos como opção para minimizar a ocorrência de silenciamento.

As sequências com origem bacteriana ajudam a "marcar" os transgenes como DNA exógeno, devido às suas sequências de bases não usuais, ricas em AT. Segundo Breitler e colaboradores (2002), proteínas eucarióticas não se ligam eficientemente a sequências bacterianas, o que pode fazer com que longas sequências de vetor fiquem "disponíveis" para as metiltransferases vegetais. A metilação é uma das causas de silenciamento gênico observado em soja (Reddy *et al.*, 2003). Além disso, o padrão de metilação tende a se espalhar pelas sequências contíguas aos transgenes (Breitler *et al.*, 2002).

Outro problema relatado na literatura é que transgenes grandes são instáveis durante a divisão meiótica, o que pode resultar na sua perda após alguns ciclos de divisão celular (Breitler *et al.*, 2002).

Kohli e colaboradores (2003) denominam a transformação com cassetes gênicos de "transformação limpa", a qual teria efeito profundo na organização do locus e expressão do transgene, provavelmente aumentando a estabilidade da expressão deste. Tal efeito ocorreria pelo fato de que o DNA do cassete estaria em uma forma relaxada, e, assim, menos suscetível a quebras.

Todos os efeitos acima mencionados podem modificar não apenas a expressão dos transgenes, mas também dos genes endógenos da planta.

Uma outra questão importante é que vetores plasmidiais contêm origens de replicação bacterianas e genes de resistência a antibióticos. A persistência dessas sequências em plantas transgênicas liberadas no ambiente é considerada indesejável por órgãos de biossegurança (Breitler *et al.*, 2002).

Pelo acima exposto, torna-se interessante a realização de experimentos visando a comparação entre a frequência e os padrões de integração estável do transgene, quando introduzido sob a forma de plasmídeos e sob a forma de cassetes gênicos. Não há relatos na literatura de uso de cassetes gênicos para transformação de soja.

1.4 Co-Transformação

É necessário utilizar na transformação, além do gene de interesse, também um **gene marcador de seleção**, o qual possibilitará a identificação do material transformado. Existem alguns métodos para a obtenção de plantas livres de genes marcadores, como a co-transformação, o sistema de recombinação *Cre/lox*, os genes marcadores positivos e os elementos de transposição (Para detalhes, ver Bodanese-Zanettini e Pasquali, 2004). Destes, a co-transformação é o método mais simples (Bodanese-Zanettini e Pasquali, 2004).

A técnica de co-transformação permite que os genes de marcação e de interesse sejam segregados na progênie das plantas transgênicas, desde que esses tenham se inserido em loci diferentes, não ligados (Aragão e Brasileiro, 2002; Scutt *et al.*, 2002). A frequência de co-transformação é de aproximadamente 100%, para genes ligados (mesmo plasmídeo ou mesmo cassete), e de 50%, para genes em plasmídeos ou cassetes separados (Aragão e Brasileiro, 2002). Trabalhos anteriores do nosso grupo obtiveram frequências de co-transformação variáveis: Sachet (2005) obteve 44% e 50%, com duas cultivares diferentes de soja; Homrich e colaboradores (2008) obtiveram uma frequência de co-transformação de 33% com a cultivar IAS5.

Apesar de não haver sido detectado nenhum risco proveniente dos genes de seleção para antibióticos no consumo humano e no ambiente, é recomendado que plantas transgênicas comercialmente utilizadas não os possuam. Esta preocupação advém, por exemplo, da possibilidade de transferência horizontal do transgene marcador das células vegetais para bactérias patogênicas presentes no trato intestinal humano (Bodanese-Zanettini e Pasquali, 2004).

Um dos genes de seleção mais utilizados em transformação vegetal é o gene *hpt* de *Escherichia coli*. Esse gene codifica a enzima higromicina fosfotransferase (HPT), que confere resistência ao antibiótico higromicina B. A proteína HPT catalisa a fosforilação do grupo hidroxil do antibiótico, inativando-o. Quando ativo, este antibiótico age interrompendo a síntese protéica (Aragão e Brasileiro, 2002) e é bastante efetivo e específico para a seleção de embriões somáticos transformados de soja (Finer e McMullen, 1991).

1.5 Fontes de Resistência para Doenças Fúngicas

Há relatos na literatura de vários genes que poderiam aumentar a resistência de plantas a fungos. Segundo Punja (2001), as abordagens podem ser divididas em 5 categorias:

- 1)** Proteínas diretamente tóxicas ao patógeno: enzimas hidrolíticas (quitinases, glicanases), proteínas antifúngicas (osmotinas), peptídeos antimicrobianos (tioninas, defensinas, lectinas), proteínas inativadoras de ribossomo e fitoalexinas (compostos com atividade antimicrobiana, produzidos naturalmente por plantas);
- 2)** Proteínas que destroem ou neutralizam um componente do fungo, como poligalacturonase, ácido oxálico e lipase;
- 3)** Proteínas que aumentem as defesas estruturais das plantas, como peroxidase (degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos) e lignina (confere rigidez e impermeabilidade);
- 4)** Substâncias que regulam a defesa da planta, como peróxido de hidrogênio, ácido salicílico e etileno;

5) Substâncias envolvidas na resposta hipersensitiva (defesa contra patógenos) e em interações com fatores de virulência.

Os genes mais utilizados para promover resistência a fungos em plantas transgênicas são os genes de enzimas hidrolíticas, quitinases e glicanases (Punja, 2001). Como as quitinas e glicanos são os principais componentes das paredes celulares de fungos, é esperado que a expressão dessas enzimas em células vegetais provoque a lise das hifas e, assim, redução no crescimento dos fungos (Mauch e Staehelin, 1989). Quitinases e glicanases são capazes de degradar componentes das paredes celulares de fungos e demonstraram forte atividade antifúngica *in vitro* (Salmeron e Vernooij, 1998).

Diversos trabalhos registram obtenção de resistência parcial ou total a doenças fúngicas em plantas transformadas. Em soja, em particular, há poucos trabalhos. Cober e colaboradores (2003) avaliaram em campo uma linhagem de soja transgênica, transformada com um gene de oxalato oxidase de trigo (*Triticum aestivum*). Esta linhagem apresentou resistência parcial ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (causador do “mofo branco”), pois este fungo utiliza ácido oxálico para invadir células saudáveis. A linhagem transformada foi agronomicamente tão viável quanto linhagens não-transgênicas da mesma cultivar. Li e colaboradores (2004) obtiveram seis linhagens de soja transgênica expressando uma quitinase de feijão e uma proteína Rip (“*ribosome-inactivating protein*”) de cevada, mas não foi comprovado que tais modificações aumentem a resistência dessas linhagens a moléstias fúngicas. Este é o primeiro relato de transformação de soja com dois genes ao mesmo tempo visando resistência a fungos, e os autores ressaltam a importância da utilização de duas ou mais fontes de resistência. Em nosso laboratório, Weber (2007) obteve plantas transgênicas de soja adultas e férteis através da utilização dos mesmos protocolos descritos no presente trabalho. As plantas expressaram altos níveis de uma osmotina de *Solanum nigrum* e, após bioensaios *in planta*, foi comprovada resistência aumentada aos fungos *Phytophthora sojae* e *Erysiphe diffusa* (R. Weber, comunicação pessoal).

As plantas possuem numerosos mecanismos de defesa contra patógenos; entre eles, estão as quitinases e glicanases. Em específico, quitinases são

encontradas em todos os órgãos vegetais e acredita-se que estejam envolvidas não apenas no processo de defesa, mas também em processos relacionados a crescimento e desenvolvimento. Sabe-se que estas proteínas são induzidas na resposta à infecção de patógenos e em diversas situações de estresse (Kasprzewska, 2003). Mauch e Staehelin (1989) propuseram um mecanismo de ação antifúngica para as quitinases e glicanases presentes no feijão (*Phaseolus vulgaris*). Os autores demonstraram que essas enzimas ficam estocadas nos vacúolos; assim, no momento da morte da célula, essas enzimas seriam liberadas, chegando até as hifas dos fungos em alta concentração, não dando tempo ao fungo de adaptar-se.

A quitina é um polissacarídeo, formado por subunidades de N-acetil-D-glicosamina e que confere rigidez e resistência à degradação microbiana. Está presente em exoesqueletos de artrópodes, paredes celulares de fungos e algumas algas e conchas de crustáceos (Bonfim *et al.*, 2006).

Um gene (*chit1*) foi isolado do fungo *Metarhizium anisopliae* por Bogo e colaboradores (1998) no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia da UFRGS. *M. anisopliae* é um fungo entomopatogênico, utilizado no controle biológico de insetos, em países como China, Rússia e Brasil (Batista Filho, 2003). Quitinases, assim como lipases e proteases, são produzidas pelo fungo *M. anisopliae* em cultura, na presença de cutículas de insetos, pois estas são importantes proteínas relacionadas à patogênese (Bogo *et al.*, 1998).

O gene *chit1* (Número de acesso *GenBank*: AFO27498) codifica uma quitinase de 423 resíduos de aminoácidos, chamada CHIT42. Esta proteína foi expressa em *Escherichia coli* (Baratto *et al.*, 2003) e se mostrou ativa contra glicol-quitina, dímeros e tetrâmeros de N-acetil-D-glicosamina; estas atividades levaram os autores a concluir que esta enzima atua como uma endoquitinase, o que significa que a clivagem de quitina ocorre ao acaso, em pontos internos da molécula, liberando múltímeros de N-acetil-D-glicosamina.

Em trabalho realizado previamente com o gene *chit1* foram obtidas plantas transgênicas de tabaco com resistência aumentada ao fungo *Rhizoctonia solani* (Kern, 2003). A expressão do gene da quitinase CHIT42 nas plantas transgênicas

de tabaco foi demonstrada pela técnica de *Western-blot*. Algumas das plantas que produziram a proteína CHIT42 também apresentaram atividade quitinolítica em ensaios *in vitro*.

Segundo Boller e colaboradores (1983) e Kasprzewska (2003), quitinases também teriam atividade de lisozima, ou seja, teriam capacidade de degradar carboidratos de alto peso molecular presentes em paredes bacterianas. Além disso, a expressão constitutiva de quitinases em plantas transgênicas também poderia levar à resistência a insetos que possuem quitina em sua membrana peritrofica ou cutícula (Kern, 2003).

OBJETIVOS

Geral:

Tendo em vista o que foi exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma linhagem de soja com resistência aumentada para doenças fúngicas. A estratégia de co-transformação por biolística foi a metodologia escolhida para a inserção do gene *chit1* de *Metarhizium anisopliae* e do gene marcador *hpt* em cassetes gênicos e plasmídeos diferentes. Como tecido vegetal alvo foram utilizados embriões somáticos das cultivares IAS5, Bragg e Vencedora de soja.

Específicos:

- Iniciar culturas de embriões somáticos de soja, proliferá-los e transformá-los, através de biobalística, com plasmídeos e cassetes gênicos;
- Selecionar o tecido transformado e regenerá-lo para obter plantas possivelmente transformadas;
- Verificar se as plantas obtidas contêm os genes *hpt* e *chit1*, através de PCR;
- Verificar a expressão do gene *chit1*, em nível de RNA, através de RT-PCR;
- Analisar a geração T₁ através de PCR para avaliar a presença dos genes *hpt* e *chit1*;
- Verificar a eficiência da técnica de transformação através da utilização de cassetes gênicos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Tecido-alvo

Foram utilizados embriões somáticos de soja como tecido alvo para a transformação. Primeiramente, foi feito o plantio de sementes, fornecidas pela Embrapa Soja (Londrina, Paraná) na Faculdade de Agronomia da UFRGS. Vagens imaturas foram coletadas, desinfetadas com álcool 70%, por um minuto, e hipoclorito de sódio 3%, por 20 minutos. O eixo embrionário de sementes imaturas com 3-4 mm foi retirado e cada cotilédone foi colocado em placa de Petri com a face abaxial em contato com o meio de cultura MSD40, contendo a auxina 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) (**Tabela 2.1**).

Tabela 2.1 Componentes dos meios de indução, proliferação, maturação e regeneração utilizados na cultura de embriões somáticos de soja.

Meio de Cultura	Componentes
MSD40 - Indução	Sais de MS*; vit. B5**; 2,4 D 40 mg l ⁻¹ ; 3% sacarose; 0,3% Phytagell TM ; pH 7,0.
MSD20 – Proliferação	Sais de MS*; vit. B5**; 2,4 D 20 mg l ⁻¹ ; 3% sacarose; 0,3% Phytagell TM ; pH 6,4.
MSM6 - Maturação	Sais de MS*; vit. B5**; 6% sacarose; 0,3% Phytagell TM ; pH 6,4.
MSO - Regeneração	Sais de MS*; vit. B5**; 3% sacarose; 0,3% Phytagell TM ; pH 6,4.

*Sais de MS: Murashige e Skoog, 1962.

**Vitaminas do B5: Gamborg e colaboradores (1968).

Vinte cotilédones foram colocados em cada placa, sendo mantidos durante todo o experimento à temperatura média de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas.

Após 30 dias de exposição ao meio MSD40, os conjuntos embriogênicos foram destacados da superfície dos cotilédones e proliferados em meio MSD20 (**Tabela 2.1**), com subculturas a cada 14 dias, por um período de seis meses.

2.2 Experimentos de Transformação

Ao todo foram realizados 4 experimentos de transformação no decorrer desse trabalho, os quais são detalhados a seguir.

No **1º experimento**, foi utilizada a cultivar IAS5. Foram bombardeadas 24 placas de Petri, cada uma contendo 15 conjuntos de embriões somáticos (**Tabela 2.2**). Doze placas foram bombardeadas com os plasmídeos pMOG463*chit1* (Kern, 2003), que contém o gene da endoquitinase CHIT42 de *M. anisopliae* e com o plasmídeo pUC18Hyg (G. Pasquali, comunicação pessoal), que contém o gene *hpt*, de *Escherichia coli*, que codifica a enzima higromicina fosfotransferase. A concentração de plasmídeos utilizada foi de 1 µg µl⁻¹ e as quantidades foram 4 µl de pMOG463*chit1* para 1 µl de pUC18Hyg. As doze placas restantes foram bombardeadas com os **cassetes** dos genes *chit1* e *hpt* (ambos a 500 ng µl⁻¹), nas quantidades de 8 µl e 2 µl de DNA em cada preparação, respectivamente.

Tabela 2.2 Detalhes acerca dos quatro experimentos de transformação realizados: Cultivares, número de conjuntos de embriões colocados em cada placa, número total de placas e número total de conjuntos de embriões utilizados.

Experimento	1°	2°	3°	4°
Cultivares	IAS5	IAS5/Vencedora/ Bragg	IAS5/Bragg	IAS5/Bragg
Conjuntos de embriões por placa	15	15	15	20
Número total de placas	24	12	20	24
Número total de conjuntos	360	180	300	480

Para a obtenção dos cassetes gênicos, o plasmídeo pMOG463*chit1* foi clivado com a enzima *SacI* e o plasmídeo pUC18Hyg com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Após as clivagens necessárias, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídeo, e o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta. Após a eletroforese haver separado as bandas dos vetores das bandas dos cassetes, a região do gel correspondente à migração dos cassetes foi removida e o DNA contido na mesma foi purificado através do kit “Concert™ Rapid Gel Extraction System” (Life Technologies). Os cassetes gênicos foram, então, concentrados a 500 ng μl^{-1} .

Os cassetes gênicos que contêm os genes *chit1* e *hpt* têm tamanho aproximado de 2,4 Kb e 2,1 Kb, respectivamente. Ambos os genes estão sob o controle do promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve flor e do terminador do gene da nopalina sintase (*nos*) de *Agrobacterium tumefaciens*, conforme a **Figura 2.1**.

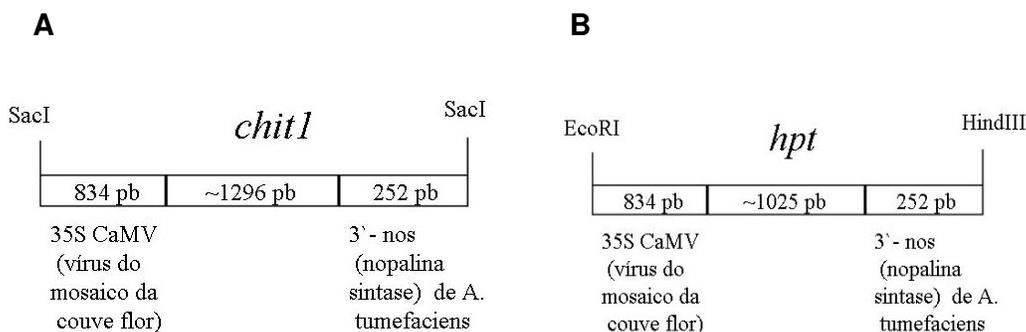


Figura 2.1: Cassetes gênicos utilizados no experimento de transformação.
A) Cassete contendo o gene *chit1*; **B)** Cassete contendo o gene *hpt*.

No **2º experimento**, foram utilizadas as cultivares IAS5, Bragg e BRSMG 68 Vencedora. Foram bombardeadas 12 placas de Petri, cada uma contendo 15 conjuntos de embriões somáticos, na seguinte proporção: 6 placas de IAS5, 3 de Bragg e 3 de Vencedora (**Tabela 2.2**). Todas as placas foram bombardeadas com os plasmídeos pMOG463*chit1* e pUC18Hyg, descritos no item anterior. A

concentração de plasmídeos utilizada foi de $1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ e as quantidades foram $4 \mu\text{l}$ de pMOG463*chit1* para $1 \mu\text{l}$ de pUC18Hyg.

No **3° experimento**, foram utilizadas as cultivares IAS5 e Bragg (**Tabela 2.2**). Foram bombardeadas 20 placas de Petri (10 da cultivar IAS5 e 10 da cultivar Bragg), cada uma contendo 15 conjuntos de embriões. Metade das placas de cada cultivar foi bombardeada com plasmídeos e a outra metade com cassetes gênicos.

Neste experimento, o plasmídeo pUC18*chit1* foi utilizado na transformação, juntamente com o plasmídeo pUC18Hyg, já descrito. O plasmídeo pUC18*chit1* foi construído pela transferência do cassete gênico contendo o gene *chit1* do plasmídeo pMOG463*chit1* para o plasmídeo pUC18. O plasmídeo pMOG463*chit1* foi clivado com a enzima *SacI* e o fragmento, após ter sido purificado do gel de agarose, foi preenchido pela DNA-polimerase, fragmento de Klenow, e dNTPs. Após, foi feita a ligação no vetor pUC18, previamente clivado com *SmaI* e defosforilado. Todos esses procedimentos foram realizados de acordo com Sambrook e Russel (2001). A clonagem foi confirmada através de PCR, clivagem e sequenciamento (dados não mostrados).

Os cassetes foram amplificados dos mesmos plasmídeos utilizados na transformação. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para geração dos cassetes foram: 35SFor 5' CCCAGATTAGCCTTTTCAA 3' e NOSRev 5' CCGATCTAGTAACATAGATG 3'. As condições de amplificação foram: 5 min. de desnaturação a 94°C ; 30 ciclos de: 1 min de desnaturação, a 94°C , 1 min de anelamento, a 54°C e 2 min de extensão, a 72°C ; e um ciclo final de extensão de 5 min. a 72°C . Após a amplificação, os cassetes foram purificados com o auxílio do kit "Wizard R SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega).

A concentração de plasmídeos utilizada foi de $1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ e as quantidades foram $4 \mu\text{l}$ de pUC18*chit1* para $1 \mu\text{l}$ de pUC18Hyg. A concentração de cassetes utilizada foi de $500 \text{ ng} \mu\text{l}^{-1}$, nas quantidades de $8 \mu\text{l}$ e $2 \mu\text{l}$ de DNA dos cassetes dos genes *chit1* e *hpt*, respectivamente.

No 4º **experimento**, foram utilizadas as cultivares IAS5 e Bragg (**Tabela 2.2**). Foram bombardeadas 24 placas de Petri, cada uma contendo 20 conjuntos de embriões. Metade das placas foi bombardeada com plasmídeos e a outra metade com cassetes gênicos; metade das placas contendo a cultivar IAS5 e a outra metade contendo Bragg. Foram utilizados os mesmos plasmídeos e cassetes descritos para o 3º **experimento**, nas mesmas concentrações.

2.3 Transformação Genética

O método de transformação genética utilizado foi o bombardeamento de partículas. Foi utilizado um acelerador de partículas de baixa pressão (cerca de 60 psi) de gás hélio [ou *Particle Inflow Gun* – PIG (Finer *et al.*, 1992)] construído no Departamento de Física da UFRGS. O bombardeamento foi realizado três dias após a transferência do material vegetal para meio de proliferação fresco. Foram posicionados 15 ou 20 conjuntos de embriões globulares no centro de cada placa, de acordo com o experimento. Antes do bombardeio, as placas foram abertas por 15 minutos em capela de fluxo laminar, para que houvesse uma parcial desidratação da superfície do tecido e redução da pressão de turgor, evitando grandes danos às células durante o bombardeio (Finer e McMullen, 1991; Vain *et al.*, 1993; Droste *et al.*, 2002).

A preparação do DNA a ser introduzido nas células foi realizada da seguinte forma: foram adicionados ao DNA 25 µl de tungstênio suspenso em água destilada estéril, a 100 mg ml⁻¹. A seguir, foram adicionados à suspensão 25 µl de CaCl₂ 2,5 M e 10 µl de espermidina 0,1 M. Após uma incubação em gelo por 5 minutos, 45 µl do sobrenadante foram descartados, e o precipitado foi suspenso no volume de solução restante (cerca de 15 µl). Para cada disparo foram utilizados 2 µl da preparação. A preparação com o DNA foi colocada no centro de uma rede, em um filtro de seringa estéril, que foi, então, acoplado à câmara de vácuo do PIG. A placa contendo o material vegetal foi posicionada a 15 cm do filtro. À distância de nove cm do filtro foi colocada uma rede de nylon. Esta rede teve a finalidade de evitar o espalhamento dos embriões como resultado do choque com as partículas, propiciando, também, uma melhor distribuição das

partículas bombardeadas (Vain *et al.*, 1993). Após cada bombardeio, o material foi mantido na mesma placa de Petri.

2. 4 Seleção e Proliferação

Após o bombardeio, os embriões permaneceram no meio de proliferação (MSD20) por 15 dias. A seguir, foram transferidos para meio de proliferação MSD20 contendo o antibiótico higromicina, na concentração de 12,5 mg l⁻¹. Após duas semanas neste meio, os embriões foram mantidos por dois meses e meio em MSD20 contendo higromicina a 25 mg l⁻¹, com trocas para meio fresco a cada 15 dias, completando-se, assim, três meses de seleção. Após esse período, as porções de tecido higromicina-resistentes foram colocadas em meio de proliferação MSD20 sem higromicina, visando à multiplicação dos embriões somáticos oriundos de cada evento de transformação, por embriogênese secundária. O período total de proliferação foi de três meses, com trocas para meio fresco a cada 15 dias.

2. 5 Maturação e Regeneração

Todos os conjuntos de embriões globulares obtidos no final da etapa anterior foram colocados em meio de maturação MSM6 (**Tabela 2. 1**). Após 30 dias nesse meio, os embriões foram individualizados, na medida do possível, e transferidos para meio MSM6 fresco, onde permaneceram por mais 30 dias. Os embriões histodiferenciados obtidos nessa etapa passaram por um processo de dessecação em placa de Petri sem meio de cultura (Buchheim *et al.*, 1989). Após a dessecação, os embriões foram colocados em meio de regeneração MSO (**Tabela 2. 1**). De acordo com seu crescimento, os embriões germinados e/ou convertidos foram colocados em vidros contendo o mesmo meio MSO. As plântulas obtidas foram transferidas para copos plásticos contendo vermiculita, cobertos com papel filme, sendo gradualmente expostas à umidade do ambiente. Após esse período de aclimação a condições *ex vitro*, as plantas foram

transferidas para vasos com terra orgânica e permaneceram em casa de vegetação, com temperatura média de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

2.6 Extração de DNA e Quantificação

Para extração do DNA genômico de folhas e de embriões que não se converteram em plantas foi utilizado o método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). A quantificação das amostras foi realizada utilizando-se o sistema Qubit™ (“Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit”; Invitrogen).

2.7 Reação em Cadeia da DNA Polimerase

O DNA de cada amostra foi amplificado em um volume final de 25 μl . Cada reação continha 100 μM de dNTPs, 1 U de *Taq* DNA-polimerase (Invitrogen, 5 U μl^{-1}), tampão de reação 1X contendo 2,5 mM de MgCl_2 , 100 nM de cada oligonucleotídeo e 100 ng de DNA. Como controle positivo das reações de amplificação foram utilizados os plasmídeos pMOG463*chit1* ou pUC18*chit1* para o gene *chit1* e pUC18Hyg para o gene *hpt*, nas concentrações de 50 ng. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão apresentadas na **Tabela 2.3**; estes oligonucleotídeos iniciadores amplificam uma região de 622 pb do gene *hpt* e uma região de 750 pb do gene *chit1*.

Tabela 2.3: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos dos genes *hpt* de *E. coli* e *chit1* de *M. anisopliae* de embriões e plantas de soja.

Genes	Plasmídeos (Controles positivos)	Fr. Ampl.	Oligonucleotídeos iniciadores
<i>hpt</i>	pUC18Hyg	622 pb	HptFor 5' GCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT 3' HptRev 5' GGTTTCCACTATCGGCGAGTACTT 3'
<i>chit1</i>	pMOG463 <i>chit1</i> ou pUC18 <i>chit1</i>	750 pb	MaChitFor 5' GGAGGGTGGACGTGGTCAC 3' MaChitRev 5' GCTGCCCCCAATCCCTTG 3'

As condições de amplificação foram: 5 min. de desnaturação a 94°C; 30 ciclos de: 45 s de desnaturação, a 94°C, 45 s de anelamento, a 52°C e 45 s de extensão, a 72°C; 5 min. de extensão final a 72°C. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese a 100 V em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo.

2.8 Extração de RNA, Quantificação, Síntese de cDNA e RT-PCR:

A extração de RNA foi feita a partir de folhas frescas com o reagente TRIzol (Invitrogen). A quantificação das amostras foi realizada utilizando-se o sistema Qubit™ (“Quant-iT™ RNA BR Assay Kit”; Invitrogen). A seguir, foi feito um tratamento com uma DNase livre de RNase (“RQ1 RNase-Free Dnase”, Promega), para excluir qualquer DNA residual da amostra, e também uma PCR-teste, para a comprovação da ausência de DNA. A síntese do cDNA foi realizada com a enzima “M-MLV Reverse Transcriptase” (Promega). Todos os ensaios foram realizados segundo as instruções dos fabricantes.

A reação de RT-PCR foi feita nas mesmas condições utilizadas para as reações de PCR descritas no item 2.7. Para teste do cDNA foram feitas reações com oligonucleotídeos iniciadores para um gene da actina de soja (Número de acesso no GenBank: V00450): ActFOR 5' GAT CTA ACT GAT CAT TTG ATG 3' e ActREV 5' GAT CTC CTT GCT CAT ACG GTC 3'. Para amplificação do gene *chit1*, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores MaChitFor e MaChitRev (**Tabela 2.3**).

3. Resultados e Discussão:

Com o objetivo de obter plantas resistentes a moléstias fúngicas, o gene *chit1* de *M. anisopliae* foi utilizado em diferentes experimentos de transformação de três cultivares de soja. A razão da realização de quatro experimentos no decorrer desse trabalho advém das dificuldades inerentes tanto ao processo de regeneração de plantas adultas e férteis, após a etapa de transformação, quanto à dificuldade de obter plantas transformadas, expressando o gene de interesse.

Os resultados obtidos em cada um dos quatro experimentos realizados são apresentados e discutidos separadamente a seguir.

3.1 1º Experimento:

Neste experimento, embriões somáticos da cultivar IAS5 de soja foram bombardeados com dois tipos diferentes de construção. Metade dos embriões disponíveis foi bombardeada com os plasmídeos pMOG463*chit1* e pUC18Hyg e a outra metade com os cassetes gênicos retirados dos mesmos plasmídeos, por clivagem, como descrito no item **2.2**. Após a etapa de seleção em meio contendo o antibiótico, foram obtidos conjuntos de embriões higromicina-resistentes correspondentes a **10 eventos** de transformação, oriundos das placas bombardeadas com os plasmídeos, e a **um evento** de transformação, oriundo das placas bombardeadas com os cassetes gênicos (**Tabela 3.1**).

Tabela 3.1. Resultados de cultura de tecidos referentes ao 1º Experimento de transformação.

1º Experimento: Cultivar IAS5					
	EV	EH	EG	PC	PA
Plasmídeos	10	1.749	601	100	11
Cassetes	1	2	2	0	0

Abreviaturas: EV, eventos de transformação obtidos após seleção em antibiótico; EH, embriões histodiferenciados; EG, embriões germinados; PC, plântulas convertidas; PA, plantas adultas.

A diferença na quantidade de conjuntos embriogênicos higromicina-resistentes obtidos do bombardeamento com cassetes em relação aos obtidos do bombardeamento com plasmídeos pode ter sido devida a fatores inerentes à preparação dos mesmos. Esta etapa envolveu a extração do DNA da banda correspondente à migração dos mesmos em gel de agarose (ver item 2.2). Este processo pode ter originado uma preparação de DNA contendo impurezas, o que, por sua vez, pode ter impedido uma transformação eficiente. Breitler e colaboradores (2002) testaram cinco preparações diferentes para transformação de *O. sativa* (arroz): Plasmídeos supertorcidos (*supercoiled*); plasmídeos linearizados; cassetes purificados (*PC: Purified cassettes*); cassetes não-purificados (*UPC: Unpurified cassettes*) e cassetes fita simples cobertos com proteínas SSB (*single stranded binding*) de *E. coli*. Os autores concluíram que as preparações de cassetes purificados foram melhores que as de cassetes não-purificados, pois os últimos continham resquícios de brometo de etídeo, agarose e proteínas. Com as preparações purificadas, esses autores obtiveram cerca de 70 a 80% da eficiência de transformação obtida com plasmídeos.

Vidal e colaboradores (2006) transformaram *V. vinifera* (uva), por biobalística, e compararam experimentos de transformação feitos com plasmídeos e cassetes gênicos. Assim como no presente trabalho, o número de eventos obtido para plasmídeos foi maior (57) do que para cassetes (40). O número de plantas regeneradas também foi superior quando se utilizou plasmídeos. Os cassetes foram purificados de gel de agarose, assim como nesse trabalho. Devido

à menor eficiência obtida, os autores referiram que pretendem utilizar algum sistema para melhor purificar os cassetes, em seus próximos experimentos, como, por exemplo, eletroeluição de gel de agarose ou purificação em colunas de afinidade.

Os conjuntos de embriões higromicina–resistentes obtidos após o período de seleção foram proliferados por três meses, passando-se então de 11 conjuntos de embriões globulares (correspondentes aos 11 eventos de transformação obtidos) para 48 conjuntos, uma vez que embriões de alguns eventos proliferaram mais que de outros. Após a etapa de maturação, foram obtidos 1.751 embriões histodiferenciados (**Tabela 3.1**).

Os embriões foram colocados em placas de Petri sem meio de cultura para um período de dessecação, por dois dias, o que contribui para o aumento da frequência e da velocidade de regeneração (Schmidt *et al.*, 2005). Em seguida, todos os embriões foram colocados em meio de regeneração (**Figura 3.1 A**).

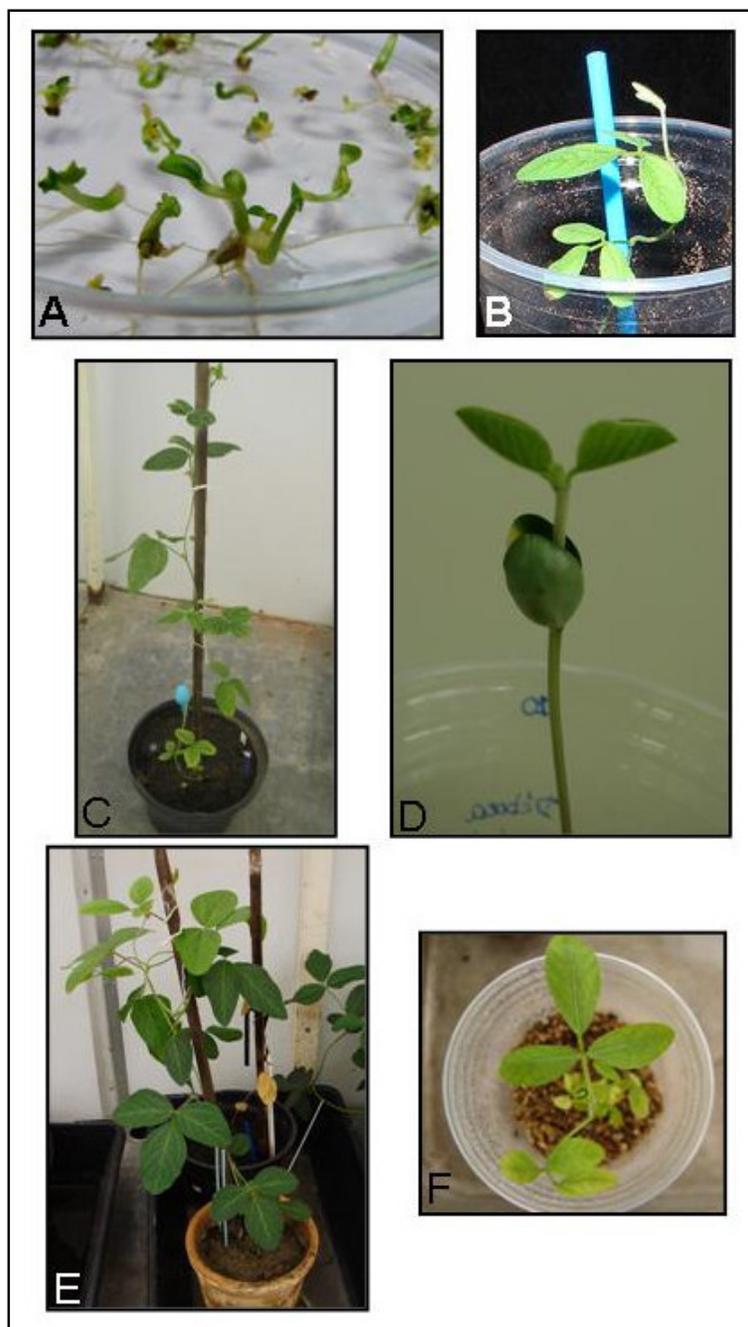


Figura 3.1: Experimento 1: **A)** Embriões em meio de regeneração; observar a presença de raízes e parte aérea; **B)** Plântula em copo plástico contendo vermiculita, em fase de adaptação a condições *ex vitro*; Experimento 2: **C)** Planta VP2, adulta, em casa de vegetação; **D)** Plântula T₁, germinando; **E)** Plantas T₁, na fase reprodutiva, em casa de vegetação; Experimento 3: **F)** Plântula em copo plástico contendo vermiculita.

Das placas bombardeadas com cassetes gênicos, foram obtidos apenas dois embriões histodiferenciados, que germinaram, mas não se converteram em plantas, provavelmente devido a sua morfologia anormal (ver adiante). Das placas bombardeadas com plasmídeos, foram obtidos 1.749 embriões histodiferenciados, e destes cerca de 34% (601 embriões) germinaram (**Tabela 3.1**).

Embriões que desenvolvem raízes primárias ou parte aérea são considerados germinados. O termo conversão foi utilizado apenas quando ocorreu a formação de ao menos uma folha trifoliolada. (Bailey *et al.*, 1993). Foram obtidas 100 plântulas convertidas (taxa de conversão de 16%; **Figura 3.1 B**) e 11 plantas adultas, de 5 eventos diferentes. As plantas eram fenotipicamente normais.

Droste e colaboradores (2001) fizeram um estudo de regeneração de soja através de culturas embriogênicas em suspensão. Obtiveram uma frequência de conversão de 45,7% para a cultivar Bragg e de 54,9% para IAS5, porém as culturas não haviam passado por experimentos de transformação, o que explica as taxas mais altas do que as obtidas no presente trabalho. Em outro trabalho, dessa vez envolvendo transformação por biolística, Droste e colaboradores (2002) observaram uma taxa de conversão de 36%, utilizando um protocolo semelhante ao do presente trabalho. Wiebke (2005), por sua vez, obteve uma taxa de conversão de 12% quando realizou transformação de soja com o sistema integrado Biobalística-*Agrobacterium*.

A baixa taxa de conversão dos embriões em plantas já era esperada, conforme o relatado na literatura, uma vez que a maior parte dos embriões produz sistema radicular, mas não produz partes aéreas (Buchheim *et al.*, 1989). Estes autores classificaram os embriões somáticos de soja em nove tipos morfológicos, sete dos quais anormais. Vários tipos morfológicos observados no presente trabalho e também por Droste e colaboradores (2002) (por exemplo, embriões com cotilédones fusionados ou “trompete”), não possuíam meristema apical, e este seria o motivo de sua baixa conversão (Suhasini *et al.*, 1996). Droste e colaboradores (2002) classificaram os embriões transformados obtidos em tipos

morfológicos; 88% da amostra apresentou formato anormal. Entretanto, 46 dos 141 embriões anormais também se converteram em plantas (cerca de 32%).

É importante salientar que embriões com formatos anormais são também encontrados em cultura de tecidos de soja não submetida ao procedimento de transformação genética (Buchheim *et al.*, 1989; Bailey *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2007). Droste e colaboradores (2001) encontraram 76,6% de embriões anormais para a cultivar Bragg e 78,5% para a cultivar IAS5. Santos e colaboradores (1997) fizeram um trabalho sobre o efeito do hormônio etileno em embriogênese somática de soja e encontraram 92% de embriões anormais para a cultivar Bragg, nos controles do experimento, que não receberam nenhum tratamento.

A seguir, foi realizada a análise molecular do material transformado com plasmídeos. Foi extraído o DNA genômico de plantas e de embriões não convertidos. No total, foram analisadas 8 linhagens. Todos os experimentos de PCR foram realizados no mínimo três vezes.

A presença do gene *hpt* foi verificada em quatro das oito linhagens analisadas (**Tabela 3.2; Figura 3.2**), o que mostra que ocorreram “eventos de escape” (taxa de 50%), ou seja, por algum motivo, houve proliferação de tecido não resistente à higromicina em meio contendo esse antibiótico, apesar de que a duração da seleção e a concentração de antibiótico utilizada tenham sido as recomendados na literatura (Finer e McMullen, 1991; Vain *et al.*, 1993; Hadi *et al.*, 1996). Hadi e colaboradores (1996), assim como Finer e McMullen (1991), não observaram escapes. Porém, em trabalhos prévios do nosso grupo, foi observada uma taxa de escape de 33% (Weber, 2007) e de 25% (Homrich *et al.*, 2008).

Tabela 3.2: Linhagens obtidas no 1º Experimento analisadas através de PCR. Nas colunas 2 e 3, o “X” indica se foram analisadas amostras de embriões não convertidos, plantas ou ambos. O resultado das PCRs estão nas colunas 4 e 5, onde a presença do gene foi indicada pelo sinal de positivo e a ausência pelo sinal de negativo.

Linhagens	Analisado		Resultado da PCR	
	Embriões	Plantas	<i>hpt</i>	<i>chit1</i>
B	X	X	-	-
C	X	X	+	+
D	X	X	+	-
E	X		-	-
G	X	X	+	-
H	X		-	-
J	X	X	-	-
K	X		+	-
Total	8	5	4/8	1/4

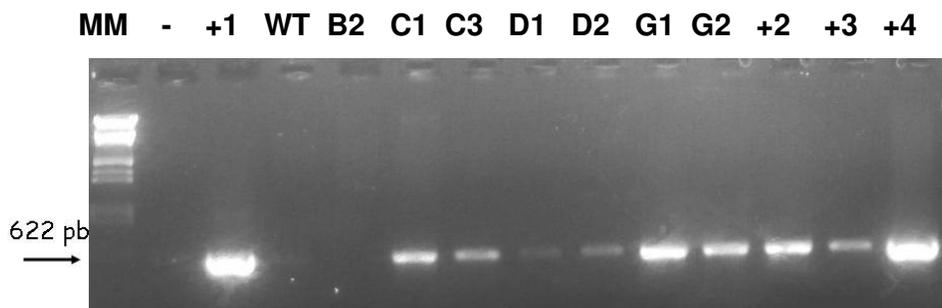


Figura 3.2: Gel de agarose 1,5%. Exemplo de resultado de PCR feita com oligonucleotídeos iniciadores para o gene *hpt*. MM: Marcador molecular (DNA de fago lambda clivado com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*). (-): Controle negativo da reação (sem DNA); +1: Controle positivo da reação, plasmídeo pUC18Hyg; WT: Planta selvagem; +2, +3 e +4: Plantas transgênicas para o gene *hpt*. Amostras positivas: C1, C3, D1, D2, G1, G2.

De quatro linhagens positivas para o gene *hpt* (C, D, G e K), apenas uma (C) também continha o gene *chit1* (**Figura 3.3**), o que nos permite calcular uma taxa de co-transformação de 25%. A taxa de co-transformação via biolística para

genes contidos em plasmídeos diferentes obtidas em trabalhos anteriores de nosso grupo variam bastante: Sachet (2005) obteve taxa de 44% para a cultivar MG/BR46 Conquista e de 50% para a IAS5; Homrich e colaboradores (2008) obtiveram uma taxa de 33%. Li e colaboradores (2004), também com soja, obtiveram uma taxa de 50%.

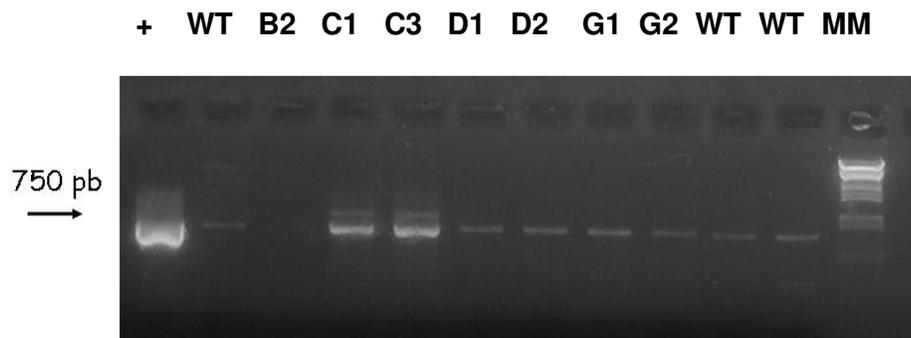


Figura 3.3: Gel de agarose 1,5%. Exemplo de PCR feita com oligonucleotídeos iniciadores para o gene *chit1*. (+): Controle positivo da reação, plasmídeo pUC18*chit1*; WT: Plantas selvagens; B2, C1, C3, D1, D2, G1, G2: Algumas das linhagens analisadas; MM: Marcador Molecular (DNA de fago lambda clivado com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*). Amostras positivas: C1 e C3, que correspondem ao mesmo evento de transformação. A banda de menor tamanho, que aparece em quase todas as amostras, possivelmente seja correspondente a um gene de quitinase endógeno de soja.

Foram obtidas duas plantas referentes ao evento C, mas estas morreram antes de atingir a fase reprodutiva. Logo, não deixaram descendentes para que o estudo pudesse ser continuado. Novos experimentos de transformação foram, então, conduzidos.

3.2 2º Experimento:

Neste experimento, foram utilizadas três cultivares de soja (IAS5, Bragg e Vencedora) e todas foram bombardeadas apenas com plasmídeos. Após três meses de seleção em meio contendo o antibiótico, foram obtidos 49 eventos de transformação (**Tabela 3.3**).

Tabela 3.3. Resultados de cultura de tecidos referentes ao 2º Experimento de transformação.

2º Experimento: Plasmídeos					
	EV	EH	EG	PC	PA
IAS5	27	60	0	0	0
Vencedora	2	171	34	2	1
Bragg	20	251	0	0	0

Abreviaturas: EV, eventos de transformação obtidos após seleção em antibiótico; EH, embriões histodiferenciados; EG, embriões germinados; PC, plântulas convertidas; PA, plantas adultas.

Após a etapa de maturação, muitos embriões histodiferenciados foram obtidos (**Tabela 3.3**). Porém, apenas embriões da cultivar Vencedora germinaram. Entretanto, a maioria dos embriões germinados possuía um formato anormal, o que, como discutido no item “**3.1: 1º Experimento**”, leva a uma baixa taxa de conversão.

Outro fator importante, que colabora com a baixa taxa de regeneração, é a idade das culturas embriogênicas utilizadas no bombardeamento (Trick *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2002). Neste experimento, as culturas tinham cerca de um ano de idade. Segundo Trick e colaboradores, o ideal é utilizar culturas com menos de um ano de idade. Culturas antigas também tendem a gerar plantas transgênicas estéreis (Hadi *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996). Droste e colaboradores (2002) transformaram duas culturas embriogênicas, com diferença de cinco meses de idade, e fizeram uma comparação entre estas. Foi observada uma diminuição de 60% no número de focos com expressão do gene repórter *gusA*,

para a cultivar Bragg, nas culturas mais antigas. A explicação é que os tecidos se tornam menos responsivos e mais sensíveis ao estresse dos procedimentos de cultura e transformação. Segundo Trick e colaboradores (1997), a transformação não será bem sucedida se os processos de transformação ou de regeneração forem ineficientes, ou se ambos não estiverem “acoplados”. É necessário o conhecimento dos dois processos e a habilidade de conectá-los (Trick *et al.*, 1997; Bodanese-Zanettini e Pasquali., 2004).

Dos 34 embriões germinados, apenas dois converteram-se em plantas (aproximadamente 6%). Uma planta adulta foi obtida e foi denominada VP2 (**Figura 3.1 C**). Esta planta, juntamente com a outra plântula obtida da mesma cultivar, foi submetida à análise molecular. Foi observada a presença do gene *hpt* em ambas e do gene *chit1* apenas na planta VP2 (**Figura 3.4**). Algumas amostras de embriões não convertidos também foram analisadas por PCR, como a linhagem BP16, por exemplo, da cultivar Bragg (**Figura 3.4**). Todos os experimentos de PCR foram realizados no mínimo três vezes.

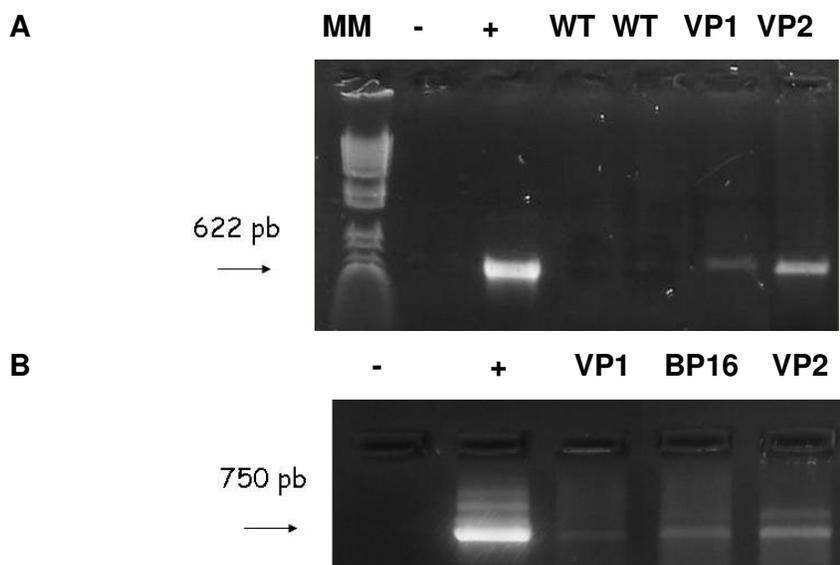


Figura 3.4: Géis de agarose 1,5%. **A)** PCR com oligonucleotídeos iniciadores para o gene *hpt*. MM: Marcador molecular (*1 Kb Ladder*, Promega); (-): Controle negativo da reação (sem DNA); (+): Controle positivo da reação, plasmídeo pUC18Hyg; WT: Plantas selvagens; VP1 e VP2: Plantas obtidas no 2º Experimento. Amostras positivas: VP1 e VP2. **B)** PCR com oligonucleotídeos iniciadores para o gene *chit1*. (-): Controle negativo da reação (sem DNA); (+): Controle positivo da reação, plasmídeo pUC18*chit1*; VP1, BP16 e VP2: Três linhagens analisadas. Amostra positiva: VP2. A banda de menor tamanho, que aparece nas três amostras, possivelmente seja correspondente a um gene de quitinase endógeno de soja.

Apesar do pequeno número amostral, a taxa de co-transformação foi estimada em 50%. Li e colaboradores (2004) transformaram soja, por biobalística, com dois genes e obtiveram duas plantas positivas para um dos genes utilizados e uma positiva para ambos os genes. Segundo estes autores, a taxa de co-transformação obtida foi de 50%, idêntica à obtida no presente trabalho.

Para análise de expressão gênica, foi realizada extração do RNA da planta VP2 e síntese de cDNA. Foram realizados dois experimentos de RT-PCR: No primeiro deles (**Figura 3.5**), foi testada a integridade do cDNA preparado, através

da utilização de oligonucleotídeos iniciadores para um gene de actina, o qual está presente no genoma da soja. Conforme pode ser observado na figura, a presença da banda nas três amostras de DNA utilizadas permite concluir que as amostras apresentavam-se em condições ideais para a realização do segundo experimento de RT-PCR.

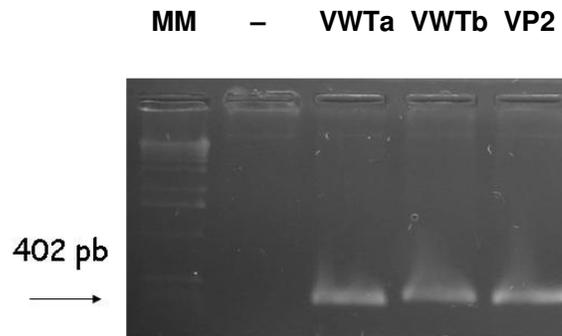


Figura 3.5: Gel de agarose 1,5%. RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores para o gene da actina. MM: Marcador molecular (*1 Kb Ladder*, Promega); (-): Controle negativo da reação (sem DNA); VWTa: DNA de uma planta selvagem da cultivar Vencedora; VWTb: cDNA de uma planta selvagem da cultivar Vencedora; VP2: cDNA da planta transgênica.

No segundo experimento de RT-PCR, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para o gene da quitinase. Foi utilizada uma amostra contendo DNA plasmidial como controle positivo e duas amostras de cDNA, de uma planta selvagem e da planta VP2. Foi observada a presença de banda apenas no controle positivo e na planta transformada (**Figura 3.6**).

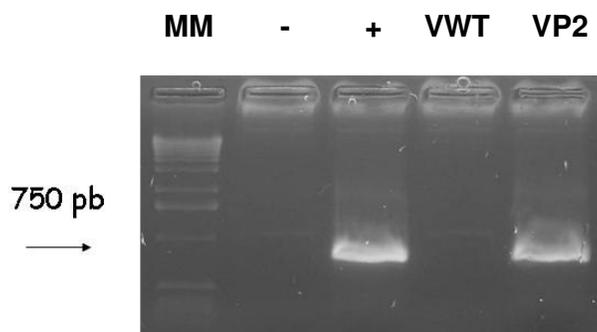


Figura 3.6: Gel de agarose 1,5%. RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores para o gene da quitinase. MM: Marcador molecular (*1 Kb Ladder*, Promega); (-): Controle negativo da reação (sem DNA/cDNA); (+): Controle positivo da reação, plasmídeo pUC18*chit1*; VWT: cDNA de uma planta selvagem da cultivar Vencedora; VP2: cDNA da planta transgênica.

O resultado do experimento de RT-PCR demonstrou que a planta VP2 expressa o gene *chit1*, havendo produção de moléculas de RNA mensageiro na célula. É importante mencionar que a presença de transcritos correspondentes ao gene *chit1* é uma forte indicação de que não esteja ocorrendo nessa planta o silenciamento em nível de transcrição, que poderia ter sido causado por diferentes motivos, tais como a integração do(s) transgene(s) em regiões heterocromáticas, inibição por RNA de interferência, entre outros. Entretanto, a presença de mRNA não garante que a proteína correspondente esteja presente, uma vez que esta pode não estar sendo produzida (silenciamento pós-transcricional) ou pode estar sendo inativada por algum mecanismo de silenciamento posterior à tradução. Testes para averiguar a presença da quitinase CHIT42 no extrato proteico da planta VP2 não puderam ser realizados, visto que não havia anticorpo disponível e nem meios para obtê-lo em tempo hábil para a finalização deste trabalho (A. Schrank, comunicação pessoal). Já foi registrado silenciamento do transgene em plantas de soja transformadas (Reddy *et al.*, 2003). Esses autores atribuem o silenciamento a metilação dos transgenes e, portanto, este não estaria relacionado a mecanismos de silenciamento pós-transcricional.

A planta VP2 atingiu a idade adulta, sendo fenotipicamente normal e fértil, dando origem a 24 sementes. Jach e colaboradores (1995) observaram fenótipo

normal em plantas de tabaco transformadas com uma quitinase de *Hordeum vulgare* (trigo). Em nosso grupo, Weber (2007) e Homrich e colaboradores (2008) obtiveram plantas com fenótipo comparável ao selvagem ao transformarem soja com protocolo semelhante ao utilizado neste trabalho.

As 24 sementes da planta VP2 foram germinadas. Destas, 16 foram convertidas em plântulas (**Figura 3.1 D**), das quais foi extraído DNA. Das 16 plântulas, apenas nove atingiram a fase adulta e são férteis (**Figura 3.1 E**) (T₁-3, T₁-5, T₁-10, T₁-11, T₁-12, T₁-13, T₁-14, T₁-15, T₁-16). Através de análises moleculares, com os DNAs das 16 plântulas, foi detectada a presença do gene *hpt* em seis de dez amostras analisadas até o momento (**Figura 3.7**). A presença do gene *chit1* na geração T₁ não pôde ser realizada em tempo hábil para esta dissertação. Esta análise permitirá a determinação do padrão de segregação dos transgenes.

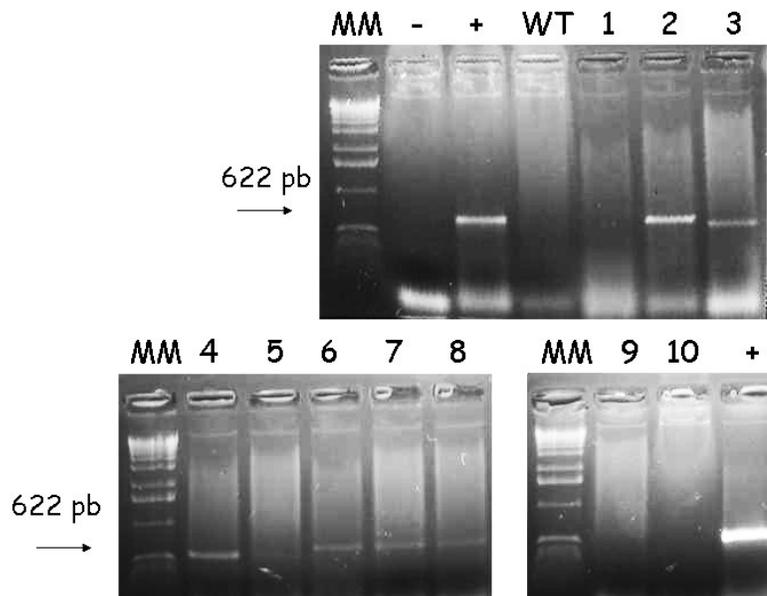


Figura 3.7: Gel de agarose 1,5%. PCR com oligonucleotídeos iniciadores para o gene *hpt*. MM: Marcador molecular (1 Kb Ladder, Promega); (-): Controle negativo da reação (sem DNA); (+): Controle positivo da reação, plasmídeo pUC18Hyg; Números de 1 a 10: Plantas T₁. Amostras positivas: T₁ – 2, 3, 4, 6, 7, 8.

Como mencionado na Introdução, **item 1.4**, a técnica de co-transformação foi utilizada neste trabalho. Esta técnica permite que os genes de marcação (resistência a antibiótico) e de interesse (nesse caso, o gene de quitinase) sejam segregados na progênie de plantas transgênicas, desde que esses tenham se inserido em loci diferentes, não ligados (Aragão e Brasileiro, 2002; Scutt *et al.*, 2002). Assim, plantas livres do gene marcador podem ser obtidas.

É esperado que, com a segregação meiótica que ocorreu na planta VP2, plantas portadoras do gene *chit1* e livres do gene marcador *hpt* possam ser obtidas. Porém, em muitos trabalhos (Christou *et al.*, 1989; Finer e McMullen, 1991; Hadi *et al.*, 1996) têm sido observada a integração dos dois transgenes no mesmo locus do genoma da planta transformada. Este é um problema que pode atrasar o processo de obtenção de uma planta livre do gene marcador, mas não impede que isto aconteça em gerações posteriores. Em trabalho realizado por nossa equipe, a análise de plantas T₁ indicou que o gene de interesse e o gene marcador haviam se integrado em um único locus. Porém, na geração T₃, foram obtidas plantas contendo apenas um dos transgenes, o que pode ser explicado pela ocorrência de uma recombinação entre os dois genes, que estariam ligados em um locus complexo (Homrich *et al.*, 2008).

A conclusão das análises moleculares das plantas descendentes (T₁) permitirá determinar se a segregação está seguindo o padrão Mendeliano esperado para genes dominantes, como já relatado em alguns trabalhos com soja (Christou *et al.*, 1989; Droste *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2003). Yin e colaboradores (2004) registram que um padrão de segregação não-mendeliana ocorre em 10 a 50% das linhagens transformadas.

As sementes das plantas T₁ serão germinadas para a obtenção da geração T₂. Após ensaios de expressão na geração T₂, serão feitos bioensaios contra fungos patogênicos à soja, tanto teste em placas de Petri (conforme Weber, 2007) quando testes *in planta*, em casa de vegetação.

3.3 3º Experimento:

Neste experimento, a transformação foi feita com plasmídeos e cassetes gênicos, assim como no 1º Experimento, utilizando-se as cultivares IAS5 e Bragg. Foram obtidos 28 eventos para a transformação com plasmídeos e 18 eventos para a transformação com cassetes (**Tabela 3.4**). Após a seleção e proliferação dos conjuntos higromicina-resistentes, foi obtida uma grande quantidade de embriões histodiferenciados: 3.563 oriundos de tecido bombardeado com plasmídeos e 2.021 com cassetes.

Tabela 3.4. Resultados de cultura de tecidos referentes ao 3º Experimento de transformação.

3º Experimento					
		EV	EH	EG	PC
PL	IAS5	5 ^ª	759 ^ª	176 [*]	7 [*]
	Bragg	23 ^ª	2804 ^ª	341 [*]	8 [*]
CA	IAS5	12 ^ª	1527 ^ª	188 [*]	1 [*]
	Bragg	6 ^ª	494 ^ª	52 [*]	0 [*]

Abreviaturas: PL, transformação com plasmídeos; CA, transformação com cassetes; EV, eventos de transformação obtidos após seleção em antibiótico; EH, embriões histodiferenciados; EG, embriões germinados; PC, plântulas convertidas; PA, plantas adultas. ^ªDados finais; ^{*}dados parciais.

Antes da realização deste experimento, foi pesquisada na literatura uma metodologia alternativa para a geração dos cassetes gênicos, já que era desejado testar novamente este tipo de transformação. Seguindo os métodos descritos por Romano e colaboradores (2003), os cassetes mínimos foram obtidos através de PCR. Desta forma, as preparações de cassetes estão livres de contaminações – problema descrito para o 1º Experimento. Com este novo método, foi alcançado sucesso na obtenção de embriões germinados de soja resistentes ao antibiótico, possivelmente transformados com cassetes.

Conforme a **Tabela 3.4**, os dados apresentados referentes a número de embriões germinados e de plântulas convertidas são parciais, pois o processo de regeneração encontra-se em andamento (**Figura 3.1 F**). Todos os embriões germinados obtidos foram colocados em meio de regeneração. Após sua passagem por vidros, copos plásticos com vermiculita e, finalmente, vasos contendo terra orgânica, folhas serão coletadas para a extração de DNA e análises moleculares serão realizadas, semelhante ao realizado para o 1º e 2º Experimentos.

3.4 4º Experimento:

No 3º Experimento, foram utilizados no bombardeamento embriões somáticos de duas cultivares de soja, IAS5 e Bragg. Os embriões que não foram utilizados foram proliferados e, um mês depois, havia embriões suficientes para um novo bombardeio. Este 4º Experimento não apresentou novidades com relação ao anterior, mas foi realizado com a intenção de aumentar o número de plantas transgênicas obtidas ao final do trabalho.

Após 3 meses de seleção, foram obtidos 33 eventos da transformação com plasmídeos e 12 eventos da transformação com cassetes (**Tabela 3.5**).

Tabela 3.5. Resultados de cultura de tecidos referentes ao 4º Experimento de transformação.

4º Experimento					
		EV	EH	EG	PC
PL	IAS5	8 ^ª	851 ^ª	3 [*]	0 [*]
	Bragg	25 ^ª	1.312 ^ª	27 [*]	0 [*]
CA	IAS5	4 ^ª	184 ^ª	0 [*]	0 [*]
	Bragg	8 ^ª	27 ^ª	0 [*]	0 [*]

Abreviaturas: PL, transformação com plasmídeos; CA, transformação com cassetes; EV, eventos de transformação obtidos após seleção em antibiótico; EH, embriões histodiferenciados; EG, embriões germinados; PC, plântulas convertidas; PA, plantas adultas. ^ªDados finais; ^{*}dados parciais.

Os dados aqui apresentados, nas duas últimas colunas da **Tabela 3.5**, são referentes a uma contagem realizada nesse momento, correspondendo a dados parciais. A partir do material transformado com plasmídeos, foram obtidos 2.163 embriões histodiferenciados e 30 destes germinaram, até o momento. Dos eventos oriundos de transformação com cassetes, foram obtidos 211 embriões histodiferenciados. Os embriões estão em meio de regeneração e serão analisados da mesma forma como descrito para os experimentos anteriores.

4. Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho, foram obtidas plantas transgênicas de soja expressando um gene que codifica uma quitinase. O gene escolhido para introdução no genoma da soja foi isolado por um grupo de pesquisadores desta mesma Universidade (Bogo *et al.*, 1998) e cuja capacidade para conferir resistência a fungos já havia sido testada em uma planta modelo (Kern, 2003). Além disso, quitinases estão naturalmente presentes em plantas, onde desempenham diversas funções, e não são tóxicas para animais (Lorito *et al.*, 1998). Todos esses fatores nos incentivam a seguir adiante com este estudo, com a expectativa de que as plantas transgênicas produzidas apresentem resistência a fungos patogênicos à soja.

Neste trabalho foram utilizadas ferramentas modernas de biologia molecular para a realização de melhoramento de soja com o intuito de contribuir com o setor agropecuário do país. Para a soja, especialmente, é necessária a contribuição do setor de biotecnologia. Programas de melhoramento convencional não têm obtido sucesso na produção de cultivares com resistência a novos patógenos fúngicos. Isto se deve principalmente ao fato de que as cultivares brasileiras de soja possuem uma estreita base genética em seu germoplasma (Priolli *et al.*, 2002).

Este trabalho teve por objetivo a obtenção de plantas transformadas com um gene de resistência a fungos. Foi obtida uma linhagem expressando um gene de quitinase e que gerou descendentes fenotipicamente normais e férteis. Isto permite a continuação do trabalho. A geração T₂ será analisada por meio de PCR e RT-PCR. As plantas que expressarem o transgene *chit1* serão submetidas a vários testes, entre estes bioensaios, para verificar se apresentam resistência a fungos importantes para a soja, conforme esperado.

Nos Experimentos 3 e 4, ainda em fase inicial, foi testada uma nova metodologia de transformação de soja e, caso sua eficácia seja comprovada, poderá vir a se tornar o método padrão para transformação de soja em nosso

laboratório. Muitos embriões histodiferenciados e plântulas convertidas foram obtidos até o momento, o que nos mostra que a regeneração deste material está ocorrendo com maior eficiência do que a do material utilizado nos Experimentos 1 e 2. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que foram utilizadas culturas embriogênicas mais novas nestes experimentos.

Um fator importante a considerar é que a introdução de apenas um gene de resistência no genoma de uma planta pode não ser suficiente (Jach *et al.*, 1995; Salmeron e Vernooij, 1998; Melchers e Stuver, 2000; Li *et al.*, 2004). Já foram produzidas em nosso laboratório plantas de soja expressando uma proteína osmotina e que em testes preliminares mostraram resistência aos fungos *Phytophthora sojae* e *Erysiphe diffusa* (R. Weber, comunicação pessoal). Em outro trabalho em andamento foram obtidas plantas transformadas com um gene de urease (B. Wiebke, comunicação pessoal), que também tem potencial para conferir resistência a fungos. Em etapa futura está previsto o cruzamento de linhagens homozigotas destas plantas (B. Wiebke, comunicação pessoal), para a obtenção de uma planta comercialmente viável, e que contenha pelo menos dois genes de resistência com mecanismos de ação diferentes.

Para finalizar, é importante ressaltar que, atualmente, existem poucos laboratórios que obtêm sucesso com transformação de soja. Todos os procedimentos descritos na literatura têm problemas de baixa reprodutibilidade, baixa eficiência e limitada especificidade de cultivares (Trick *et al.*, 1997).

5. Referências Bibliográficas:

Aragão FJL and Rech EL (1998) Biobalística. In: Brasileiro ACM and Carneiro VTC (eds) Manual de transformação genética de plantas. 1st edition. Brasília, Embrapa, pp 51-63.

Aragão FJL and Brasileiro ACM (2002) Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. Braz. J. Plant Physiol., 14(1): 1-10.

Bailey MA, Boerma HR and Parrott WA (1993) Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. In Vitro Cell Dev Biol, 29: 102- 108.

Balardin RS (2005) Ferrugem Asiática: Como evitar. Caderno Técnico Soja, Cultivar 78.

Baratto CM, Silva MV, Santi L, Passaglia L, Schrank IS, Vainstein MH and Schrank A (2003) Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. Canadian Journal of Microbiology 49 1-4.

Batista Filho A, Almeida JEM, Santos AS, Machado LA and Alves SB (2003) Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (HOM.: CERCOPIDAE). Arq. Inst. Biol. 70: 309-314.

Biodieselbr, <http://www.biodieselbr.com/plantas/soja/soja.htm> (October 12, 2008).

Bodanese-Zanettini MH and Pasquali G (2004) Plantas Transgênicas. In: Mir L (ed) Genômica. 1st edition. Atheneu, São Paulo, pp 721-736.

Bogo MR, Rota CA, Pinto HJr, Ocampo M, Correa CT, Vainstein MH and Schrank, A (1998) A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Curr Microbiol* 37: 221-225.

Boller T, Gehri A, Mauch F and Vögeli U (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157 (1): 22-31.

Bonfim SMRC, Cruz AHS, Jesuino RSA, Ulhoa CJ, Molinari-Madlum, EEWI, Soares CMA and Pereira, M. (2006) Chitinase from *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular cloning, structural, phylogenetic, expression and activity analysis. *FEMS: Immunology and Medical Microbiology* 46: 269-283.

Borem A (2001) Transformação Gênica. In: Borem A. (ed) Melhoramento de Plantas. 3rd edition. Editora UFV, pp. 357-370.

Breitler JC, Labeyrie A, Meynard D, Legavre T and Guiderdoni E (2002) Efficient microprojectile bombardment-mediated transformation of rice using gene cassettes. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 709-719.

Buchheim JA, Colburn SM and Ranch JP (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol* 89: 768-775.

Campos HD (2005) Manejo das principais doenças fúngicas da soja. Atualidades Agrícolas BASF.

Cober ER, Rioux S, Rajcan I, Donaldson PA and Simmonds DH (2003) Partial resistance to white mold in a transgenic soybean line. *Crop Science* 43: 92-95.

Christianson ML, Warnick DA and Carlson PS (1983) A morphogenetically competent soybean suspension culture. *Science* 222:632-634.

Christou P, Swain WF, Yang NS and McCabe DE (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7500-7504.

Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull* 19: 11-15.

Droste A, Leite PCP, Pasquali G, Mundstock EC and Bodanese-Zanettini MH (2001) Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. *Sci. Agric.* 58: 753-758.

Droste A, Pasquali G and Bodanese-Zanettini MH (2002) Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica* 127:367-376.

Embrapa Soja (2000) A Cultura da Soja no Brasil – CD ROM – Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

Finer JJ (1988) Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep* 7: 238-241.

Finer JJ and McMullen MD (1991) Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell Dev Biol* 27: 175-182.

Finer JJ, Vain P, Jones MW and Mc Mullen MD (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep* 11:323-328.

Fu X, Due LT, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Sudhakar D, Twyamn RM, Christou P and Kohli A (2000) Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research* 9: 11–19.

Gamborg OL, Miller RA and Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.

Hadi MZ, McMullen MD and Finer JJ (1996) Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 15: 500-505.

Hansen G and Wright MS (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science* 4:5: 226-231.

Hazel CB, Klein TM, Anis M, Wilde HD and Parrott WA (1998) Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures. *Plant Cell Reports* 17:765:772.

Homrich MS, Passaglia LMP, Pereira JF, Bertagnolli PF, Pasquali G, Zaidi Mohsin Abbas, Altosaar I and Bodanese-Zanettini MH (2008) Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. *Genetics and Molecular Biology* 31-2: 522-531.

Honée G (1999) Engineered resistance against fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 105: 319-326.

Hunold R, Bronner R and Hahne G (1994) Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. *Plant Journal* 5(4): 593-604.

IBGE - Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, <http://www.ibge.gov.br> (September 18, 2008)

Jach G, Görnhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J and Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 8(1): 97-109.

Kasprzewska A (2003) Plant chitinases – Regulation and Function. *Cellular and Molecular Biology Letters* 8:809-824.

Kern MF (2003) Expressão de uma quitinase de *Metarhizium anisopliae* em *Nicotina tabacum*: obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças fúngicas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 83p.

Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E and Christou P (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol Biol* 52: 247-258.

Lacorte C, Aragão FJL, Vainstein MH and Rech EL (1999) Biobalística. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JS. *Cultura de Tecido e Transformação Genética de Plantas*, Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPH, v. 2, pp. 761-781.

Li HY, Zhu YM, Chen Q, Conner RL, Ding XD, Li J and Zhang BB (2004) Production of transgenic soybean plants with two anti-fungal protein genes via *Agrobacterium* and particle bombardment. *Biol Plant* 48(3): 367-374.

Liu W, Torisky RS, McAllister KP, Avdiushko S, Hildebrand D and Collins GB (1996) Somatic embryo cycling: evaluation of a novel transformation and assay system for seed-specific gene expression in soybean. *Plant Cell Tiss Org Cult* 47:33-42.

Loc NT, Tinjuangjun P, Gatehouse AMR, Christou P and Gatehouse JA (2002) Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. *Molecular Breeding* 9: 231-244.

Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toros JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzunn S and Scala F (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7860-7865.

Luthra R, Varsha, Dubey RK, Srivastava AK and Kumar S (1997) Microprojectile mediated plant transformation: A bibliographic search. *Euphytica* 95: 269-294.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/37AA904436961F63E040A8C07502416D> (February 5, 2009).

Matzke MA, Matzke AJM and Eggleston WB (1996) Paramutation and transgene silencing: a common response to invasive DNA? *Trends in Plant Science* 1: 382–388.

Mauch F and Staehelin LA (1989) Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and B-1,3 glucanase in bean leaves. *Plant Cell*, 1: 447-457.

Melchers LS and Stuiver MH (2000) Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 147-152.

Merkle SA, Parrot WA and Flinn BS (1995) Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In: THORPE T. A. *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, p. 155-203.

Meurer CA, Dinkins RD, Redmond CT, Mcallister KP, Tucker DT, Walker DR, Parrott WA, Tick HN, Essig JS, Frantz HM, Finer JJ and Collins GB (2001) Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars across three locations. *In Vitro Cell Dev Biol* 37: 62-67.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Nandadeva YL, Lupi CG, Meyer CS, Devi PS, Potrykus I and Bilang R (1999) Microprojectile-mediated transient and integrative transformation of rice embryogenic suspension cells: effects of osmotic cell conditioning and of the physical configuration of plasmid DNA. *Plant Cell Reports* 18:500-504.

Newell CA (2000) *Plant Transformation Technology: Developments and Applications*. *Molecular Biotechnology* 16: 53-65.

Parrott WA, Hoffman LM, Hildebrand DF, Willians EG and Collins GB (1989) Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Rep* 7: 615-617.

Ponappa T, Brzozowski AE and Finer JJ (1999) Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 19:6-12, 1999.

Potrykus I (1990) Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiologia Plantarum* 79: 125-134.

Priolli RHG, Mendes-Junio CT, Arantes NE and Contel EPB (2002) Characterization of Brazilian soybean cultivar using microsatellite markers. *Genet Mol Biol* 25 (2): 185-193.

Punja ZK (2001) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of process and future prospects. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 216-235.

Reddy MSS, Dinkins RD and Collins GB (2003) Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 21: 676-683.

Romano A, Raemakers K, Bernardi J, Visser R and Mooibroek H (2003) Transgene organisation in potato after particle bombardment-mediated (co-) transformation using plasmids and gene cassettes. *Transgenic Research* 12: 461-473.

Sachet R (2005) Avaliação da eficiência de co-transformação de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] via bombardeamento de partículas utilizando um gene de seleção e um gene de interesse em plasmídios diferentes. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 51p.

Salmeron JM and Vernooij B (1998) Transgenic approaches to microbial disease resistance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 347-352.

Sambrook J and Russel DW (eds) (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, v.1.

Sanford JC (1988) The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6:299-302.

Sanford JC (1990) Biolistic Plant Transformation. *Physiologia Plantarum* 79: 206-209.

Santarém ER, Pelissier B and Finer JJ (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol* 33P:13-19.

Santos KGB, Mundstock E and Bodanese-Zanettini MH (1997) Genotyp-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of ethylene inhibitor. *Plant Cell Rep* 16: 859-864.

Santos KGB, Mariath JEA, Moço MCC and Bodanese-Zanettini (2006) Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill): Ontogeny of somatic embryos. Brazilian Archives of Biology and Technology 49: 49-55.

Sato S, Newell C, Kolacz K, Tredo L, Finer JJ and Hinchee M (1993) Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. Plant Cell Rep 12:408-413.

Schmidt MA, Tucker DM, Cahoon EB and Parrott WA (2005) Towards normalization of soybean somatic embryo maturation. Plant Cell Rep 24: 383-391.

Scutt CP, Zubko E and Meyer P (2002) Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants. Biochimie 84: 119-1126.

Silva JFV (ed) (2004) Tecnologias de Produção de Soja. Sistemas de Produção, Embrapa SOJA, Londrina-PR.

Silva LHCP and Silva JRC (2005) Medidas de controle para o manejo da ferrugem asiática da soja. IV Congresso Brasileiro de Soja - Anais. Embrapa Soja, Londrina-PR.

Suhasini K, Sagare P and Krishnamurthy KV (1996) Study of aberrant morphologies and lack of conversion of somatic embryos of chickpea (*Cicer arietinum* L.). In Vitro Cell Dev Biol 32P: 6-10.

Trick HN, Dinkings RD, Santarém ER, Samoylov V, Meurer CA, Walker DR, Parrott WA, Finer JJ and Collins GB (1997) Recent advances in soybean transformation. *Plant Tiss Cult Biotechnol* 3: 9-24.

Vain P, Keen N, Murillo J, Rathus C, Nemes C and Finer JJ (1993) Development of the Particle Inflow Gun. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33:237-246.

Vencato A (2005) Anuário Brasileiro da Soja. Editora Gazeta Santa Cruz.

Vidal JR, Kikkert JR, Donzelli BD, Wallace PG and Reisch BI. (2006) Biolistic transformation of grapevine using minimal cassette technology. *Plant Cell Rep* 25: 807-814.

USDA Foreign Agricultural Service (2006) Brazil, Oilseeds and Products – Annual Soybean Report.

Weber RLM (2007) Transformação genética de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] com um gene que codifica uma osmotina de *Solanum nigrum* var. *americanum*, visando a resistência a moléstias fúngicas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 67p.

Weber RLM, Petry DT and Bodanese-Zanettini MH (2006) Avaliação do potencial embriogênico e de regeneração *in vitro* de doze cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. 57° Congresso Nacional de Botânica – CD de Resumos. Gramado – RS.

Wiebke B (2005) Transformação genética de embriões somáticos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] utilizando o bombardeamento e sistema *Agrobacterium*

de maneira integrada. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 80p.

Wright MS, Launis KL, Novitzky R, Duesiing JH & Harms CT (1991) A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. In *Vitro Cell Dev Biol* 27P: 153-157.

Yin Z, Plader W and Malepszy S (2004) Transgene inheritance in plants. *J. Appl. Genet.* (45) 2: 127-144.

Yorinori JT and Lazzarotto JJ (2004) Situação da Ferrugem Asiática da Soja no Brasil e na América do Sul. Embrapa SOJA, documentos, 236. Londrina – PR.