



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

BENEDITA MARIA RODRIGUES-OTUBO

**REGENERAÇÃO ORGANOGÊNICA DE SOJA SOB TRANSFORMAÇÃO VIA  
*AGROBACTERIUM***

---

Londrina  
2011

BENEDITA MARIA RODRIGUES-OTUBO

**REGENERAÇÃO ORGANOGÊNICA DE SOJA SOB TRANSFORMAÇÃO VIA  
*AGROBACTERIUM***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria  
Co- Orientador: Dr. Éberson Sanches Calvo

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

R696r Rodrigues-Otubo, Benedita Maria.  
Regeneração organogênica de soja sob transformação via *agrobacterium* /  
Benedita Maria Rodrigues-Otubo. – Londrina, 2011.  
89 f. : il.

Orientador: Ricardo Tadeu de Faria.  
Co-orientador: Éberson Sanches Calvo.  
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia,  
2011.  
Inclui bibliografia.

1. Soja – Melhoramento genético – Teses. 2. Fenois – Teses. 3. Soja –  
Regeneração – Teses. 4. Agrobacterium – Teses. 5. Plantas – Transformação –  
Teses. I. Faria, Ricardo Tadeu. II. Calvo, Éberson Sanches. III. Universidade  
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 631.52:633.34

BENEDITA MARIA RODRIGUES-OTUBO

**REGENERAÇÃO ORGANOGÊNICA DE SOJA SOB TRANSFORMAÇÃO VIA  
*AGROBACTERIUM***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Inês Cristina de Batista Fonseca  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Wilmar Ferreira de Lima  
UEL – Londrina – PR

---

Dr. Romeu Afonso de Souza Kiihl  
TMG

---

Dr. Jair Rogério Unfried  
TMG

---

Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 17 de junho de 2011.

Em especial, ao meu esposo Sérgio Toshio Otubo e à minha filha Aline Tiemi Rodrigues Otubo, pelo incentivo, carinho, amor e muita paciência.

À minha mãe, irmãos, cunhado e sobrinhos, pelo incentivo e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida.

À AGRAER/MS, pela oportunidade de realização do curso.

À UEL e ao Departamento de Pós Graduação pela oportunidade de realização deste curso.

À FUNDECT, pela concessão da Bolsa de Doutorado.

À TMG e à FMT, por proporcionarem condições para a realização deste trabalho.

Ao IAPAR, em nome do Dr. Luis Filipe, pela cessão de *Agrobacterium*, do plasmídeo e utilização do Laboratório de Biotecnologia.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria, pelas confiança, amizade, paciência e ensinamentos.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Éberson Sanches Calvo, pelas preciosa oportunidade e confiança e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Deonísio Destro (ex-orientador), pelas confiança, amizade, paciência e pelos ensinamentos.

Aos membros da Comissão Examinadora, Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria, Prof. Dr. Cássio Egídio C. Prete, Prof. Dr. Wilmar Ferreira de Lima, Dr. Romeu Afonso de Souza Kiihl, Dr. Jair Rogério Unfried, Prof<sup>a</sup>. Dra. Inês Cristina de Batista Fonseca e Dr. Nelson da Silva Fonseca Junior.

Ao Dr. Arlindo Harada, pelas amizade e convivência e pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao Dr. Romeu Kiihl, pela conviência e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Luiz Luppe, à Dra. Sandra Flores e ao Dr. Milton Sadao Saito, por me ensinarem a lutar.

À colega Gislaine Vasquez, pelos ensinamentos práticos de transformação, paciência e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Adriano Marino, Taylon Casagrande, Alexandre Garcia, Marlene Marques e Rafael Calderon pela convivência e pelo auxílio e ao Rafael Calderon, principalmente na condução das plantas em casa-de-vegetação.

Aos estagiários Gilberto Rostirolla, Vaneska Priscilla e Camila, pelo apoio prestado nas diversas fases do trabalho.

Ao amigo Auro Akio Otsubo e família, pela amizade e pelos convívio e apoio durante a realização do curso.

À minha amiga londrinense Zuleide Hissano Tazzima e família, pelos convívio e apoio incondicional em todos os momentos.

Às mães que me apoiaram em muitos momentos como a Rosângela Gil Pablos, Rosana Cavutto Yunes, Édna Ricci Branco, Cristiane Ajita, Andréia Peixoto Moscardi.

A todos os demais colegas não mencionados aqui.

RODRIGUES-OTUBO, Benedita Maria. **Regeneração organogênica de soja sob transformação via *Agrobacterium***. 2011. 90 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das culturas mundialmente mais importantes pelas altas concentrações de óleo e proteína presentes nos grãos. Com o avanço das novas tecnologias, o melhoramento dessa leguminosa, por meio da transformação, viabilizou a introdução de características, até então, impossíveis por outros métodos. A transformação genética tem sido uma ferramenta utilizada para transpor barreiras entre as espécies possibilitando a obtenção de plantas transgênicas, sendo o seu sucesso altamente dependente de um bom protocolo de regeneração *in vitro*. No entanto, a inexistência de protocolos altamente reproduzíveis e com altas taxas de transformação tem dificultado o emprego desta tecnologia. Este trabalho teve por objetivo selecionar cultivares de soja com maior potencial organogênico, e avaliar o efeito do tempo no meio de indução de brotações, tempo no meio de recuperação, tempo de sonicação e das concentrações de acetosiringona em plantas regeneradas de eixos embrionários de sementes maduras da cultivar Conquista, sob transformação via *Agrobacterium*. Foram apresentados dois artigos. No primeiro artigo foram delineados dois experimentos, onde no primeiro foi avaliado a regeneração organogênica das cultivares Conquista, Valiosa RR, Perdiz, V.Max, Pintado, Tucunaré, Potência, BRS-232 e Tabarana, no delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições e parcelas com dez eixos embrionários. Aos 70 dias do início da cultura foram avaliados a frequência de regeneração, o número médio de brotos por eixo e a frequência de multibrotação. No segundo experimento, foram avaliadas a regeneração organogênica e a eficiência de expressão do gene GUS em eixos embrionários da cultivar Conquista, cultivados no meio de indução de brotações durante um e dois dias e a manutenção por 10, 15 e 20 dias na fase de recuperação. Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso, no esquema fatorial, de 2 x 3, quatro repetições e parcelas com cinco eixos embrionários. Aos 70 dias do início da cultura, foram avaliadas a regeneração de plântulas e a eficiência da expressão estável do gene GUS. No segundo artigo (primeiro experimento), foram avaliados o efeito da manutenção de eixos embrionários da cultivar Conquista no meio de indução de brotações por um, dois e três dias com sonicação de 0,0; 2,5; 7,5; 15,0 e 30,0 segundos na fase de agroinfecção, na regeneração organogênica e na eficiência de expressão do gene GUS, sob transformação via *Agrobacterium* na OD<sub>600</sub> 0,5. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, no esquema fatorial 3 x 5, quatro repetições e parcelas de 12 eixos. No segundo experimento, foram avaliados os efeitos das concentrações de 100 e 200 µM de acetosiringona na agroinfecção de eixos embrionários da cultivar Conquista com sonicação de 0,0; 2,5; 7,5; 15,0 e 30,0 segundos, na regeneração organogênica e na eficiência de expressão do gene GUS, sob transformação via *Agrobacterium* na OD<sub>600</sub> 0,2. Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados, no esquema fatorial 2 x 5, com 100 e 200 µM de acetosiringona e tempos de sonicação de 0,0; 2,5; 7,5; 15,0 e 30,0 segundos, quatro repetições e parcelas com 12 eixos; sendo as avaliações dos experimentos realizadas aos 70 dias do início dos cultivos. No primeiro artigo (primeiro

experimento), as cultivares apresentam potencial para regeneração organogênica. O maior potencial para número de brotos é observado nas cultivares Valiosa RR e Conquista e, para frequência de multibrotação na cultivar Valiosa RR. No segundo experimento, o cultivo de eixos embrionários da cultivar Conquista por dois dias no meio de indução e 20 dias no meio de recuperação estimulam maior regeneração de plântulas e maior expressão do gene GUS. No segundo artigo (primeiro experimento). A maior alongação das plântulas e maior expressão do gene GUS ocorrem em eixos embrionários da cultivar Conquista mantidos por dois e três dias no meio de indução e com 2,5 e 15,0 segundos de sonicação na suspensão de *Agrobacterium* OD<sub>600</sub> 0,5. No segundo experimento, a maior alongação das plântulas e maior expressão do gene GUS ocorrem em 100 µM de acetosiringona, com 7,5 e 30,0 segundos de sonicação de eixos embrionários da cultivar Conquista na suspensão de *Agrobacterium* OD<sub>600</sub> 0,2.

**Palavras-chave:** *Glycine max.* Cultura *in vitro*. Gene GUS. Glufosinato de amônia. Acetosiringona. Organogênese. Regeneração *in vitro*.

RODRIGUES-OTUBO, Benedita Maria. **Organogenic regeneration of soybean via *Agrobacterium* transformation**. 2011. 90 f. Thesis (Doctorate in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## ABSTRACT

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is one of the world's most important crops by high concentrations of oil and protein present in grains. With the advancement of new technologies, improvement of legume, by means of transformation, made possible the introduction of features hithert impossible by other methods. The genetic transformation has been a tool used to overcome barriers between species made it possible to obtain transgenic plants, and its success is highly dependent on a good protocol for regeneration in vitro. However, the lack of protocols and highly reproducible with high rates of transformation has hindered the use of this technology. This study aimed to select soybean cultivars with higher organogenic potential, and evaluate the effect of time in the shoot induction medium and recovery time, sonication time and concentration acetosiringona in plants regenerated embryonic axes from mature seeds Conquista the cultivar under transformation via *Agrobacterium*. In the first article two experiments were designed, where the first was evaluated organogenic regeneration of Valiosa RR, Perdiz, V.Max, Pintado, Tucunaré, Potência, BRS-232 Tabarana cultivars, in a randomized block design with four replications with ten embryonic axes. At 70 days of onset of culture were assessed the frequency of regeneration, the average number of shoots per axis and the frequency of multiple shoots. In the second experiment, we evaluated the organogenic regeneration and the efficiency of GUS gene expression in embryonic axes Conquista cultivar, grown in the shoot induction during one and two days and maintained for 10, 15 and 20 days in the recovery phase. We used the design of randomized blocks in factorial scheme 2 x 3, four replications and plots with five embryonic axes. At 70 days of the onset of culture, we assessed the regeneration of seedlings and the efficiency of stable GUS gene expression. In the second article (first experiment), we evaluated the effect of the maintenance of embryonic axis Conquista cultivar in the shoots induction medium per one, two and three days with sonication of 0.0, 2.5, 7.5, 15.0 and 30.0 seconds in agroinfection phase in organogenic regeneration and efficiency of GUS gene expression under transformation via *Agrobacterium* in 0.5 OD<sub>600</sub>. We used a randomized block design in 3 x 5 factorial design, four replications and plots of 12 axes. In the second experiment, we assessed the effects of concentrations of 100 and 200 µM acetosiringone in agroinfection of embryonic axis Conquista cultivar with sonication of 0.0, 2.5, 7.5, 15.0 and 30.0 seconds, organogenic regeneration and efficiency GUS gene expression under transformation via *Agrobacterium* 0.2 OD<sub>600</sub>. We used a randomized block design, in factorial scheme 2 x 5 with 100 and 200 µM acetosiringone and sonication times of 0.0, 2.5, 7.5, 15.0 and 30.0 seconds, four replications and plots with 12 axes, and the evaluations of the experiments performed at 70 days of start of cultivation. In the first article (first experiment), the cultivars have potential for organogenic regeneration. The greatest potential for number of shoots is observed on the Valiosa RR and Conquista cultivars, and to frequency multiple shoots in Valiosa RR. In the second experiment, the cultivation of embrionic axes of Conquista cultivar for two days in induction medium and 20 days in

recovery medium stimulate regeneration greater of seedlings and expression greater of the GUS gene in Conquista cultivar. In the second article (first experiment), the greatest elongation of seedlings and increased expression of the GUS gene occur in embryonic axes of Conquista cultivar maintained by two and three days in induction medium and with 2.5 and 15.0 seconds of sonication in *Agrobacterium* suspension of 0.5 OD<sub>600</sub>. In the second experiment, the greatest elongation of seedlings and increased expression of the GUS gene occur in 100 µM acetosiringone with 7.5 and 30.0 seconds of sonication in embrionic axes Conquista cultivar in *Agrobacterium* suspension of 0.2 OD<sub>600</sub>.

**Keywords:** *Glycine max.* *In vitro* culture. GUS gene. Glufosinate ammonium. Acetosiringone. Organogenesis. *In vitro* regeneration.

I

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** – Representação esquemática do T-DNA (5,3 kb) do pCAMBIA3301 contendo os genes uidA e bar. LB/RB - bordas direita e esquerda do T-DNA, P35S/T35S - região promotora e terminadora do CaMV35S, Tnos - terminador com síntese de nopalina, uidA - região codificadora do gene uidA.....37
- Figura 3.2** – Colônias isoladas de *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 transformadas por choque térmico com o plasmídio pCAMBIA3301 .....37
- Figura 3.3** – Análise de PCR. Presença do gene uidA (GUS) no DNA genômico de colônias transgênicas de *Agrobacterium* .....38
- Figura 3.4** – Fases da transformação: 1. Agroinfecção, 2. Co-cultivo, 3. Recuperação, 4. Seleção e 5. Regeneração de plantas .....42
- Figura 3.5** – Expressão estável do gene GUS, de acordo com a intensidade de coloração azul: alta (+++), média (++) e baixa (+) .....46
- Figura 3.6** – Regeneração organogênica. A - Eixos com desenvolvimento de brotações. B - Desenvolvimento de plântula. C - Plântula enraizada em fase de aclimatização .....48
- Figura 4.1** – Representação esquemática do T-DNA do pCAMBIA3301, contendo os genes uidA e bar. LB/RB – sequências direita e esquerda das bordas do T-DNA; P35S/T35S – promotor e terminador do CaMV 35S; bar – região codante do gene de tolerância a herbicida; Tnos – terminador da síntese de proteína; uidA – região codante do gene de GUS .....61
- Figura 4.2** – Fases da transformação: 1. Agroinfecção, 2. Co-cultivo, 3. Recuperação, 4. Seleção e 5. Regeneração de Plantas .....64

<b>Figura 4.3 –</b>	Expressão estável do gene GUS, de acordo com a intensidade de coloração azul: alta (+++), média (++) e baixa (+) .....	67
<b>Figura 4.4 –</b>	Expressão estável de GUS. A e B - Expressão estável de GUS em vagens imaturas. C - Segmentos de vagens e sementes de plantas não transformadas, D - Expressão estável de GUS em segmentos de vagem e sementes coletadas de plantas transformadas em casa de vegetação. E - Expressão estável em tecidos florais. F - Expressão estável em segmento de cotilédone com embrião (esquerda) e controle negativo (direita). G - Expressão estável de GUS em folhas de plantas na aclimatização e H - Folha de planta não transformada (controle negativo) .....	71
<b>Figura 4.5 –</b>	Desenvolvimento de plantas. A. plantas alongadas em fase de enraizamento. B. plantas com sistema radicular bem desenvolvido, aos 30 dias de cultivo. C. plantas aclimatizando em condições de câmara úmida. D. planta no substrato. E. plantas no vaso .....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> – Meios utilizados para cultura de <i>Agrobacterium</i> , cultura de tecidos e transformação .....	40
<b>Tabela 3.2</b> – Frequência de regeneração organogênica (%), número médio de brotos e frequência de multibrotação (%) em plantas regeneradas a partir de eixos embrionários, induzidos em meio com 3,5 mg.L <sup>-1</sup> de BAP, aos 60 dias do início do cultivo .....	47
<b>Tabela 3.3</b> – Número de plântulas regeneradas sob transformação por <i>Agrobacterium</i> , cultivadas por 1 e 2 dias no meio de indução e por 10, 15 e 20 dias no meio de recuperação, a partir de 70 dias de cultivo .....	49
<b>Tabela 3.4</b> – Eficiência e nível da expressão do gene GUS em plantas sobreviventes após transformação por <i>Agrobacterium</i> , sob 1 e 2 dias no meio de indução e 10, 15 e 20 dias, em meio de recuperação, com início das avaliações aos 70 dias .....	50
<b>Tabela 4.1</b> – Meios utilizados para cultura de <i>Agrobacterium</i> , cultura de tecidos e transformação .....	62
<b>Tabela 4.2</b> – Número de plântulas regeneradas sob transformação por <i>Agrobacterium</i> , com três tempos no meio de indução (dias) e cinco tempos de sonicação (segundos), a partir de 70 dias de cultivo .....	68
<b>Tabela 4.3</b> – Eficiência da expressão do gene GUS em plantas sobreviventes após transformação por <i>Agrobacterium</i> , sob três tempos no meio de indução (dias) e cinco tempos de sonicação (segundos), a partir de 70 dias de cultivo .....	70
<b>Tabela 4.4</b> – Nível de expressão do gene GUS em plantas sobreviventes após transformação por <i>Agrobacterium</i> , sob três tempos no meio de indução (dias) e cinco tempos de sonicação (segundos), a partir de 70 dias de cultivo .....	70

<b>Tabela 4.5</b> – Número de plântulas regeneradas sob transformação por <i>Agrobacterium</i> , com cinco tempos de sonicação (segundos) e duas concentrações de acetosiringona ( $\mu\text{M}$ ), a partir de 70 dias de cultivo. ....	72
<b>Tabela 4.6</b> – Eficiência da expressão do gene GUS em plantas sobreviventes após transformação por <i>Agrobacterium</i> , sob duas concentrações de acetosiringona ( $\mu\text{M}$ ) e cinco tempos de sonicação (segundos), a partir de 70 dias de cultivo .....	74
<b>Tabela 4.7</b> – Eficiência da expressão do gene GUS em plantas sobreviventes após transformação via <i>Agrobacterium</i> , sob duas concentrações de acetosiringona ( $\mu\text{M}$ ) e cinco tempos de sonicação (segundos), a partir de 70 dias de cultivo .....	75

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1	ORIGEM E EVOLUÇÃO .....	19
2.2	MELHORAMENTO GENÉTICO DA SOJA .....	20
2.3	TRANSGÊNICOS NO MUNDO E NO BRASIL .....	20
2.4	CULTURA DE TECIDOS E VIAS DE REGENERAÇÃO .....	21
2.5	VIAS DE REGENERAÇÃO EM SOJA .....	22
2.6	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA.....	24
2.6.1	Transformação por Biobalística ou Direta .....	24
2.6.2	Transformação via <i>Agrobacterium</i> ou Indireta .....	24
2.7	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM SOJA .....	26
2.7.1	Transformação Direta em Soja.....	26
2.7.2	Transformação via <i>Agrobacterium</i> em Soja .....	27
<b>3</b>	<b>ARTIGO A: SELEÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA PARA POTENCIAL ORGANOGÊNICO E AVALIAÇÃO DE PLANTAS REGENERADAS SOB TRANSFORMAÇÃO VIA AGROBACTERIUM</b> .....	32
3.1	INTRODUÇÃO .....	33
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.2.1	Material Vegetal e Preparação dos Explantes .....	35
3.2.2	<i>Agrobacterium</i> e Plasmídio.....	36
3.2.2.1	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	36
3.2.2.2	Confirmação da inserção do plasmídio .....	38
3.2.2.3	Preparação da suspensão bacteriana de trabalho .....	38
3.2.2.4	Preparação da suspensão de agroinfecção .....	39
3.2.3	Pré-Cultivo .....	41
3.2.4	Etapas da Transformação .....	41
3.2.5	Desenvolvimento de Plantas .....	43
3.2.6	Seleção de Cultivares de Soja para Regeneração Organogênica - Experimento 1.....	44

3.2.7	Avaliação do Tempo de Indução e Tempo de Recuperação em Plantas Regeneradas de Eixos Embrionários sob Transformação via <i>Agrobacterium</i> - Experimento 2 .....	44
3.2.8	Análise Estatística .....	45
3.2.9	Análise Histoquímica da Expressão Estável de GUS .....	45
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
3.3.1	Seleção de Cultivares de Soja para Regeneração Organogênica - Experimento 1 .....	46
3.3.2	Avaliação do Tempo de Indução e Tempo de Recuperação sobre a Regeneração de Plantas sob Transformação via <i>Agrobacterium</i> . a partir de Eixos Embrionários - Experimento 2 .....	48
3.4	CONCLUSÕES .....	51
3.5	REFERÊNCIAS .....	51

<b>4</b>	<b>ARTIGO B. REGENERAÇÃO ORGANOGÊNICA DE SOJA SOB TRANSFORMAÇÃO VIA AGROBACTERIUM MEDIADA POR SONICAÇÃO .....</b>	<b>56</b>
4.1	INTRODUÇÃO .....	57
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.2.1	Material Vegetal e Assepsia .....	60
4.2.2	Pré-Cultivo.....	60
4.2.3	Cultivo de <i>Agrobacterium</i> e Preparo da Suspensão de Agroinfecção .....	61
4.2.4	Etapas da Transformação .....	63
4.2.5	Efeito do Tempo de Indução de Regeneração e Tempo de Sonicação na Regeneração de Plantas sob Transformação via <i>Agrobacterium</i> - Experimento 1.....	66
4.2.6	Efeito de Doses de Acetosiringona e Tempo de Sonicação em Plantas Regeneradas de Eixos Embrionários sob Transformação via <i>Agrobacterium</i> - Experimento 2 .....	66
4.2.7	Análise Histoquímica da Expressão Estável de GUS.....	66
4.2.8	Análise Estatística .....	67
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	68

4.3.1	Efeito do Tempo de Indução e Tempo de Sonicação na Regeneração de Plantas sob Transformação via <i>Agrobacterium</i> OD600 de 0,5 – Experimento 1 .....	68
4.3.2	Avaliação de Doses de Acetosiringona e Tempo de Sonicação em Plantas Regeneradas de Eixos Embrionários sob Transformação via <i>Agrobacterium</i> OD600 de 0,2 - Experimento 2 .....	71
4.4	CONCLUSÕES .....	77
4.5	REFERÊNCIAS .....	77
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é originária da Ásia e vem sendo cultivada há mais de 5 mil anos. É considerada uma das espécies mais importantes no mundo, devido aos altos teores de proteínas (40%) e de óleo (20%) presentes no grão. Graças aos programas de melhoramento desenvolvidos no Brasil pelas instituições públicas estaduais e federais, e empresas privadas visando à seleção de genótipos para baixas latitudes com período juvenil longo (P JL), hoje é possível o cultivo dessa leguminosa no cerrado brasileiro.

Ultimamente, o Brasil tem ocupado a segunda posição na produção mundial de soja, atingindo a marca de 68,7 milhões de toneladas com área cultivada de 23,5 milhões de hectares, e produtividade de 2.873 kg/ha, abaixo apenas dos EUA (CONAB, 2010), sendo uma das principais culturas para exportação.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante e da engenharia genética, características até então impossíveis de serem introduzidas pelo método de cruzamentos no melhoramento genético podem ser viabilizadas pela técnica de transformação e pela cultura de tecidos.

Das espécies transgênicas mais comercializadas mundialmente, destacam-se a soja com tolerância a herbicida, o milho com resistência a insetos, o algodão com tolerância a herbicida e resistência a insetos e a canola com o gene GFP; quando, em 2010, a soja transgênica ocupou 81% de uma área de 90 milhões de hectares (JAMES, 2010).

No Brasil, na safra 2009/2010, de 21,4 milhões de hectares semeados com transgênicos de soja, milho e algodão, 16,2 milhões de hectares foram com soja contendo resistência ao herbicida glifosato (Soja RR1) (JAMES, 2010), fato este determinante para impulsionar o melhoramento genético auxiliado pela transformação.

Destacam-se como principais métodos de transformação a biobalística e a transformação por *Agrobacterium*. A biobalística consiste em um processo físico e o via *Agrobacterium tumefaciens* em um processo biológico, mediado por vetor. Apesar de ambos os métodos apresentarem vantagens, uma das maiores desvantagens da biobalística é a inserção de maior número de cópias do gene, enquanto por *Agrobacterium*, por ser um processo natural, ocorre a inserção de uma ou poucas cópias do transgene.

A eficiência do método de transformação depende de um eficiente protocolo de regeneração de plantas. A regeneração pode ser por organogênese ou embriogênese e ambas podem ocorrer direta ou indiretamente. Na regeneração direta, uma planta completa (via embriogênese) ou partes da planta (via organogênese) regeneram-se diretamente a partir do tecido do explante. Na regeneração indireta, o explante passa pela fase intermediária de crescimento de calos, para, em seguida, ocorrer a via de regeneração organogênica ou embriogênica.

Enquanto a regeneração embriogênica é tida como genótipo-específica, a regeneração organogênica não apresenta dependência do genótipo, embora as respostas variem dentro dos genótipos. A regeneração embriogênica, por demandar um maior período *in vitro*, também pode induzir maior variabilidade quando comparada à organogênica, quando, no processo de transformação, a indução de variabilidade *in vitro* deverá ser a menor possível.

As vias de regeneração de plantas são dependentes de vários fatores como espécie, idade fisiológica do explante, tipo de explante, fitorreguladores, balanço nutricional orgânico e inorgânico, fonte de carbono e condições ambientais.

Dos trabalhos mais expressivos com transformação de soja apresentados na literatura, a regeneração organogênica tem sido a mais estudada. Os eixos embrionários de sementes maduras, por apresentar maior eficiência de transformação via *Agrobacterium*, têm-se destacado como alternativa de tecidos-alvo e poderão ser mais explorados, até pela facilidade na obtenção de explantes em qualquer época do ano.

Dada a inexistência de um sistema de transformação altamente eficiente e reprodutível, aliada à necessidade de elevar a eficiência de obtenção de plantas transgênicas, este trabalho teve por objetivos a seleção de genótipos de soja mais responsivos para regeneração organogênica e a otimização de protocolos para transformação genética, com avaliação da expressão do gene repórter GUS, em plantas regeneradas sob transformação via *Agrobacterium*, a partir de eixos embrionários de sementes maduras.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ORIGEM E EVOLUÇÃO

A soja é uma planta perene pertencente ao reino *Plantae*, divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Fabales*, família *Fabaceae* (Leguminosae), subfamília *Faboideae* (*Papilionoideae*), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* e forma cultivada *Glycine max* (L.) Merrill. Existem várias espécies do gênero *Glycine* originárias da África, da Ásia e da Austrália. A sua origem foi descrita na China, aproximadamente em 2.838 A.C., pelo Imperador Sheng-Nung. Sua forma cultivada teve início por volta de 200-300 anos antes da era cristã, e daí foi disseminada para a Coreia e, posteriormente, para o Japão. A soja foi domesticada em latitudes compreendidas entre 30° e 45°N e, em 1740, foi introduzida na Europa (França). Em 1804, seu cultivo, na Pensilvânia, é citado pela primeira vez nos Estados Unidos, quando nesse país, até 1941, a soja foi utilizada principalmente como alimentação animal (PROBST; JUDD, 1973).

No Brasil, a primeira referência data de 1882, na Bahia, onde introduções americanas não tiveram boa adaptação na latitude em torno dos 12° de Latitude Sul. Novas introduções foram realizadas em 1891, em Campinas, São Paulo, com Latitude Sul em torno de 22° 54', onde propiciou melhor desenvolvimento do que na Bahia, seguida de introduções realizadas no Rio Grande do Sul, que por apresentar latitudes de 30° a 22° LS, a soja apresentou melhor adaptação, devido à semelhança com as regiões tradicionais de cultivo no mundo (SANTOS, 1988).

Por muitos anos, a soja foi cultivada somente em caráter experimental por algumas instituições de pesquisa. Por volta de 1935, teve início o cultivo para produção comercial de grãos e já na década de 1960, face à crescente demanda por matéria-prima protéica nos países desenvolvidos, houve aumento da produção e a soja começou a se destacar, adquirindo grande importância no Brasil. O aumento da produção ocorreu juntamente com expansão da área de cultivo, a qual foi se ampliando desde a Região Sul até o Cerrado, entre 20° a 5° de Latitudes Sul, levando o Brasil a uma posição de destaque no cenário mundial (SEDIYAMA, 2009).

Em 2010, o Brasil ocupou o segundo lugar como produtor mundial dessa leguminosa, atingindo a produção de 68,7 milhões de toneladas com área cultivada de 23,5 milhões de hectares e produtividade de 2.873 kg/ha, abaixo apenas dos EUA. Desde 2003, o Brasil vem se destacando como o maior exportador mundial e, na safra 2009/2010, a Região Centro-Oeste destacou-se como a maior produtora de soja, seguida da Região Sul (CONAB, 2010).

## 2.2 MELHORAMENTO GENÉTICO DA SOJA

A grande expansão da soja hoje no Brasil deve-se principalmente aos programas de melhoramento genético desenvolvidos pelas instituições públicas estaduais e federais, e empresas privadas, as quais desenvolveram novas cultivares com características agronômicas superiores, para adaptação aos mais diversos ambientes, maior produtividade, resistência a pragas e doenças, entre outras (ZANCOPE; NASSER, 2005) o que permitiu a sua expansão para a Região Centro-Oeste do País.

Segundo Paludzyszyn Filho, Kiihl e Almeida (1993), os programas desenvolvidos na região tradicional de cultivo, como a Região Sul, basearam-se em introduções de linhagens desenvolvidas no Sul dos EUA. Posteriormente, foram desenvolvidas cultivares com melhor adaptação às condições locais. Os programas de melhoramento voltados para a região do cerrado foram direcionados para o desenvolvimento de linhagens adaptadas às baixas latitudes, por meio da incorporação de alelos que conferissem a característica período juvenil longo (P JL).

## 2.3 TRANSGÊNICOS NO MUNDO E NO BRASIL

Além do melhoramento genético convencional, cultivares com novas características também podem ser viabilizadas por mutações naturais e, mais recentemente, por engenharia genética. Com o advento das técnicas biotecnológicas, a engenharia genética, juntamente com a cultura de tecidos, destacou-se como ferramenta alternativa para a criação de cultivares transgênicas (BRASILEIRO; DUSI, 1999). Características impossíveis de ser introduzidas pelos métodos convencionais, como maior qualidade nutricional, resistência à herbicidas e pesticidas, aumento de tolerância ao estresse ambiental etc, vêm sendo introduzidas

em diversas espécies pelo processo de transformação (CHAN; LEE; CHANG, 1992; CHRISTOU, 1997; EFFENDI; KANNO; KAMEYA, 2000; KE; KHAN; JOHNSON, 2001).

A primeira cultivar transgênica a atingir o mercado consumidor foi o tomate “Flav Savr”, em 1995, que continha o gene que codifica a proteína poligalacturonidase, que causa a quebra da celulose. Esse foi inativado pela técnica de RNA anti-senso, retardando o amadurecimento do fruto (KRAMER; REDENBAUGH, 1994).

Dentre as espécies geneticamente modificadas mais comercializadas em nível mundial, destacam-se a soja com tolerância a herbicida, o milho com resistência a insetos, o algodão com tolerância a herbicida e resistência a insetos, e a canola com o gene GFP. A área ocupada com soja transgênica, desde o início de sua comercialização, a partir de 1996, tem aumentado significativamente segundo dados do *International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications* (ISAAA) (JAMES, 2010).

No Brasil, desde a publicação da lei (Lei N<sup>o</sup> 11.105) que liberou o cultivo e a comercialização da soja RR, em março de 2005, a adoção dessa nova tecnologia tem sido crescente.

O processo de transformação, para ser eficiente, depende basicamente da introdução do DNA exógeno em células totipotentes no genoma (SANTARÉM, 2000) e da regeneração e do crescimento de plantas que expressem o gene inserido (WALDEN; WINGENDER, 1995). Para que a tecnologia seja integrada aos sistemas produtivos, a mesma não deve apresentar riscos à saúde e ao meio ambiente. Sendo assim, é necessário incluir na tecnologia transgênica, etapas para realização das avaliações de riscos (FONTES; MELO, 1999).

#### 2.4 CULTURAS DE TECIDOS E VIAS DE REGENERAÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos devem ser consideradas de suma importância no processo de transformação. Elas apresentam como princípio básico, a totipotência celular, onde cada célula é autônoma e contém todas as informações genéticas necessárias para regeneração de uma planta completa, sendo confirmada pela regeneração embriogênica, a qual tem sido o melhor exemplo de totipotência celular (THORPE, 2000).

A regeneração pode ocorrer por duas vias, a embriogênica e a organogênica, e por duas formas, a direta e a indireta. Na direta, a regeneração ocorre diretamente nos tecidos, sem a formação de calos. Na indireta, inicialmente ocorre a indução de calo e, posteriormente, a regeneração de órgão ou planta (TISSERAT; ESAN; MURASHIGE, 1979). Na regeneração indireta, uma das grandes limitações é a ocorrência de instabilidade genética, também chamada de variação somaclonal, devido à passagem pela fase de calos. Em virtude disso, a regeneração direta tem sido a mais utilizada para transformação por apresentar maior estabilidade genética (MANICKAVASAGAM et al., 2004).

Os fatores inerentes à cultura de tecidos, como a fonte e a concentração de reguladores de crescimento (auxinas e citocininas), a composição nutricional do meio de cultura (nitrogênio orgânico x inorgânico) (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998), a fonte e a concentração de carboidratos, as condições ambientais e o potencial osmótico, têm sido ajustados para a indução de embriogênese e, também, manipulados para otimizar a regeneração por organogênese, mas de modo diferente (JOY; THORPE, 1999). Na regeneração embriogênica, cuja estrutura é bipolar, geralmente é requerida alta concentração de auxina como o 2,4-diclorofenoxiacético ácido (2,4-D) (KORBES; DROSTE, 2005), enquanto na regeneração organogênica, que apresenta estrutura unipolar, é requerida alta concentração de citocinina e baixa de auxina ou alta de citocinina para indução da parte aérea, enquanto para a indução de raiz, é requerida de moderada a alta concentração de auxina (TAIZ; ZEIGER, 1991).

## 2.5 VIAS DE REGENERAÇÃO EM SOJA

Quanto ao processo de regeneração *in vitro*, a soja apresenta regeneração *in vitro* via organogênese ou embriogênese, embora ambas possuam especificidades genótípicas para respostas morfogenéticas (SANTARÉM; FERREIRA, 1997). Tanto a embriogênese quanto a organogênese podem ocorrer de maneira direta ou indireta. Enquanto a regeneração embriogênica direta é tida como genótipo-específica, a organogênica não é dependente do genótipo, embora haja variação entre os genótipos (NEDEV et al., 2007; REICHERT; YOUN; WOODS, 2003; TEIXEIRA et al., 2011).

Estudos indicam que a embriogênese primária apresenta origem multicelular, enquanto a embriogênese secundária se origina a partir de uma única célula na superfície dos embriões primários. Esta via de regeneração tem sido utilizada para transformação, pois além da vantagem de ter uma rápida proliferação em meio de cultura, também apresenta baixa frequência de produção de plantas quiméricas (FINER, 1988).

A embriogênese somática em soja foi descrita primeiramente por Christianson, Warnick e Carlson (1983) e, segundo Droste et al. (2001), cultura embriogênica tem sido um dos métodos mais eficientes para a regeneração de plantas e considerado o mais apropriado para a transformação (SAMOYLOV; TUCKER; PARROT, 1998). A embriogênese direta tem sido obtida a partir de cultura em suspensão de cotilédones imaturos (PARROTT et al., 1989) e de embriões zigóticos de cotilédones imaturos (TOMLIN et al., 2002).

A via de regeneração organogênica direta vem sendo estudada desde a década de 1980 e, em soja, tem sido verificada a partir de diferentes tecidos como nó de folha primária (KIM; LAMOTTE; HACK, 1990), nó cotiledonar (DONALDSON; SIMMONDS, 2000), segmentos de hipocótilo (REICHERT; YOUN; WOODS, 2003), epicótilo (SHETTY; ASANO; OOSAWA, 1992), eixo embrionário jovem (McCABE et al., 1988), eixo embrionário de sementes maduras (ARAGÃO et al., 2000; LIU; YANG; WEI, 2004), embrião de cotilédone imaturo (BARWALE; KEANS; WIDHOLM, 1986), cotilédone maduro (KIM et al., 2004) e outros. Dentre os explantes, nó cotiledonar (MA; WU, 2008) e eixo embrionário (LIU; YANG; WEI, 2004; DANG; WEI, 2007) têm-se destacado por apresentarem as maiores frequências de regeneração.

A regeneração embriogênica tem a desvantagem de demandar maior período *in vitro*, podendo induzir maior variabilidade (KOMATSUDA; LEE; OKA, 1992; GESTEIRA, 2002) quando comparada à organogênica (DAN; REIGHCERI, 1998), tornando-se indesejável no processo de transformação.

Um dos fatores limitantes à transformação tem sido a resposta da soja ao cultivo *in vitro*, sendo que a via de regeneração organogênica tem sido ultimamente a mais utilizada para recuperar plantas transgênicas de soja (DONALDSON; SIMMONDS, 2000; OLHOFT et al., 2003; PAZ et al., 2006).

## 2.6 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

A produção de plantas transgênicas pode ser viabilizada por meio de vários métodos de transformação genética que incluem o mediado por polietilenoglicol (PEG), lipossomos, microinjeção, eletroporação (BRASILEIRO; DUSI, 1999), bombardeamento de partículas ou biobalística (FISK; DANDEKAR, 1993), por vetores virais e/ou bacterianos (agroinfecção) e o mediado por *Agrobacterium* (HINCHEE et al., 1988), infiltração a vácuo mediada por *Agrobacterium* (BECHTOLD; ELLIS; PELLETIER, 1993) e transformação via ultrassom - Transformação mediada por *Agrobacterium* assistida por Sonicação - SAAT (SANTARÉM; FERREIRA, 1997; SHRESTHA et al., 2007; PATHAK; YOUSIF, 2008; TRICK; FINER, 1997;) e outros. São tidos como mais comuns a biobalística, também considerado um método direto, e o sistema *Agrobacterium*, considerado um método indireto (BRASILEIRO; DUSI, 1999; TROJANOWSKA, 2002).

### 2.6.1 Transformação por Biobalística ou Direta

A biobalística é uma técnica que consiste na introdução de DNA utilizando-se geralmente plasmídios, os quais são aderidos a partículas de metais como ouro ou tungstênio (microcarreadoras). Esse complexo DNA-partículas é acelerado em direção às células-alvo utilizando aparatos e propelentes baseados em diversos mecanismos de aceleração. O emprego de aceleradores que utilizam baixa pressão de gás hélio, como o denominado “Particle Inflow Gun”, tem sido utilizado com sucesso segundo Droste, Pasquali e Bodanese-Zanettini, 2002.

### 2.6.2 Transformação via *Agrobacterium* ou Indireta

O desenvolvimento de um método efetivo de transformação via *Agrobacterium* é dependente do genótipo, do vigor e da posição do explante no meio, das condições de cultura e do vetor utilizado para a transformação (ZHANG et al., 2000), aliada a um eficiente protocolo de regeneração *in vitro*, sendo a regeneração direta mais desejável para transformação, por minimizar a indução de variabilidade (GESTEIRA, 2002).

O método de transformação indireta é intermediado por vetores do gênero *Agrobacterium*, *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, também conhecidos como patógenos, por serem capazes de infectar plantas naturalmente, causando a doença conhecida como galha da coroa e a síndrome de raiz em cabeleira (SRIVASTAVA et al., 2009). *Agrobacterium* é uma bactéria do solo, tipo bacilo aeróbico, gram negativo, pertencente a família *Rhizobiaceae* que compreende outros gêneros, como as fixadoras de nitrogênio.

Esse método apresenta alta probabilidade de integração de uma ou poucas cópias do transgene (WALDEN; WINGENDER, 1995). Porém, muitas monocotiledôneas e certos tecidos de dicotiledôneas agronomicamente importantes não são suscetíveis a esse método (DANILOVA, 2007), ou são recalcitrantes para regeneração *in vitro*.

Essa bactéria possui um plasmídio denominado Ti, e um fragmento de DNA desse plasmídio, contendo genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de opinas e de fitohormônios (NAM; MATTHYSSE; GELVIN, 1997; TINLAND, 1996), é transferido e integrado no genoma das células de plantas infectadas (LEE et al., 1995), causando a formação do tumor. As bactérias em contato com as células da planta lesada sintetizam substâncias denominadas opinas, as quais estão especificamente relacionadas com a estirpe bacteriana. Desse modo, as opinas estão agrupadas em quatro famílias: octopinas, nopalina, manopina e agrocinopina (WEISING; KAHL, 1996).

No processo da interação *Agrobacterium* com a célula danificada, ocorre a transferência de uma região específica do plasmídio chamada T ou T-DNA ("Transferred DNA") delimitada por 25 pb repetidos nas suas extremidades (VAN SLUYS, 1999), sendo a borda direita dessa região essencial para que ocorra a transferência (WANG et al., 1984).

A região de virulência (*vir*) do plasmídio, quando ativada pelos compostos fenólicos liberados pelas células da planta, inicia o processo de transferência do T-DNA. Essa região compreende um conjunto de operons corregulados pelas mesmas proteínas, onde as unidades denominadas *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* e *virG* encontram-se localizadas ao lado da borda esquerda do T-DNA. Desses, os locos *virA*, *virB*, *virG* e *virD* são essenciais para a formação do tumor, enquanto os demais somente afetam a eficiência da transferência (VAN SLUYS, 1999).

Basicamente, a técnica de transformação consiste em utilizar uma *Agrobacterium* contendo um plasmídeo que foi modificado artificialmente, pela retirada dos oncogenes e inserção de um gene de interesse, e colocá-la em contato com o tecido da planta (HENSEL et al., 2009). Desse modo, as bactérias que infectam o tecido vegetal iniciam o processo de transferência e a transformação do genoma da planta (BRASILEIRO; CANÇADO, 2000).

## 2.7 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM SOJA

Dentre os principais métodos de transformação em soja, destacam-se a biobalística em tecidos embriogênicos (DROSTE; PASQUALI; BODANESE-ZANETTINI, 2002), em eixo embrionário (ARAGÃO; BRASILEIRO, 2002) e o mediado por *Agrobacterium tumefaciens* em células de nó-cotiledonares (OLHOFT; SOMERS, 2001) e eixo embrionário (LIU; YANG; WEI, 2004; DANG; WEI, 2007).

A transformação em soja tem sido um grande desafio, devido à variabilidade genética das cultivares, às diferentes respostas obtidas na cultura *in vitro* e aos procedimentos de transformação (MEURER; DINKINS; COLLINS, 1998; DROSTE; PASQUALI; BODANESE-ZANETTINI, 2002). Até o momento, os processos utilizados mostraram baixa eficiência de transformação, com protocolos normalmente não reprodutíveis (SOMERS; SAMAC; OLHOFT, 2003), dificultando a sua utilização como rotina.

### 2.7.1 Transformação Direta em Soja

O emprego da biobalística iniciou utilizando-se como tecido alvo culturas meristemáticas de eixo de embrião (CHRISTOU; McCABE, 1992) ou embrião somático (STEWART et al., 1996), porém resultando em plantas transgênicas quiméricas. A seguir, o emprego de culturas em suspensão embriogênicas originadas a partir de cotilédones imaturos e mantidas por subcultivo em meio líquido foi, por muito tempo, utilizado para transferência de genes via biobalística (SIMMONDS; DONALDSON, 2000). No entanto, esse sistema tem se mostrado dependente do genótipo, com baixa eficiência de transformação e, além da obtenção de plantas quiméricas, tem apresentado complexidade no padrão de introdução do DNA (HADI; MCMULLEN; FINER, 1996; TRICK; FINER, 1998).

Outro método preconizado utilizando culturas embriogênicas em meio semi-sólido, a partir de cotilédones imaturos, mostrou-se mais promissor e eficiente em relação às culturas embriogênicas em suspensão, por ser mais rápido e menos trabalhoso (SANTARÉM; FINER, 1999). Esse procedimento facilitou viabilizar condições específicas de transformação para cada cultivar, em face à contínua dependência genotípica dos protocolos de transformação (DROSTE; PASQUALI; BODANESE-ZANETTINI, 2002). Outro protocolo que permitiu elevar a frequência de plantas transgênicas foi descrito por Aragão et al. (2000), utilizando eixo embrionário de sementes maduras.

Na transformação por biobalística, já ocorreram eventos de inserção com até 100 cópias de um transgene (REDDY; DINKINS; COLLINS, 2003). A interação entre múltiplas cópias também pode acarretar o silenciamento gênico e dificultar o desenvolvimento de cultivares comerciais geneticamente estáveis. No entanto, esse procedimento pode ser mais rápido e simples, com a vantagem de transformação em tecidos totipotentes como pólen, embriões, meristemas, culturas de células e de organelas, sem a necessidade de compatibilidade bactéria/hospedeiro exigida pelo sistema *Agrobacterium*.

### 2.7.2 Transformação via *Agrobacterium* em Soja

O primeiro relato sobre obtenção de plantas transgênicas de soja via *Agrobacterium*, foi para a cultivar Peking, em tecidos de nó-cotiledonar de sementes germinadas (HINCHEE et al., 1988). No entanto, trabalhos desenvolvidos posteriormente com nó-cotiledonar e com variações do agente seletivo em meio sólido, possibilitaram a obtenção de plantas transgênicas, porém, com regeneração de muitos escapes (ZHANG et al., 1999; CLEMENTE et al., 2000; OLHOFT; SOMERS, 2001; KO et al., 2003).

A produção de plantas transgênicas de soja via *Agrobacterium* tem encontrado em culturas embriogênicas algumas limitações devido à maior dependência da cultivar utilizada, quanto à infecção e à regeneração dos tecidos, aliada à baixa frequência de transferência do T-DNA da bactéria para a planta (MEURER; DINKINS; COLLINS, 1998; DONALDSON; SIMMONDS, 2000; PAZ et al., 2004). Isso faz com que a regeneração organogênica direta, a partir de nó-cotiledonar e eixo embrionário, seja mais explorada para transformação em relação

às culturas embriogênicas (LIU; YANG; WEI, 2004; DANG; WEI, 2007, OLHOFT et al., 2002)

No entanto, a existência de variabilidade genética nos genótipos quanto à suscetibilidade à *Agrobacterium*, mostrando a dependência da cultivar utilizada, aliada à baixa frequência de transferências do T-DNA da bactéria, para os tecidos da planta e a regeneração em cultura de tecidos (MEURER; DINKINS; COLLINS, 1998; DONALDSON; SIMMONDS, 2000), tem permitido a regeneração de plantas transgênicas férteis, ainda que em baixa frequência.

Meurer, Dinkins e Collins (1998), testando diferentes estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* em explantes de soja, observaram maior virulência para a estirpe KYRT1 em relação às estirpes EHA105, GV3850 e LBA4404. Ko et al., (2003) avaliando o efeito da incubação de cotilédones imaturos da cultivar Jack, em suspensão das estirpes KYRT1, GV3101 e EHA105 de *Agrobacterium*, contendo o vetor binário pCAMBIA1305.1, observaram maior frequência embriogênica quando os cotilédones foram orientados com a posição abaxial voltada para cima, após incubação na suspensão com KYRT1. No entanto, existem controvérsias com relação à virulência das estirpes de *Agrobacterium*. Segundo Torrinsky et al. (1997), o aumento da eficiência de transformação poderia ser alcançado pelo uso de estirpes hipervirulentas de *Agrobacterium*, enquanto outros autores têm sugerido que linhagens bacterianas menos eficientes em transferir o T-DNA podem ser mais eficientes em introduzir inserções de cópias únicas no genoma (GELVIN, 2003; KO; NELSON; KORBES, 2004).

O sucesso na seleção de tecidos transformados depende da adoção de um bom marcador de seleção, o qual tem sido determinante para a recuperação *in vitro* de células (plantas) transgênicas, em detrimento às células não transformadas (ARAGÃO; BRASILEIRO, 2002). O gene utilizado como marcador no processo de transformação vai possibilitar que agentes seletivos específicos sejam utilizados para selecionar as células transformadas, ou seja, conferindo a elas uma vantagem seletiva, permitindo que cresçam mais rápido e melhor, eliminando, desse modo, as células não transformadas (ARAGÃO; BRASILEIRO, 2002).

De um modo geral, os agentes seletivos devem ser utilizados na fase inicial da transformação, para selecionar precocemente as células transformadas (SAWAHEL, 1994), podendo ou não se estender até a fase de enraizamento. Os genes marcadores de seleção, pelo seu modo de ação, são

classificados em três categorias, destacando-se em cada categoria de resistência à herbicidas (*bar*, *ahas*), à antibióticos (*hpt*) e genes marcadores de seleção positiva (*manA*).

O gene *bar* clonado de *Streptomyces hygroscopicus* (MURAKAMI et al., 1986), o qual codifica para a enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), tem por função inativar, por acetilação do grupo NH<sub>2</sub> livre, usando acetil coenzima A como cofator, o herbicida conhecido como glufosinato de amônia também chamado fosfinotricina (PPT) (THOMPSON et al., 1987), prevenindo a sua ligação com a enzima glutamina sintetase (GS), ou seja, atua como inibidor competitivo da enzima glutamina sintetase (GS), a qual se encontra envolvida na assimilação de amônia e possui uma função importante na regulação do metabolismo do nitrogênio (DeBLOCK et al., 1987).

Além do gene marcador de seleção, outros genes conhecidos como genes repórteres também devem estar presentes no transgene, a fim de acompanhar a expressão do gene inserido mais rapidamente, pois codificam para uma proteína, geralmente de atividade enzimática, cujo produto é facilmente detectável. No caso, o gene *uidA* isolado de *Escherichia coli* é, atualmente, o mais utilizado (JEFFERSON et al., 1987). Esse gene codifica para a β-glucuronidase (GUS), uma hidrolase que catalisa a clivagem de uma grande variedade de β-glucuronídeos disponíveis comercialmente como substratos. A presença ou a ausência de GUS pode ser detectada, por meio de avaliação histoquímica, adicionando-se um substrato cromogênico como o X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol glucuronídeo, onde, na presença da enzima, forma um precipitado insolúvel de cor azul, resultante da dimerização do produto da hidrólise do X-Gluc (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

No processo de transformação, os compostos fenólicos são muito importantes na fase de infecção dos tecidos por *Agrobacterium*. Hoje, sabe-se que as células com ferimentos, mas metabolicamente ativas, excretam compostos fenólicos de baixo peso molecular e, no momento da infecção, as bactérias são atraídas por esses compostos. Após a conexão inicial da bactéria com o tecido da planta, essas moléculas induzem os genes de virulência da região vir do plasmídeo Ti a ativar a transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para dentro do tecido da planta (TZFIRA; CITOVSKY, 2006). Essas moléculas foram identificadas como acetosiringona (AS) ou a-hidroxi-acetosiringona (OH-AS) (STACHEL et al., 1985),

chalconas e derivados do ácido cinâmico (STACHEL, 1986) e são responsáveis pela iniciação da transferência do T-DNA (ZAMBRYSKI; TEMPÉ; SCHELL, 1989).

A inexistência de procedimentos de regeneração eficientes que iniciem uma rápida proliferação de origem unicelular no tecido e o uso de técnicas que causem injúrias maiores no tecido alvo têm sido obstáculos para a transformação estável de soja por *Agrobacterium* (SANTARÉM et al., 1998). No entanto, várias tentativas para otimizar a transformação vêm sendo adotadas por meio do emprego de produtos ou processos físicos (TRICK; FINNER, 1997; YAN et al., 2000).

A indução de microferimentos ou ferimentos no tecido alvo tem facilitado a agroinfecção e, conseqüentemente, melhorado a eficiência da expressão transiente na transformação de plantas de soja com baixa suscetibilidade a infecção (TRICK; FINER, 1997). Por exemplo, a sonicação assistida por transformação mediada por *Agrobacterium* (SAAT) aplicada na fase de incubação permitiu expor os explantes a ondas de ultra-som, por curtos períodos de tempo, facilitando o contato da *Agrobacterium* com células potencialmente regenerativas, localizadas em camadas mais profundas nos tecidos, induzindo maior expressão transiente do gene GUS em tecidos de cotilédones imaturos (SANTARÉM et al., 1998) e suspensões embriogênicas (TRICK; FINER, 1998), porém resultando em plantas estéreis. Recentemente, a transformação mediada por *Agrobacterium* assistida por sonicação e infiltração a vácuo, sem cultura de tecidos, viabilizou a obtenção de plantas transgênicas férteis de feijão a partir de plântulas (LIU et al., 2005).

Ferimento realizado com bisturi, no sentido perpendicular ao hipocótilo (gema e nó-cotiledonar), aliado ao uso de componentes de tiol (L-cisteína e DTT), na fase de co-cultivo e seleção com higromicina B, elevou de 0,7 a 16,4% a eficiência de transformação da cultivar Bert (OLHOFT et al., 2003). A transformação assistida por ferimentos causados por multi agulhas em nó cotiledonar elevou a eficiência acima de 12 % para a cultivar chinesa Jungery (XUE; XIE; ZHANG, 2006), enquanto ferimentos induzidos por multi-agulhas (bioprong) em cotilédones imaturos não afetaram a eficiência de transformação, por não alterar a competência celular ao longo da margem do explante (KO et al., 2003; KO; KORBAN, 2004).

O emprego de componentes de tiol, isolados ou combinados com outros agentes, tem influenciado positivamente a resposta da expressão transiente. A adição de L-cisteína, de ação anti-oxidante junto ao meio de co-cultivo (OLHOFT

et al., 2001; OLHOFT; SOMERS, 2001) ou a adição de anti-oxidantes aliada a um sistema de seleção através da Hygromicina B, após infecção com *Agrobacterium*, elevou significativamente a expressão transiente em células transformadas com T-DNA e, conseqüentemente, a produção de plantas transgênicas férteis a partir de nó cotiledonar (OLHOFT; SOMERS, 2001; OLHOFT et al., 2003).

O agente surfactante Silwet L-77 é um composto de organosilicone, capaz de reduzir a tensão superficial e facilitar a entrada de microorganismos pelas aberturas naturais ou ferimentos na planta. A inclusão de agente surfactante, na fase de incubação, e cisteína, na fase de co-cultivo, melhoraram significativamente a eficiência de transformação, comparando-se ao uso dos dois produtos isoladamente em explante de nó cotiledonar de cultivares chinesas, permitindo a obtenção de 145 plantas transgênicas morfológicamente normais e férteis (LIU; WEI; HUANG, 2008).

Dada a maior expressividade da eficiência de transformação com o gene marcador de seleção de resistência a herbicida, nos protocolos avaliados neste trabalho, será utilizado o gene *bar* como marcador de seleção.

Os resultados de transformação via *Agrobacterium*, alcançados até o momento, com regeneração organogênica, apresentaram frequências de transformação consideradas baixas e graus de respostas variados entre os genótipos, observando-se também a regeneração de plantas quiméricas e/ou estéreis.

Nesse sentido, a seleção de genótipos para regeneração organogênica, a partir de eixos embrionários aliados à manipulação dos processos físicos inerentes às fases de transformação como tempo de indução, de recuperação e de sonicação, de compostos fenólicos como a acetosiringona e da *Agrobacterium* com OD<sub>600</sub> de 0,5 e 0,2, poderão otimizar a eficiência de expressão do gene GUS e, conseqüentemente, a eficiência de transformação, recuperando maior número de plantas transgênicas.

### 3 ARTIGO A: SELEÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA PARA POTENCIAL ORGANOGÊNICO E AVALIAÇÃO DE PLANTAS REGENERADAS SOB TRANSFORMAÇÃO VIA *AGROBACTERIUM*.

#### Resumo

Atualmente, a transformação genética tem sido uma ferramenta utilizada para transpor barreiras entre as espécies, possibilitando a obtenção de plantas transgênicas. O sucesso da técnica de transformação é altamente dependente de um bom protocolo de regeneração *in vitro* e a via de regeneração organogênica direta tem sido a mais utilizada. Este trabalho teve por objetivo a seleção de genótipos de soja para regeneração organogênica e avaliação do tempo de indução no meio de regeneração de brotações e do tempo de recuperação de plantas sob transformação via *Agrobacterium*, a partir de eixos embrionários de sementes maduras da cultivar Conquista. Foram implantados dois experimentos. No primeiro, foi avaliada a regeneração organogênica das cultivares Conquista, Valiosa RR, Perdiz, V.Max, Pintado, Tucunaré, Potência, BRS-232 e Tabarana. Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições e parcelas com dez eixos embrionários. Aos 70 dias do início da cultura, foram avaliados a frequência de regeneração, o número médio de brotos por eixo embrionário e a frequência de multibrotação (eixos com número de brotos maior ou igual a quatro). No segundo experimento, os eixos embrionários da cultivar Conquista foram cultivados no meio de indução de brotações composto pelos sais do meio MS, vitaminas do meio B5, sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>), BAP (3,5 mg.L<sup>-1</sup>), gelrite (2,2 g.L<sup>-1</sup>), pH 5,8 e neste foram mantidos durante 1 e 2 dias e na fase de recuperação foram mantidos durante 10, 15 e 20 dias. Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso, no esquema fatorial de 2 x 3, quatro repetições e parcelas com doze eixos embrionários. Aos 70 dias do início da cultura foram avaliados a regeneração de plântulas e a eficiência da expressão do gene GUS. No experimento 1, as cultivares apresentam potencial para regeneração organogênica. O maior potencial para número de brotos é observado nas cultivares Valiosa RR e Conquista e, para frequência de multibrotação na cultivar Valiosa RR. No Experimento 2, o cultivo de eixos embrionários da cultivar Conquista por dois dias no meio de indução e 20 dias no meio de recuperação estimulam maior regeneração de plântulas e maior expressão do gene GUS.

**Palavras-chave:** *Glycine max*. Cultura *in vitro*. GUS Gene. Glufosinato de amônia.

#### Abstract

Currently, genetic transformation has been a tool to overcome barriers between species and it made possible to produce transgenic plants. The success of the transformation technique is highly dependent on a good protocol for *in vitro* regeneration, and regeneration via direct organogenic has been the most useful tool.

This work aimed to select soybean genotypes for organogenic regeneration and to evaluate the induction time in the middle of shooting regeneration and recovery time for plants in *Agrobacterium* transformation from embryonic axes of mature seeds of the Conquista cultivar. Two experiments were carried out. In the first experiment, the organogenic regeneration was evaluated on the cultivars Conquista, Valiosa RR, Perdiz, V.Max, Pintado, Tucunaré, Potência, BRS-232 and Tabarana. We used a complet randomized block design with four replications and ten embryonic axes. At 70 days after starting culture, we evaluated the frequency of regeneration, the average number of shoots per embryonic axis and the frequency of multiple shoots (axes with number of shoots greater than or equal to four). In the second experiment, the embryonic axes of Conquista cultivar, were cultured on shoot induction medium composed of salts of MS medium, vitamins of B5 medium, sucrose (30.0 g.L<sup>-1</sup>), BAP (3.5 mg.L<sup>-1</sup>), gelrite (2.2 g.L<sup>-1</sup>), pH 5.8 and this was maintained for 1 to 2 days and the recovery phase were maintained during 10, 15 and 20 days. We used a randomized block design in a factorial design, four replicates and twelve embryonic axes. At 70 days after starting culture, we evaluated the organogenic potential, regeneration of seedlings, and calculated the efficiency of stable GUS gene expression. In the first experiment, all cultivars showed organogenic potential for regeneration. Valiosa RR and Conquista cultivars showed higher potential for the average number of shoots. Valiosa RR cultivar showed a higher frequency of multiple shoots. In experiment 2, the cultivation of embryonic axes of Conquista cultivar for two days in induction medium and for 20 days on the recovery medium, resulted in increased regeneration of shoots and greater efficiency of expression of the GUS gene.

**Keywords:** *Glycine max.* *In vitro* culture. GUS gene. Glufosinate ammonium.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Com os avanços das técnicas biotecnológicas como tecnologia do DNA recombinante, genética molecular e engenharia genética, a introdução de genes exógenos em plantas tornou-se uma realidade (PERANI et al., 1986). Atualmente, a transformação genética tem sido uma ferramenta poderosa, transpondo as barreiras de incompatibilidade entre as espécies e permitindo a produção de plantas transgênicas que apresentem características de interesse como resistência a estresses ambientais, tolerância a herbicidas, fungos, bactérias, vírus e insetos, redução no uso de defensivos e aumento da produção (LAKSHMANAN et al., 2005).

Dos métodos de transformação mais utilizados em soja, destaca-se a biobalística e o via *Agrobacterium*. O bombardeamento de partículas ou biobalística em tecidos embriogênicos (ARAGÃO et al., 2000; DROSTE; PASQUALI; BODANESE-ZANETTINI, 2002), mas que apresenta um padrão de inserção

complexo do transgene no genoma da planta e resultando em maior número de cópias, enquanto o mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, em tecidos de nó-cotiledonar (OLHOFT et al., 2001; OLHOFT et al., 2003; ZENG et al., 2004), em eixo embrionário (LIU; YANG; WEI, 2004; DANG; WEI, 2007; LIU; WEI; HUANG, 2008), hipocótilo (WANG; XU, 2008), e outros, apresenta padrão de integração definida do transgene para regiões transcripcionalmente ativas dos cromossomas e com inserção de um ou baixo número de cópias (BIRCH, 1997).

Além da introdução do DNA na célula alvo e da integração do DNA exógeno no genoma da célula, é necessário que ocorra a regeneração de plantas completas e férteis, o que requer protocolos eficientes para regeneração *in vitro* (PARROT; CLEMENTE, 2004).

A soja apresenta regeneração *in vitro* via organogênese ou embriogênese, que podem ocorrer de forma direta ou indireta. Embora ambas possuam especificidades genótípicas para respostas morfogenéticas (SANTARÉM; FERREIRA, 1997), a embriogênese direta é tida como genótipo-específica e a organogênese não é dependente do genótipo, mas existe variação de resposta entre os genótipos, ou seja, a eficiência organogênica está relacionada aos genótipos (REICHERT; YOUN; WOODS, 2003; NEDEV et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2011).

A embriogênese, por demandar maior período *in vitro*, pode induzir maior variabilidade (KOMATSUDA; OHYAMA, 1987; GESTEIRA, 2002) quando comparada à organogênese (DAN; REIGHCERI, 1998), enquanto, no processo de transformação, a variabilidade deverá ser a menor possível.

A regeneração organogênica é um sistema mais complexo e depende da manipulação e da interação dos fatores inerentes à cultura de tecidos, segundo Joy e Thorpe (1999), como a fonte de explantes, meios de cultura, fatores ambientais. A organogênese depende dos reguladores de crescimento exógenos (auxina e citocinina), resultantes da resposta do explante à necessidade hormonal, nas diversas fases do cultivo (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Os estudos com regeneração organogênica direta iniciaram na década de 1980 e têm ocorrido a partir de diferentes tecidos como nó de folha primária (KIM; LAMOTTE; HACK, 1990), nó cotiledonar (DONALDSON; SIMMONDS, 2000), segmentos de hipocótilo (REICHERT; YOUN; WOODS, 2003), epicótilo (SHETTY; ASANO; OOSAWA, 1992), eixo embrionário jovem (McCABE et al., 1988), eixo embrionário de sementes maduras (ARAGÃO et al., 2000; LIU;

YANG; WEI, 2004), embrião de cotilédone imaturo (BARWALE; KEANS; WIDHOLM, 1986) e cotilédone maduro (KIM et al., 2004).

Ultimamente, a organogênese vem sendo mais utilizada para recuperar plantas transgênicas de soja (OPABODE, 2006, SHAN et al., 2005), e dentre os explantes, nó cotiledonar (OLHOFT et al., 2003; PAZ et al., 2006; MA; WU, 2008) e eixo embrionário (LIU; YANG; WEI, 2004; DANG; WEI, 2007) têm-se destacado por apresentarem as maiores frequências de regeneração.

A manipulação dos processos físicos inerentes às fases de transformação como o tempo no meio de indução, de recuperação, de sonicação, dos compostos fenólicos (acetosiringona), dos componentes de thiol de ação antioxidante (L-cysteína) e agentes surfactantes (Silwett L-77), pode otimizar a eficiência de transformação e tem viabilizado protocolos mais eficientes, recuperando maior número de plantas transgênicas (OPABODE, 2006).

Apesar de inúmeros trabalhos de transformação, via *Agrobacterium*, realizados com nó-cotiledonar, resultados mais recentes têm mostrado maiores eficiências para eixo embrionário, utilizando como agente seletivo a higromicina (LIU; YANG; WEI, 2004) e o glufosinato (*bar*) (DANG; WEI, 2007). Esses resultados têm revelado os explantes de eixo embrionário como uma alternativa de tecido-alvo, podendo ser mais explorado pela facilidade na obtenção de explantes em qualquer época do ano.

Este trabalho teve por objetivo a seleção de cultivares de soja quanto ao potencial organogênico e avaliar a interação entre o tempo no meio de indução de regeneração e o tempo de recuperação de plantas sob transformação via *Agrobacterium*, a partir de eixos embrionários de sementes maduras da cultivar Conquista.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Material Vegetal e Preparação dos Explantes

Foram implantados dois experimentos. O primeiro para a seleção de genótipos de soja, quanto a regeneração organogênica de eixos embrionários de sementes maduras, das cultivares Conquista, Valiosa RR, Perdiz, V.Max, Pintado,

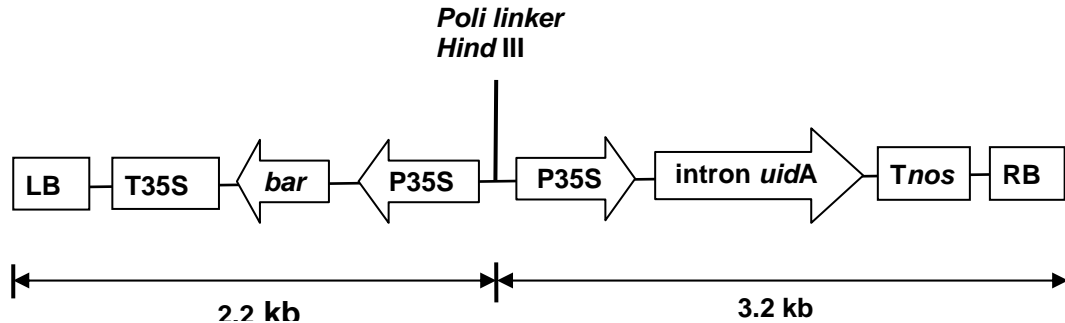
Tucunaré, Potência, BRS-232 e Tabarana, e o segundo para avaliar dois tempos (um e dois dias) no meio de indução de regeneração e três tempos (10, 15 e 20 dias) no meio de recuperação de plantas regeneradas sob transformação via *Agrobacterium*, da cultivar Conquista. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biotecnologia da Tropical, Melhoramento e Genética - TMG, Cambé, PR. Foram utilizadas como doadoras de explantes sementes maduras das cultivares de soja procedentes da TMG e Fundação MT, safras 2008/2009 e 2009/2010. Sementes em ótimas condições fisiológicas foram selecionadas por tamanho (acima da peneira 5,5) e lavadas com água corrente e detergente. Em câmara asséptica foram imersas em álcool 70% por 50 segundos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO) a 0,5% + Tween 20 (4 gotas/por 100 mL), durante 20 minutos, e enxaguadas por cinco vezes com água destilada e autoclavada. A seguir, as sementes foram imersas em água estéril por uma noite, para o entumescimento. Em câmara asséptica, sob lupa estereoscópica, as sementes foram abertas com o auxílio de pinças e bisturis, e os cotilédones e folhas primárias foram excisados, expondo a região meristemática dos eixos embrionários. Nos experimentos, foram utilizados eixos embrionários de coloração amarelo claro com aspecto translúcido e comprimento maior ou igual a 3,5 cm.

### 3.2.2 *Agrobacterium* e Plasmídio

#### 3.2.2.1 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Foram utilizados a cepa desarmada EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* e o plasmídio pCAMBIA3301, contendo o gene *bar* que codifica para a enzima PPT e confere resistência ao herbicida glufosinato de amônia e o gene *uidA* que codifica para a enzima beta-glucuronidase (GUS) (Figura 3.1), como marcador de seleção visual, sob o controle do promotor 35SCaMV.

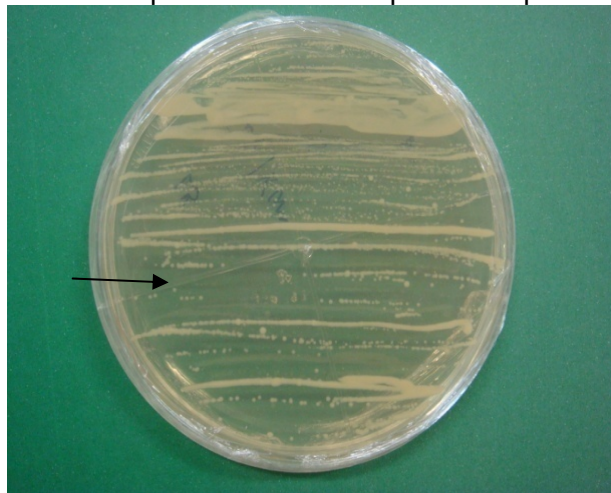
**Figura 3.1** – Representação esquemática do T-DNA (5,3 kb) do pCAMBIA3301 contendo os genes *uidA* e *bar*. LB/RB - bordas direita e esquerda do T-DNA, P35S/T35S - região promotora e terminadora do CaMV35S, Tnos - terminador com síntese de nopalina, *uidA* - região codificadora do gene *uidA*.



A transformação de *Agrobacterium* foi realizada pelo método de choque térmico, onde a suspensão de *Agrobacterium* EHA105, juntamente com o plasmídeo pCAMBIA3301 clonado em *E.coli*, foi submetida a condições extremas de temperatura, permitindo que as membranas celulares se tornassem permeáveis possibilitando a passagem do vetor para a *Agrobacterium* (HOLSTERS et al., 1978), seguindo o protocolo de Brasileiro e Carneiro (1998).

Após a transformação da *Agrobacterium*, a suspensão foi riscada em placas de Petri, contendo o meio sólido LB (LURIA BERTANI), composto por triptona ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ), extrato de levedura ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ), pH 7,5 e agar ( $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ ), e mantidas à temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  até o crescimento de colônias isoladas (Figura 3.2).

**Figura 3.2** – Colônias isoladas de *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 transformadas por choque térmico com o plasmídeo pCAMBIA3301.

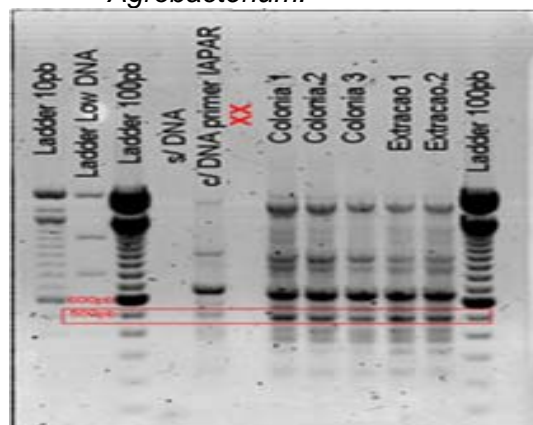


### 3.2.2.2 Confirmação da inserção do plasmídio

Para a reação de PCR, metade de algumas colônias, possivelmente transformadas, foram diluídas em 50  $\mu$ L de água deionizada e 2  $\mu$ L foram adicionados ao mix da reação, utilizando-se o primer da reação contendo 21 pb, correspondentes às sequências Forward GGT CGT CAT GAA GAT GCG GAC e Reverse ACG GTT CAG GCA CAG CAC ATC, do gene GUS. O ciclo de reação consistiu de 94°C por três 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 51°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto e um ciclo de extensão final a 72°C por quatro minutos. Em seguida, às amostras amplificadas do DNA plasmidial foram adicionadas o tampão TA 1X e foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio, durante uma hora, para separar as bandas correspondentes a 520 pb do gene GUS.

Após a corrida no gel de eletroforese, o produto do PCR foi transferido para o transluminador e as imagens visualizadas confirmaram a inserção do plasmídio nas colônias avaliadas (Figura 3.3).

**Figura 3.3** – Análise de PCR. Presença do gene *uidA* (GUS) no DNA genômico de colônias transgênicas de *Agrobacterium*.



### 3.2.2.3 Preparação da suspensão bacteriana de trabalho

As meias colônias transformadas foram transferidas para 3 mL de meio de crescimento líquido de LB (Tabela 3.1), durante 48 horas, ou até atingir a

fase exponencial e, em seguida, foram riscadas novamente em placas de Petri contendo meio sólido LB, para o desenvolvimento de novas colônias a serem utilizadas nos experimentos de transformação. O restante da suspensão foi armazenado em glicerol 20% e mantido à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , como solução estoque de trabalho. Após o crescimento das novas colônias, as placas foram mantidas à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.2.4 Preparação da suspensão de agroinfecção

Uma colônia mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  foi ressuspensa em 3 mL de meio LB contendo os antibióticos Rifampicina ( $30\text{ mg.L}^{-1}$ ) e Kanamicina ( $50\text{ mg.L}^{-1}$ ) e, após 24 horas, transferida para o volume final de 50 mL do mesmo meio contendo os antibióticos apropriados, por 24 a 48 horas ou até atingir a fase exponencial. Atingida essa fase, a suspensão foi centrifugada à temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$ , com 3.500 rpm durante 10 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensa em meio de agroinfecção (MA, Tabela 3.1), segundo Liu et al. (2004). A suspensão foi quantificada em espectrofotômetro, ajustando a  $\text{OD}_{600}$  para 0,5 e adicionando, a seguir, acetosiringona a  $200\text{ }\mu\text{M}$ .

**Tabela 3.1** – Meios utilizados para cultura de *Agrobacterium*, cultura de tecidos e transformação.

Meios*	Composição
Meio de <i>Agrobacterium</i> (LB <sup>a</sup> )	Triptona (10 g.L <sup>-1</sup> ), extrato de levedura (5 g.L <sup>-1</sup> ) e cloreto de sódio 10 (10 g.L <sup>-1</sup> ), pH7,5, agar, (7,0 g.L <sup>-1</sup> ).
Meio de agroinfecção (MA)	Sais do meio MS <sup>b</sup> e vitaminas do meio B5 <sup>c</sup> (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (6,0 mg.L <sup>-1</sup> ), pH 5,4, acetosiringona** 200 µM.
Meio de co-cultivo (MC)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (6,0 mg.L <sup>-1</sup> ), pH 5,4, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), acetosiringona 100 ou 200 µM.
Meio de recuperação (MR)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), IBA (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), pH 5,8, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), cefotaxima*** (300 mg.L <sup>-1</sup> )
Meio de seleção 1 (MS1)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), IBA (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), PPT (0,5 mg.L <sup>-1</sup> )(Finale), pH 5,8, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), cefotaxima (300 mg.L <sup>-1</sup> )
Meio de seleção 2 (MS2)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), IBA (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), PPT (1,0 mg.L <sup>-1</sup> )(Finale), pH 5,8, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), cefotaxima (300 mg.L <sup>-1</sup> )
Meio de seleção 3 (MS3)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), IBA (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), PPT (1,5 mg.L <sup>-1</sup> )(Finale), pH 5,8, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), cefotaxima (300 mg.L <sup>-1</sup> )
Meio de enraizamento (ME)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), IBA (1,0 mg L <sup>-1</sup> ), GA <sub>3</sub> ****(0,5 mg.L <sup>-1</sup> ), pH 5,8, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), cefotaxima (150 mg.L <sup>-1</sup> )

<sup>a</sup>Luria Bertoni, (1970); <sup>b</sup>Murashigue e Skoog (1962); <sup>c</sup>Gamborg et al.,(1968).\*Os meios foram autoclavados durante 20 minutos a 120° C e 1atmosfera de pressão. \*\* Acetosiringona, \*\*\*cefotaxima e \*\*\*\*GA<sub>3</sub> filtrados em membrana de millipore de 0,22 micra de espessura.

### 3.2.3 Pré-Cultivo

Os eixos embrionários da cultivar Conquista, após a fase de assepsia, foram cultivados em placas de Petri de 90 x 15 mm contendo 25 mL do meio de indução composto pelos sais do meio MS, vitaminas do meio B5, sacarose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ), BAP ( $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), gelrite ( $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ ), pH 5,8 e neste foram mantidos durante seis dias, no experimento 1, e durante um e dois dias, no experimento 2.

### 3.2.4 Etapas da Transformação

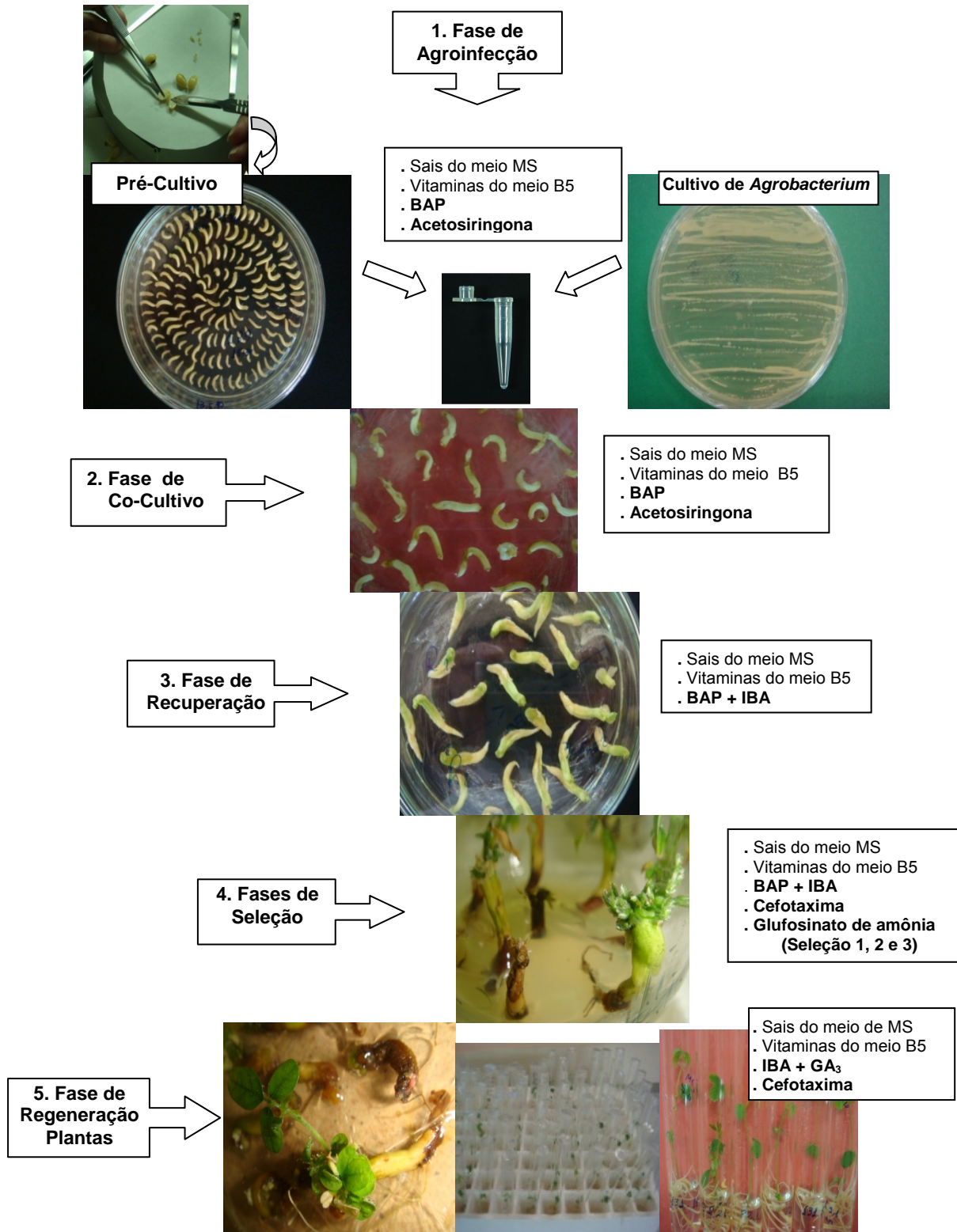
O processo de transformação foi dividido em cinco fases: agroinfecção, co-cultivo, recuperação, seleção e regeneração de plantas (DANG; WEI, 2007), conforme a Figura 3.4.

1. Fase de Agroinfecção. Os eixos embrionários pré-cultivados em meio de indução foram submetidos à agroinfecção, transferindo-se 15 eixos por microtubo de 2 mL contendo 1,5 mL do meio de agroinfecção (MA, Tabela 3.1) e mantidos nesta suspensão por um período de 20 horas em ausência de luz.

2. Fase de Co-cultivo. Após 20 horas, os eixos embrionários foram retirados da suspensão e transferidos para papel de filtro esterilizado para absorver o excesso da suspensão de *Agrobacterium*. Após a absorção, os eixos foram transferidos para placas de Petri com meio sólido MC (Tabela 3.1), contendo  $200 \mu\text{M}$  de acetosiringona filtrada em membrana de millipore de 0,22 micra e pH ajustado para 5,4 e mantidos à temperatura de  $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  em ausência de luz, durante o período de cinco dias.

3. Fase de Recuperação. Os eixos, após a fase de co-cultivo, foram enxaguados por uma vez com o meio de co-cultivo líquido, secos em papel de filtro autoclavado e transferidos para placas de Petri contendo o meio sólido de recuperação (MR, Tabela 3.1), acrescentando-se, após a autoclavagem,  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  de cefotaxima filtrada em membrana de millipore de 0,22 micra. No experimento dois, os eixos foram mantidos neste meio durante o período de 10, 15 e 20 dias.

**Figura 3.4 –** Fases da transformação: 1. Agroinfecção, 2. Co-cultivo, 3. Recuperação, 4. Seleção e 5. Regeneração.



4. Fases de Seleção. Após a fase de recuperação, os eixos foram transferidos para frascos de 180 mL contendo 25 mL do meio de seleção 1 com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de glufosinato de amônia (Finale) (MS1, Tabela 3.1) adicionando, após a autoclavagem,  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  de cefotaxima filtrada. Nesta fase foram utilizadas duas doses crescentes de glufosinato de amônia de  $0,5$  e  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , segundo metodologia de Dang e Wei (2007) e com substituição da 3ª dose de  $1,25$  para  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , a fim de eliminar os possíveis escapes. Os eixos, após 20 dias em meio de seleção 1 ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), foram transferidos para o meio de seleção 2 com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de glufosinato de amônia (MS2, Tabela 3.1) e após mais 20 dias transferidos para o meio de seleção 3, com  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de glufosinato de amônia (MS3, Tabela 3.1).

5. Fase de Regeneração. No decorrer da fase de seleção, os brotos regenerados e alongados que não sofreram o efeito do agente seletivo nas condições *in vitro*, foram considerados como possíveis transformantes e com altura maior ou igual a 3 cm, foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL com 10 mL de meio de enraizamento (ME, Tabela 3.1) contendo  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  de cefotaxima e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ , previamente filtrados. Os meios utilizados foram previamente esterilizados a  $120^\circ\text{C}$  e 1 atm de pressão e os explantes foram mantidos em temperatura de  $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 16/8 horas de luz e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , utilizando-se lâmpada fluorescente branca fria.

### 3.2.5 Desenvolvimento de Plantas

As plantas apresentando desenvolvimento de sistema radicular foram transferidas para copos plásticos de 200 mL, contendo uma mistura de solo e substrato inerte (1:1), previamente esterilizados, e mantidas em condições de câmara úmida por três dias, com redução gradativa da umidade até o sétimo dia. Nesta fase procedeu-se uma irrigação preventiva com solução de fungicida (Benomil a  $2 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Após o 15º dia, em condições de fotoperíodo e temperatura controladas, as plantas foram conduzidas para casa-de-vegetação e, após mais 7 dias, transferidas para vasos de 5 kg contendo solo preparado com NPK. Para controlar o florescimento precoce, o fotoperíodo foi ajustado para 16 horas de luz, permanecendo até o final do ciclo. Na casa-de-vegetação, as plantas foram irrigadas

por gotejamento e o controle preventivo de pragas e doenças foi realizado semanalmente.

### 3.2.6 Seleção de Cultivares de Soja para Regeneração Organogênica – Experimento 1

Para a seleção de genótipos, os eixos embrionários, após destacados das sementes, foram cultivados em placas de Petri de 90 x 15 mm contendo o meio de indução, previamente autoclavado, composto pelos sais do meio MS e vitaminas do meio B5, sacarose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e 6-benzilaminopurina (BAP) a  $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$  segundo Liu et al. (2004), modificado pela manutenção de um para seis dias, simulando o tempo mantido na presença de BAP, no processo de transformação. A seguir, foram transferidos para placas de Petri de 90 x 15 mm contendo o meio de crescimento composto por sais de MS (50%), vitaminas do meio B5 (50%), sacarose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ), suplementado com BAP a  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  e ácido indolbutírico a  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , pH ajustado para 5,8 e solidificado com gelrite ( $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ ). Após 15 dias, os eixos foram transferidos para frascos de vidro transparente com capacidade de 180 mL contendo 30 mL do mesmo meio e subcultivados a cada 15 dias. Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso, avaliando nove genótipos de soja, com quatro repetições e parcelas com cinco eixos embrionários. Aos 70 dias do início da cultura, foram avaliados o número médio de brotos por eixo embrionário e a frequência de multibrotação (%) de eixos embrionários com número de brotos maior ou igual a quatro.

Os meios de cultura utilizados foram previamente autoclavados por 20 minutos a  $120^{\circ}\text{C}$  e 1 atm de pressão e os experimentos foram conduzidos em temperatura de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , utilizando-se lâmpadas fluorescentes brancas frias.

### 3.2.7 Avaliação do Tempo de Indução e Tempo de Recuperação em Plantas Regeneradas de Eixos Embrionários sob Transformação via *Agrobacterium* - Experimento 2

O processo de transformação de eixo embrionário de sementes maduras de soja via *Agrobacterium* seguiu a metodologia de Liu et al. (2004),

modificado pela substituição do agente de seleção a antibiótico, para o agente de seleção a herbicida, segundo a metodologia de Dang e Wei (2007), porém, substituindo a concentração de 1,25 para 1,50 mg.L<sup>-1</sup> de glufosinato de amônia.

Neste experimento, os eixos, após o período de indução de regeneração durante um e dois dias, foram submetidos à agroinfecção por 20 horas (MA, Tabela 3.1), seguida de co-cultivo em ausência de luz, durante cinco dias (MC, Tabela 3.1), sendo após o co-cultivo transferidos para meio de recuperação (MR, Tabela 3.1), onde permaneceram durante 10, 15 e 20 dias, seguido das demais fases da transformação. Foi utilizado o delineamento de blocos casualizados, no esquema fatorial de 2 x 3, totalizando-se seis tratamentos, com três repetições, e parcelas representadas por 33 eixos. Aos 70 dias do início do experimento, foram avaliados número de plântulas desenvolvidas e expressão do gene GUS.

### 3.2.8 Análise Estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância. No experimento um, as médias para brotos regenerados e frequência de multibrotações foram comparadas pelo teste de Scott-Knott. No experimento dois, as médias para número de plântulas desenvolvidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para atender as exigências de normalidade e homogeneidade de variâncias, as médias para número de plântulas foram transformadas para raiz quadrada de  $(X+0,5)$ .

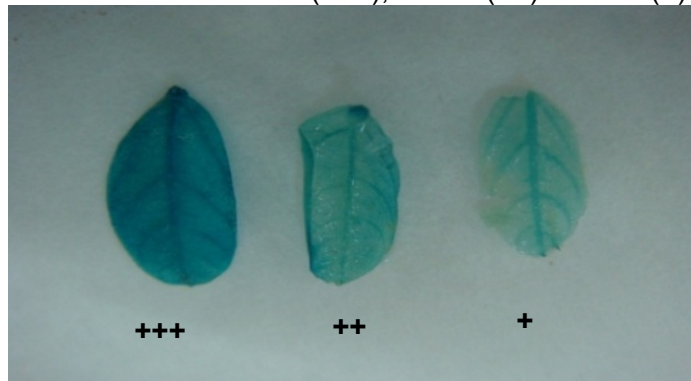
### 3.2.9 Análise Histoquímica da Expressão Estável de GUS

A eficiência de transformação das plantas regeneradas foi avaliada histoquimicamente pela expressão estável do gene GUS, como descrito por Jefferson et al. (1987), em tecidos de folhas de plantas na fase de aclimatização e/ou crescimento em casa-de-vegetação. Folhas pequenas e/ou segmentos de folhas de plantas adultas foram coletados e incubados em solução tampão contendo o substrato cromogênico X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronídeo) a 1 mM, 100 mM de fosfato de sódio pH 7,0; 10 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 0,5 mM de ferrocianeto de potássio e 0,1% (v/v) Triton X-100 e mantidos a 37° C, por 24 horas. A seguir, os tecidos foram transferidos para álcool 75% e 95%, por 24 horas ou até a remoção

total de clorofila. Na avaliação histoquímica, a presença de GUS nos tecidos transformados em contato com o substrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol glucuronídeo) resulta num precipitado insolúvel de cor azul, decorrente da hidrólise do X-Gluc (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

As plantas expressando o gene GUS e apresentando coloração azul foram separadas em três tonalidades de acordo com a intensidade de coloração (Figura 3.5), e a frequência da expressão foi calculada, dividindo o número de plantas expressando GUS pelo número de eixos infectados.

**Figura 3.5 –** Expressão estável do gene GUS, de acordo com a intensidade de coloração azul: alta (+++), média (++) e baixa (+).



### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Seleção de Cultivares de Soja para Regeneração Organogênica.

##### Experimento 1

Não houve diferença estatística entre as médias observadas para frequência de regeneração das cultivares analisadas, mas houve entre as médias de número de brotos ( $p < 0,001$ ) e frequência de multibrotações ( $p < 0,007$ ).

Todas as cultivares avaliadas apresentaram capacidade para frequência de regeneração organogênica, em meio suplementado com BAP. Maior número médio de brotos por eixo embrionário foi observado para as cultivares Valiosa RR e Conquista que diferiram estatisticamente das demais cultivares, quando mantidas por seis dias no meio de indução (Tabela 3.2). As cultivares

Potência e Tabana foram as menos responsivas, apresentando menor número médio de brotos.

Nedev et al. (2007), avaliando a resposta morfogenética em cultivares de soja, observaram para a cultivar indiana Hardee o máximo de oito brotos por nó cotiledonar, porém, com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de thidiazuron (TDZ), enquanto em trabalhos preliminares foram observados 6,09 brotos por eixo embrionário mantidos por sete dias no meio de indução de regeneração, com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de TDZ.

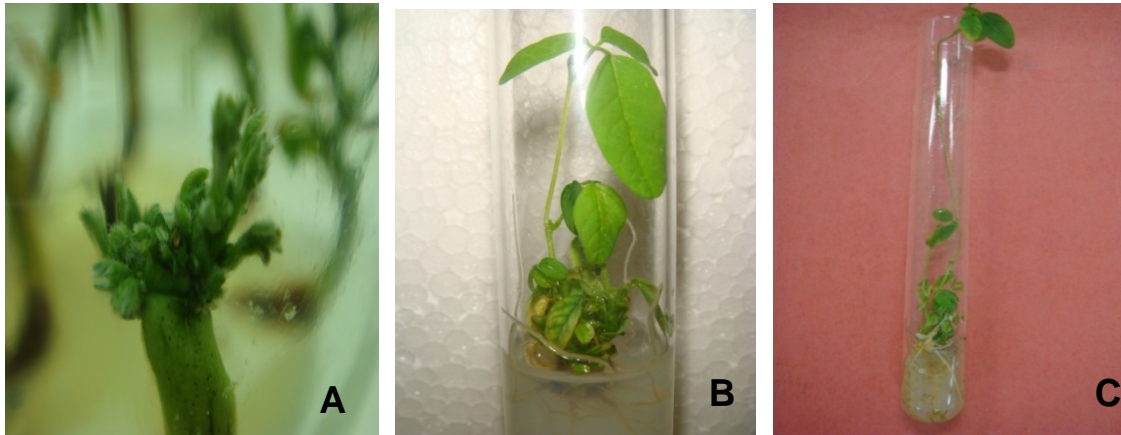
**Tabela 3.2 –** Frequência de regeneração organogênica (%), número médio de brotos e frequência de multibrotação (%) em plantas regeneradas a partir de eixos embrionários, induzidos em meio com  $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, aos 70 dias do início do cultivo.

Cultivar	Frequência de regeneração (%)	Número médio de brotos	Frequência de multibrotação (%)
Valiosa RR	87,50 a	4,13 a	60,0 a
Conquista	87,50 a	3,60 a	40,0 b
Tucunaré	87,50 a	3,23 b	37,5 b
BRS232	75,00 a	3,18 b	27,5 c
V.Max	75,00 a	3,00 b	37,5 b
Perdiz	87,50 a	2,90 b	25,0 c
Pintado	87,50 a	2,85 b	25,0 c
Potência	75,00 a	2,55 c	10,0 c
Tabarana	75,00 a	2,30 c	25,0 c
CV(%)	22,10	13,28	38,25

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Na resposta organogênica, o número de brotos regenerados e a frequência de multibrotações (Figura 3.6) apresentaram diferentes respostas, evidenciando a dependência genotípica quanto ao grau de resposta para número e frequência de multibrotações, corroborando com os resultados observados por outros autores (REICHERT; YOUN; WOODS, 2003; NEDEV et al., 2007). Teixeira et al. (2011), avaliando a resposta de diferentes cultivares para regeneração organogênica em explante de nó-cotiledonar, observaram respostas organogênicas para todas as cultivares avaliadas, porém, observando variação nas respostas entre as cultivares para os demais parâmetros avaliados. Chhabra et al. (2008), avaliando o efeito do BAP e TDZ na indução de brotos organogênicos, obtiveram 4,4 brotos em  $5,0 \mu\text{M}$  de BAP e 3,8 em  $0,5 \mu\text{M}$  de TDZ, para nó-cotiledonar de lentilha.

**Figura 3.6** – Regeneração organogênica. A. Eixos com desenvolvimento de brotações. B. Desenvolvimento de plântula. C. Plântula enraizada em fase de aclimatização.



Para frequência de multibrotações (eixos com número de brotos  $\geq 4$ )(Figura 3.6-A), a cultivar Valiosa RR diferiu estatisticamente das cultivares Conquista, Tucunaré e V.Max, enquanto as demais cultivares apresentam médias inferiores (Tabela 3.2).

A cultivar Valiosa RR, com tempo de indução de seis dias, destacou-se das demais cultivares com média em torno de 60%, enquanto as cultivares Conquista, Tucunaré e V.Max apresentaram médias de 40% a 37%. Liu et al. (2004) obtiveram, para cultivares chinesas e mesmo explante, frequência média de multibrotações, em torno de 45,6%.

### 3.3.2 Avaliação do Tempo de Indução e Tempo de Recuperação sobre a Regeneração de Plantas sob Transformação via *Agrobacterium* a partir de Eixos Embrionários. Experimento 2

Para número de plantas desenvolvidas, houve efeito significativo do tempo no meio de indução com  $p < 0,0001$  e o tempo de recuperação com  $p < 0,0001$ , enquanto a interação entre tempo de indução de regeneração e tempo de recuperação não foi significativa (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3** – Número de plântulas regeneradas sob transformação por *Agrobacterium*, cultivadas por um e dois dias no meio de indução e por 10, 15 e 20 dias no meio de recuperação, a partir de 70 dias de cultivo.

Meio de Recuperação(dias)	Meio de Indução (dias)		Média
	1	2	
10	0,22	1,97	1,09 c
15	3,29	8,24	5,77 b
20	8,26	12,79	10,52 a
CV(%)10,52	3,92 B	7,66 A	

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

As médias observadas para eixos mantidos por dois dias no meio de indução de brotação foram superiores e diferiram estatisticamente das observadas para um dia no meio de indução. Para tempo no meio de recuperação, a média observada em 20 dias diferiu estatisticamente das observadas em 15 e 10 dias (Tabela 3.3).

Os resultados mostraram que a manutenção dos eixos em MI por dois dias favoreceu a regeneração em comparação a um dia e que quanto maior foi o tempo de recuperação maior foi a taxa de regeneração, corroborando com os resultados observados por Olhoft et al. (2003). No processo de transformação via *Agrobacterium*, o explante sofre um duplo estresse resultante do processo de agroinfecção e da pressão de seleção do agente seletivo utilizado (antibiótico ou herbicida), sendo importante, nesta fase, ajustar o período de recuperação, na tentativa de aliviar o estresse induzido (ZHAO et al., 2001; OLHOFT et al., 2003).

Nas avaliações realizadas nas fases seguintes ao desenvolvimento de plântulas, observa-se na Tabela 3.4, que ocorreram perdas significativas, onde ao final das avaliações o número de plantas sobreviventes foi reduzido, mostrando que em 50% dos tratamentos não houve sobreviventes. Desse modo, a realização da análise estatística ficou prejudicada pela ausência de dados nos tratamentos.

**Tabela 3.4** – Eficiência e nível da expressão do gene GUS em plantas sobreviventes após transformação por *Agrobacterium*, com manutenção de um e dois dias no meio de indução e 10, 15 e 20 dias, em meio de recuperação, com início das avaliações aos 70 dias.

Meio de Indução (dias)	Meio de recuperação (dias)	Nº de plantas sobreviventes	Nº plantas expressando GUS*	Expressão de GUS**			Eficiência*** GUS (%)
				+++	++	+	
1	10	0	0				
1	15	0	0				
1	20	3	1	1			1,01
Total		3	1	1			
2	10	0					
2	15	3	2		1	1	2,02
2	20	6	4	1	2	1	4,04
Total		9	6	2	3	1	

\* Plantas com expressão estável do gene GUS, \*\* Expressão de GUS, de acordo com a intensidade de coloração azul: alta (+++), média (++) e baixa (+), \*\*\* Eficiência da expressão de GUS = número de plantas expressando GUS dividido pelo número de eixos infectados (99).

Pelo teste histoquímico de expressão gênica de GUS (Tabela 3.4) realizado nas plantas em fase de aclimatização, a maior eficiência para expressão de GUS em tecidos de folhas foi de 4,04% observada em plantas regeneradas de eixos mantidos por 2 dias no meio de indução e 20 dias no meio de recuperação.

O período de 20 dias no meio de recuperação estimulou o maior número de plântulas regeneradas, o mesmo não foi observado para os resultados da expressão estável do gene GUS, que foi baixo, quando comparado às respostas mais elevadas observadas por Zeng et al. (2004) com 5,9%, Liu, Wei e Huang (2008), com 8,3% e Liu, Yang e Wei (2004) com eficiência 7,8% de expressão do gene GUS.

Liu, Wei e Huang (2008), avaliando diferentes tempos de recuperação, observaram maior eficiência de expressão para o gene GUS com sete dias de recuperação e seleção com Hygromicina B. Olhoft et al. (2003), estudando tempos de infecção e co-cultivo, observaram que, em períodos mais prolongados, o crescimento das plântulas ficava prejudicado.

Segundo Hoa, Hai e Thang (2008), o uso de 10 mg.L<sup>-1</sup> na seleção com glufosinato foi ótimo para seleção na maioria das cultivares avaliadas, enquanto 5 mg.L<sup>-1</sup> foi ótimo para a cultivar Maverick, e concentrações mais baixas em torno de

3 a 4 mg.L<sup>-1</sup> foram eficientes para Williams 82, MTD 176 e HL 202, quando no meio de alongação de brotos. Zhang et al. (2004) reportou que a seleção com glufosinato a 10 mg.L<sup>-1</sup> suprimiu a regeneração de plantas na cultivar A3237.

As plantas com resistência a herbicida geralmente apresentam maior expressão para o gene GUS. No entanto, Hoa (2008) reportou algumas discrepâncias com relação à resistência a herbicida e reação da expressão do gene GUS nos materiais avaliados.

Pelos resultados observados neste trabalho, nos tempos de indução de regeneração de um dia e recuperação de 20 dias e de indução de regeneração de 2 dias com tempo de recuperação de 20 dias a eficiência da expressão do gene GUS variou de 1,01 e 4,04%.

### 3.4 CONCLUSÕES

Experimento 1. As cultivares apresentam potencial para regeneração organogênica. O maior potencial para número de brotos é observado nas cultivares Valiosa RR e Conquista e, para frequência de multibrotação na cultivar Valiosa RR.

Experimento 2. O cultivo de eixos embrionários da cultivar Conquista por dois dias no meio de indução e por 20 dias no meio de recuperação estimulam maior regeneração de plântulas e maior expressão do gene GUS,.

### 3.5 REFERÊNCIAS

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cell utilizing a herbicidal molecule results in recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.101, n.1-2, p.1-6, 2000.

BARWALE, U. B.; KEANS, H. R.; WIDHOLM, J. M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. **Planta**, Bonn, v.167, n.4, p.473-481, 1986.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. 309p.

- BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1999. p.679-735.
- BIRCH, R.G. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.297-326, 1997.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1998. v.1, p.87-132.
- CHHABRA, G.; DARSHNA, C.; MADAN, V.; MANISH, S.; PAWAN, K. J. TDZ-induced direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis on cotyledonary node explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.). **Physiology Molecular Biology Plants**, v.14, n.4, p.347-353, 2008.
- DAN, Y.; REIGHCERI, N. A. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants. **In vitro Cell Biology Plant**, Brisbane, v.34, n.1, p.14-21, 1998.
- DANG, W.; WEI, Z. M. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. **Plant Science**, Davis, v.173, n.4, p.381-389, 2007.
- DONALDSON, P. A.; SIMMONDS, D. H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.19, n.5, p.478-484, 2000.
- DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. **Euphytica**, Wageningen, v.127, n.3, p.367-376, 2002.
- ENRIQUEZ-OBREGON, G. A.; VAZQUEZ-PADRON, R. I.; PRIETO-SAMSONOV, D. L.; PAREZ, M.; SELMAN-HOUSEIN, G. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. **Biociencia Aplicada**, Havana, v.14, n.3, p.169-174, 1997.
- GAMBORG, O. L.; MILLER R. A.; OJIMA K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, Stockholm, v.50, n.1, p.151-158, 1968.
- GESTEIRA, A. S. **Avaliação do potencial embriogênico de cultivares de soja e transformação com o gene da citrato sintase**. 2002. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Departamento de Genética, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- HOA, T. T. C.; HAI, T. V.; THANG, L. C. transformation efficiencies of the soybean variety PC 19 [*Glycine max* (L.) Merrill] using *Agrobacterium tumefaciens* and the cotyledonary node method. **Omonrice**, v.16, p.1-8, 2008.

- HOLSTERS, M.; DE WAELE, D.; DEPICKER, A.; MESSENS, E.; VAN MONTAGUE, M.; SCHELL, J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular and General Genetics**, v.163, p.181-187, 1978.
- JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusion:  $\beta$ glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v.6, p.3901-3907, 1987.
- JOY, I. V.; THORPE, T. A. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. In: SOH, W. Y.; BROJWANI, S. S. (Ed.). **Morphogenesis in plant tissue cultures**. London: Kluwer Academic Publishers, 1999. p.171-214.
- KIM, J. H.; LAMOTTE, C. E.; HACK, E. Plant regeneration *in vitro* from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings. **Journal Plant Physiology**, v.136, p.664-669, 1990.
- KIM, Y. J.; PARK, T. L.; KIM, H. S.; PARK, H. K.; CHON, S. U.; YUN, S. J. Factors affecting organogenesis from mature cotyledon explants and regeneration in soybean. **Journal of Plant Biotechnology**, v.6, n.1, p.39-43, 2004.
- KOMATSUDA, T.; OHYAMA, K. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.75, n.5, p.695-700, 1987.
- LAKSHMANAN, P. et al. Invited review: Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunitis. **In Vitro Cell Developmental Biology Plant**, v.41, p.345-63, 2005.
- LIU, H. K.; YANG, C.; WEI, Z. M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. **Planta**, Bonn, v.219, n.6, p.1042-1049, 2004.
- LIU, S. J.; WEI, Z. M.; HUANG, J. Q. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.27, n.3, p.489-498, 2008.
- MA, X. H.; WU, T. L. Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Posnan, v.30, n.2, p.209-216, 2008.
- McCABE, D. E.; SWAIN, W. F.; MARTINELL, B. J.; CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Nature Biotechnology**, v.6, n.8, p.923-926, 1988.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Lund, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NEDEV, T.; TODOROVA, R.; KOSTURKOVA, G.; AKITHA DEVI, M. K.; SAKTHIVELU, G.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISHANKAR, G. A. Variation in *in vitro* Morphogenic Response to Growth Regulators in Soybean Genotypes from India and Bulgaria. **International Electronic Journal of Bioautomation**, Sofia, v.8, Supplement 1, p.193-200, 2007.

OLHOFT, P. M.; FLAGEL, L. E.; DONOVAN, C. M. SOMERS, D. A. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. **Planta**, Bonn, v.216, n.5, p.723-735, 2003.

OLHOFT, P. M.; LIN, K.; GALBRAITH, J.; NIELSEN, N. C., SOMERS, D. A. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium* mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.20, n.8, p.731-737, 2001.

OPABODE, J. T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Sabah, v.1, n.1, p.12-20, 2006.

PARROT, W. A.; CLEMENTE, T. E. Transgenic soybean. In: BOERMA, H. R.; SPECHT, J. E. (Ed.). **Soybeans: improvement, production, and uses**. 3rd ed. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 2004. p. 635-667.

PAZ, M. M.; MARTINEZ, J. C.; KALVIG, A. B.; FONGER, T. M.; WANG, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.25, n.3, p. 206-213, 2006.

PERANI, L.; RADKE, S.; WILKE-DOUGLAS, M.; BOSSERT, M. Gene Transfer Methods of Crop Improvement: introduction of foreign DNA into plants. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.68, n.3, p.566-70, 1986.

REICHERT, N. A.; YOUN, M.; WOODS, A. L. Adventitious organogenic regeneration from soybean genotypes representing nine maturity groups. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v.75, n.3, p.273-277, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

SANTARÉM, E. R.; FERREIRA, A. G. Transformação de soja via bombardeamento de partículas. **ABCTP Notícias**, Lavras, 29:2-9, 1997.

SHAN, Z.; RAEMAKERS, K.; TZITZIKAS, E. N.; MA, Z.; VISSER, R. G. F. Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean (*Glycine max* L. Merrill). **Plant Cell Reports**, Marseille, v.24, n.9, p.507-512, 2005.

SHETTY, K.; ASANO, Y.; OOSAWA, K. Stimulation of *in vitro* shoot organogenesis in *Glycine max* (Merrill.) by allantoin and amides. **Plant Science**, Davis, v.81, n.2, p.245-251, 1992.

SUGIYAMA, M. Organogenesis in vitro. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, n.1, p.61-64, 1999.

TEIXEIRA, L. R., BRACCINIL, A. de L.; CHURATA, B. G. M.; VIEIRA, E. S. N.; MARTINS, P. K.; SCHUSTER, I. Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.33, n.1, p.67-74, 2011.

WANG, G., XU, Y. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference. **Plant Cell Reports**, v.27, p.1177-1184, 2008.

ZENG, P. P.; VADNAIS, D. A.; ZHANG, Z.; POLACCO, J. C. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.22, n.7, p.478-482, 2004.

ZHAO, H. K.; WANG, Y. M.; LI, Q. Y.; ZHANG, M.; ZHUANG, B.C. SSR analysis of wild soybean (*G. soja*) and cultivated soybean from different latitude in China. **Soybean Science**, v.20, n.3, p.172-176, 2001.

#### 4 ARTIGO B. REGENERAÇÃO ORGANOGÊNICA DE SOJA SOB TRANSFORMAÇÃO VIA *AGROBACTERIUM* MEDIADA POR SONICAÇÃO

##### Resumo

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das culturas mundialmente mais importantes pelas altas concentrações de óleo e proteína presentes nos grãos, e graças ao avanço das novas tecnologias o melhoramento de soja por meio da transformação viabilizou a introdução de características, até então, impossíveis por outros métodos. No entanto, a inexistência de protocolos altamente reproduzíveis e com altas taxas de transformação tem dificultado a manipulação rotineira desta tecnologia. Este trabalho teve por objetivos avaliar os tempos no meio de indução de regeneração com tempos de sonicação e concentrações de acetosiringona com tempos de sonicação na regeneração organogênica e expressão do gene GUS em plantas regeneradas sob transformação via *Agrobacterium*, a partir de eixos embrionários de sementes maduras de soja da cultivar Conquista. Foram delineados dois experimentos. No primeiro experimento foram avaliados três tempos de manutenção no meio de indução de regeneração e cinco tempos de sonicação, na regeneração organogênica sob transformação via *Agrobacterium* na OD<sub>600</sub> 0,5. Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados, com parcelas subdivididas, no esquema fatorial 3 x 5 com três tempos no meio de indução de um, dois e três dias e cinco tempos de sonicação de 0,0; 2,5; 7,5 e 15,0 e 30,0 segundos, em parcelas subdivididas, dando 15 tratamentos, quatro repetições e parcelas de 12 eixos. No segundo experimento foram avaliados as concentrações de 100 e 200 µM de acetosiringona com cinco tempos de sonicação, na regeneração organogênica sob transformação via *Agrobacterium* na OD<sub>600</sub> 0,2. Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados, no esquema fatorial 2 x 5, com 100 e 200 µM de acetosiringona e tempos de sonicação de 0,0; 2,5; 7,5 e 15,0 e 30,0 segundos, quatro repetições e parcelas com 12 eixos. Nos dois experimentos foram avaliados o número de plântulas desenvolvidas e expressão do gene GUS. Experimento 1. O maior número de plântulas alongadas e maior expressão do gene GUS ocorrem em eixos embrionários da cultivar Conquista mantidos por dois e três dias no meio de indução e com 2,5 e 15,0 segundos de sonicação na suspensão de *Agrobacterium* OD<sub>600</sub> 0,5. No experimento 2, o maior número de plântulas alongadas e maior expressão do gene GUS ocorrem em 100 µM de acetosiringona, com 7,5 e 30,0 segundos de sonicação de eixos embrionários, da cultivar Conquista, na suspensão de *Agrobacterium* OD<sub>600</sub> 0,2.

**Palavras-chave:** *Glycine max*. Glufosinato de amônia. Acetosiringona. Organogênese. Regeneração *in vitro*.

##### Abstract

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is one of the world's most important crop due to its high concentrations of oil and protein present in grains, and also, due to the

advancement of new technologies to improve the soybean transformation, made possible through the introduction of features, what was not possible by other methods. However, the lack of protocols and highly reproducible with high rates of transformation has hampered the routine handling of this technology. This study aimed to evaluate the times in the regeneration induction medium with sonication time, and concentration acetosiringona times with sonication in organogenic regeneration of soybean via *Agrobacterium* transformation assisted by sonication, from embryonic axes of mature seeds of the Conquista cultivar. Two experiments were conducted. In the first one were evaluated three different times in the maintenance of regeneration induction medium, and sonicated five times in organogenic regeneration in *Agrobacterium* transformation at OD<sub>600</sub> 0.5. We used a randomized block design in a factorial 3 x 5, three times in the induction medium one, two and three days, and five times of sonication of 0.0, 2.5, 7.5 and 15.0 and 30.0 seconds, split plots, giving 15 treatments, four replications and 12 axes. In the second experiment, the concentrations of 100 and 200 µM acetosiringone with five different times of sonication, in organogenic regeneration in *Agrobacterium* transformation at OD<sub>600</sub> 0.2. We used a randomized block design, arranged in a 2 x 5, 100 and 200 µM acetosiringone and sonication times of 0.0, 2.5, 7.5 and 15.0 and 30.0 seconds, four replicates and 12 axes. In both experiments, we assessed the number of shoots developed, and GUS gene expression. In the first experiment, the greatest elongation of seedlings and increased expression of the GUS gene occur in embryonic axes of Conquista cultivar maintained by two and three days in induction medium and with 2.5 and 15.0 seconds of sonication in *Agrobacterium* suspension of 0.5 OD<sub>600</sub>. In the second experiment, the greatest elongation of seedlings and increased expression of the GUS gene occur in 100 µM acetosiringone with 7.5 and 30.0 seconds of sonication in embrionic axes of Conquista cultivar in *Agrobacterium* suspension of 0.2 OD<sub>600</sub>.

**Keywords:** *Glycine max*. Glufosinate of ammonium. Acetosiringone. Organogenesis. *In vitro* regeneration.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das culturas mais importantes mundialmente pelas altas concentrações de óleo e proteína presentes nos grãos, e o Brasil em 2009/2010 ocupou a segunda posição como maior produtor com produção de 68,8 milhões de toneladas e área cultivada de 23,5 milhões de hectares (CONAB, 2010).

Dada a sua importância econômica e industrial, existe um grande interesse que vem impulsionando o melhoramento da soja. Com o avanço de novas tecnologias como o DNA Recombinante e a Engenharia Genética, tornou-se possível introduzir novas características, até então, impossíveis pelos métodos

convencionais (BRASILEIRO; DUSI, 1999), surgindo então o melhoramento auxiliado pela transformação genética.

Dentre os principais métodos de transformação em soja destacam-se o bombardeamento de partículas ou biobalística em tecidos embriogênicos (ARAGÃO et al., 2000; DROSTE et al., 2002), o qual apresenta um padrão de inserção complexo do transgene no genoma da planta e o mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, em tecidos de nó-cotiledonar (OLHOFT et al., 2001; OLHOFT et al., 2003; ZENG et al., 2004), em eixo embrionário (LIU; YANG; WEI, 2004; DANG; WEI, 2007; LIU; WEI; HUANG, 2008), hipocótilo (WANG; XU, 2008), e outros, com integração definida do transgene para regiões transcricionalmente ativas dos cromossomas e com inserção de um ou baixo número de cópias (BIRCH, 1997).

A inexistência de protocolos altamente reproduzíveis e com altas taxas de transformação em soja, provavelmente, é decorrente tanto da baixa receptividade dos tecidos à transformação por *Agrobacterium* como da recalcitrância dos tecidos à regeneração e crescimento de plântulas *in vitro* (CHEN, 2004), como presentes em alguns tecidos de dicotiledôneas e monocotiledôneas (ISHIDA et al., 1996; DANILOVA, 2007). No entanto, manipulações da bactéria, do tecido alvo e dos meios utilizados são passíveis de serem realizadas visando incrementar a eficiência de transformação.

O uso de compostos fenólicos, como a acetosiringona, consiste num dos vários métodos disponíveis e já utilizados para melhorar a eficiência de transformação. Estes compostos normalmente são excretados pelas plantas feridas e metabolicamente ativas, e são responsáveis pela atração das bactérias e pela indução dos genes de virulência do plasmídeo Ti a ativar a transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para dentro do tecido da planta (STACHEL et al., 1985; TZFIRA; CITOVSKY, 2006).

O emprego de ultra-som ou sonicação como indutor de ferimento no tecido do explante a ser transformado, tanto com o DNA isolado ou assistindo a transformação mediada por *Agrobacterium*, técnica denominada SAAT, também poderão ser explorados. A técnica de SAAT tem sido reportada como um método de fácil execução, de baixo custo e que principalmente, aumenta a eficiência da transformação (TRICK; FINER, 1997; TRICK; FINER, 1998; SANTARÉM et al., 1998; VASCONCELOS et al., 2008). O método da sonicação consiste em induzir por

meio de ultra-som a formação de cavitações, resultando na formação de milhares de microferimentos na camada epidérmica ou subepidérmica do tecido do explante. O padrão de ferimento causado pela sonicação facilita a penetração da *Agrobacterium* em células potencialmente regenerativas, localizadas em camadas mais profundas nos tecidos. Maior expressão transiente do gene GUS foi observada por SANTARÉM et al., 1998), em tecidos de cotilédones imaturos de soja.

Apesar desse método ter sido pouco explorado, trabalhos realizados recentemente com sonicação em outras culturas, tem elevado a frequência da expressão transiente e a obtenção de plantas transgênicas férteis. Em feijão, a transformação mediada por *Agrobacterium* assistida por sonicação e infiltração a vácuo, viabilizou a obtenção de plantas transgênicas férteis (LIU et al., 2005). Embriões imaturos de milho quando submetidos a sonicação assistindo a transformação (SAAT), após um tratamento térmico de cinco minutos, alcançaram até 87,5% de expressão para o gene GUS (VASCONCELOS et al., 2008).

Em soja, o primeiro relato de transformação via *Agrobacterium* utilizando-se o gene *bar* como marcador de seleção em explantes de nó-cotiledonar, com ferimento, foi realizado com sucesso por Zhang et al. (1999), seguido por Chen (2004) e Paz et al. (2004), enquanto, o emprego do gene *ahas* em explantes de eixo embrionário, via biobalística, permitiu obter frequência de transformação de 20,1% (ARAGÃO et al., 2000). Apesar de inúmeros trabalhos de transformação realizados em nó-cotiledonar de soja, a maior eficiência de transformação observada via *Agrobacterium* e seleção com o gene *bar* foi para eixo embrionário, porém, sem ferimentos (DANG; WEI, 2007).

Este trabalho teve por objetivos avaliar a interação de tempos no meio de indução de regeneração com tempos de sonicação e de concentrações de acetosiringona com tempos de sonicação na regeneração organogênica e na expressão do gene GUS em plantas regeneradas sob transformação com *Agrobacterium*, a partir de eixos embrionários de sementes maduras de soja da cultivar Conquista.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Material Vegetal e Assepsia

Foram realizados dois experimentos, sendo que no primeiro foi avaliado o efeito do tempo no meio de indução de regeneração com o tempo de sonicação e, no segundo, foram avaliados duas concentrações de acetosiringona com tempo de sonicação.

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biotecnologia da Tropical Melhoramento e Genética - TMG, Cambé, PR, sendo utilizadas sementes maduras de soja procedentes da Fundação MT safras 2009/2010.

As sementes foram selecionadas por tamanho (acima da peneira 5,5) e lavadas com água corrente e detergente. Em câmara asséptica, foram imersas em álcool 70% por 50 segundos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO) a 0,5% + Tween 20 (quatro gotas por 100 mL) durante 15 minutos e enxaguadas por cinco vezes com água destilada e autoclavada.

Após a imersão por uma noite em água estéril, as sementes foram conduzidas para a câmara asséptica e, sob lupa estereoscópica e com o auxílio de pinças e bisturis, os cotilédones foram separados, destacando-se os eixos embrionários e destes os primórdios foliares. Nos experimentos foram utilizados somente os eixos apresentando coloração amarelo claro de aspecto translúcido e comprimento maior ou igual a 3,5 mm.

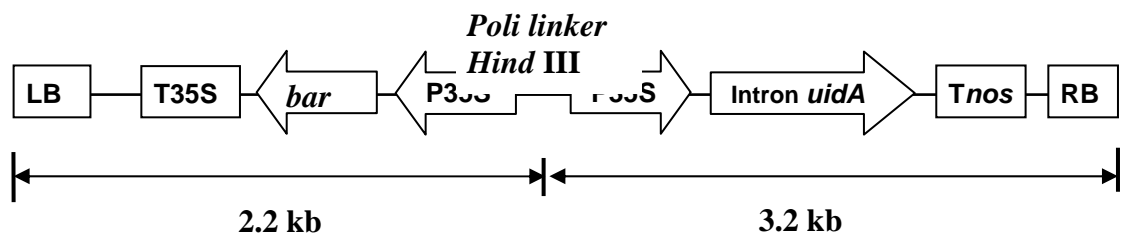
### 4.2.2 Pré-Cultivo

Os eixos embrionários da cultivar Conquista, após a assepsia, foram cultivados em placas de Petri de 90 x 15 mm contendo 25 mL do meio de indução de regeneração (MI) composto pelos sais do meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962); e vitaminas do meio B5 (GAMBORG et al., 1968), sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>), BAP (3,5 mg.L<sup>-1</sup>), pH 5,8 e gelrite 2,2 g.L<sup>-1</sup>, e mantidos durante um, dois e três dias no experimento 1 e durante 1 dia no experimento 2.

#### 4.2.3 Cultivo de *Agrobacterium* e Preparo da Suspensão de Agroinfecção

Foram utilizados a *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 e o vetor pCAMBIA3301 (CAMBIA, Australia) contendo o gene *bar* que codifica para a enzima PPT e confere resistência ao herbicida glufosinato de amônia e o  $\beta$ -glucuronidase (GUS) cujo gene *uidA* codifica para a enzima fosfotricina acetil transferase (PAT), como marcador de seleção visual, sob o controle do promotor 35SCaMV, conforme Figura 4.1.

**Figura 4.1** – Representação esquemática do T-DNA do pCAMBIA3301, contendo os genes *uidA* e *bar*. LB/RB – sequências direita e esquerda das bordas do T-DNA; P35S/T35S – promotor e terminador do CaMV 35S; *bar* – região codante do gene de tolerância a herbicida; Tnos – terminador da síntese de proteína; *uidA* – região codante do gene de GUS.



Das culturas mantidas a 4°C, uma colônia foi retirada e ressuspensa em 3 mL de meio LB (Tabela 4.1), contendo os antibióticos Rifampicina (30 mg.L<sup>-1</sup>) e Kanamicina (50 mg.L<sup>-1</sup>). Após 24 horas, as mesmas foram transferidas para o volume final de 50 mL do mesmo meio contendo os antibióticos apropriados por 24 a 48 horas ou até atingir a fase log. Atingida esta fase a suspensão foi centrifugada a temperatura de 10°C, com 3.500 rpm durante 10 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensa em meio de agroinfecção (MA, Tabela 4.1), segundo Liu et al. (2004). A suspensão foi quantificada em espectrofotômetro, ajustando a OD<sub>600</sub> para 0,5 e adicionando acetosiringona a 200 µM (Experimento 1), e ajustando a OD<sub>600</sub> para 0,2 adicionando acetosiringona a 100 e 200 µM (Experimento 2).

**Tabela 4.1 –** Meios utilizados para cultura de *Agrobacterium*, cultura de tecidos e transformação.

Meios*	Composição
Meio de <i>Agrobacterium</i> (LB <sup>a</sup> )	Triptona (10 g.L <sup>-1</sup> ), extrato de levedura (5 g.L <sup>-1</sup> ) e cloreto de sódio 10 (10 g.L <sup>-1</sup> ), pH 7,5, agar, (7,0 g.L <sup>-1</sup> ).
Meio de agroinfecção (MA)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (6,0 mg.L <sup>-1</sup> ), pH 5,4, acetosiringona** 200 µM.
Meio de co-cultivo (MC)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (6,0 mg.L <sup>-1</sup> ), pH 5,4, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), acetosiringona 200 µM.
Meio de recuperação (MR)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), IBA (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), pH 5,8, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), cefotaxima*** (300 mg.L <sup>-1</sup> )
Meio de seleção 1 (MS1)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), IBA (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), PPT (0,5 mg.L <sup>-1</sup> )(Finale), pH 5,8, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), cefotaxima (300 mg.L <sup>-1</sup> )
Meio de seleção 2 (MS2)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), IBA (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), PPT (1,0 mg.L <sup>-1</sup> )(Finale), pH 5,8, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), cefotaxima (300 mg.L <sup>-1</sup> )
Meio de seleção 3 (MS3)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), BAP (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), IBA (0,2 mg.L <sup>-1</sup> ), PPT (1,5 mg.L <sup>-1</sup> )(Finale), pH 5,8, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), cefotaxima (300 mg.L <sup>-1</sup> )
Meio de enraizamento (ME)	Sais do meio MS e vitaminas do meio B5 (50%), sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> ), IBA (1,0 mg.L <sup>-1</sup> ), GA <sub>3</sub> ****(0,5 mg.L <sup>-1</sup> ), pH 5,8, gelrite (2,2 g.L <sup>-1</sup> ), cefotaxima (150 mg.L <sup>-1</sup> )

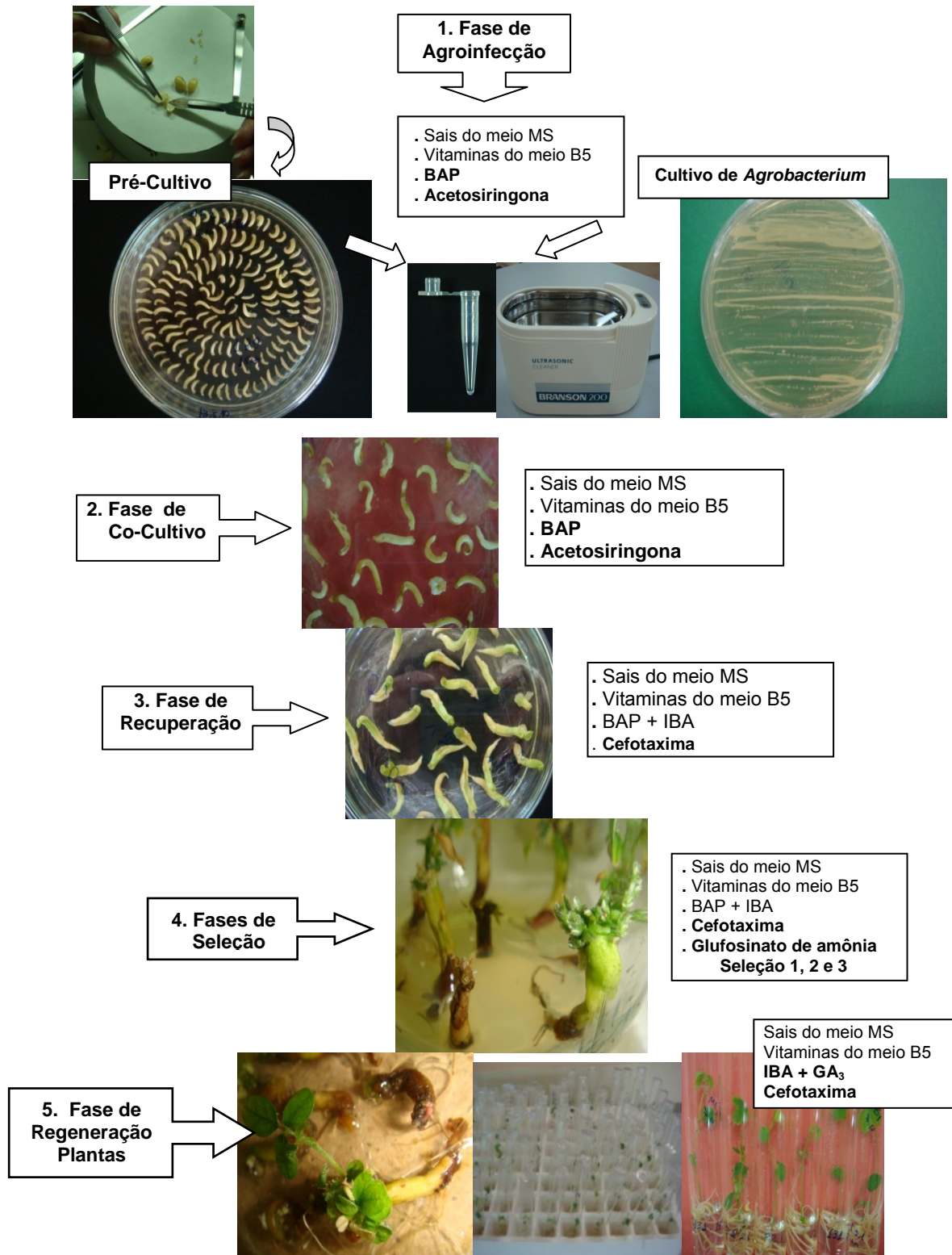
<sup>a</sup>Sambrock (1970), \*Os meios foram autoclavados durante 20 minutos a 120° C e 1 atmosfera de pressão. \*\* Acetosiringona, \*\*\*cefotaxima e \*\*\*\*GA<sub>3</sub> filtrados em membrana de millipore de 0,22 micra de espessura.

#### 4.2.4 Etapas da Transformação

Após o pré cultivo os eixos embrionários foram utilizados para a transformação envolvendo as seguintes fases: agroinfecção, co-cultivo, recuperação, seleção e regeneração (Figura 4.2.)

1. Fase de Agroinfecção e Sonicação. Os eixos embrionários, após o pré-cultivo foram submetidos à agroinfecção, transferindo-se 15 eixos por microtubo de 2 mL contendo 1,5 mL da suspensão de *Agrobacterium* e foram, um a um, submetidos a tempos de sonicação (segundos) no aparelho Bransonic Ultrasonic Cleaner - Modelo B1210E-Mt, potência de 40 kHz e mantidos na suspensão bacteriana de acordo com o experimento.
2. Fase de Co-cultivo. A seguir os eixos referentes aos dois experimentos foram transferidos da suspensão bacteriana para papel de filtro esterilizado para absorver o excesso da suspensão de *Agrobacterium*. Após a absorção, os eixos foram transferidos para placas de Petri de 90 x 15 mm contendo 25 mL do meio de co-cultivo (MC, Tabela 4.1) e mantidos em temperatura de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ausência de luz, durante o período de cinco dias.
3. Fase de Recuperação. Os eixos, após a fase de co-cultivo, foram enxaguados por uma vez com o meio de co-cultivo líquido, secos em papel de filtro autoclavado e 12 eixos foram transferidos por frascos de 180 mL contendo 25 mL do meio de recuperação (MR, Tabela 4.1). Os frascos permaneceram em temperatura e fotoperíodo controlados durante 20 dias.

**Figura 4.2** – Fases da transformação: 1. Agroinfecção, 2. Co-cultivo, 3. Recuperação, 4. Seleção e 5. Regeneração de Plantas.



4. Fase de Seleção. Nessa fase foram utilizadas duas doses crescentes de glufosinato de amônia (Finale) de 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, segundo metodologia utilizada por Dang e Wei (2007) e acrescida da dose de 1,5 mg.L<sup>-1</sup>, para prevenir o desenvolvimento de possíveis escapes. Após a recuperação, os eixos sem contaminação aparente por *Agrobacterium* foram transferidos para frascos de 180 mL contendo 25 mL do meio de seleção 1 com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de glufosinato de amônia (MS1, Tabela 4.1). Após 20 dias, os eixos com desenvolvimento de brotações foram transferidos para o meio de seleção 2 com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de glufosinato de amônia (MS2, Tabela 4.1) e após mais 20 dias foram transferidos para o meio de seleção 3 (MS3, Tabela 4.1), contendo a dose de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de glufosinato de amônia.

5. Fase de Regeneração. Durante a fase de seleção, os brotos regenerados e alongados que não sofreram o efeito do agente seletivo nas condições *in vitro*, foram considerados como possíveis transformantes e atingindo uma altura maior ou igual a 3 cm, foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL com 10 mL de meio de enraizamento contendo IBA 1,0 mg.L<sup>-1</sup> (ME, Tabela 4.1)

Os meios utilizados nas fases de pré-cultivo, cultivo de *Agrobacterium* e de transformação foram autoclavados durante 20 minutos a 120°C e 1 atm de pressão. Em todas as fases (exceto o co-cultivo) as culturas foram mantidas em temperatura de 25° ± 2°C, com fotoperíodo de 16/8 horas de luz e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, utilizando-se lâmpadas fluorescentes brancas frias.

As plantas regeneradas e com desenvolvimento de sistema radicular foram transferidas para copos plásticos de 200 mL, contendo uma mistura de solo e substrato inerte (1:1) previamente esterilizados, e mantidas em condições de câmara úmida por três dias, com redução gradativa da umidade até o sétimo dia. Nesta etapa procedeu-se uma irrigação com solução nutritiva (Meio MSB a 25%) e uma irrigação preventiva com solução de fungicida (Benomil a 2 g.L<sup>-1</sup>) seguida da coleta de folhas jovens para analisar a expressão estável de GUS, nas plantas regeneradas. Após 15 dias, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação com fotoperíodo ajustado para 16 horas de luz, e após sete dias para vasos de 5 kg contendo solo preparado com NPK e com irrigação por gotejamento até o final do ciclo reprodutivo, sendo o controle preventivo de pragas e doenças realizado semanalmente.

#### 4.2.5 Efeito do Tempo de indução de regeneração e tempo de sonicação na regeneração de plantas sob transformação via *Agrobacterium* - Experimento 1

Foram avaliados o efeito da manutenção dos eixos no meio de indução de regeneração durante um, dois e três dias e do tempo de sonicação durante 0,0; 2,5; 7,5; 15,0 e 30,0 segundos, em microtubos, contendo a suspensão de *Agrobacterium* OD<sub>600</sub> de 0,5, seguido de incubação na suspensão bacteriana por 30 minutos em repouso.

O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso, no esquema fatorial de 3 x 5, com quatro repetições e unidade experimental de 12 eixos. Aos 70 dias do início do cultivo foram avaliados o número plântulas desenvolvidas por eixo embrionário.

#### 4.2.6 Efeito de Doses de Acetosiringona e Tempo de Sonicação em Plantas Regeneradas de Eixos Embrionários sob Transformação via *Agrobacterium* - Experimento 2

Os eixos, após um dia em meio de indução de regeneração foram submetidos a sonicação por 0,0; 2,5; 7,5; 15,0 e 30,0 segundos, em microtubos de dois mL contendo a suspensão de *Agrobacterium* OD<sub>600</sub> de 0,2, suplementada com 100 e 200 µM de acetosiringona. A seguir os eixos permaneceram na suspensão bacteriana por 10 minutos em repouso.

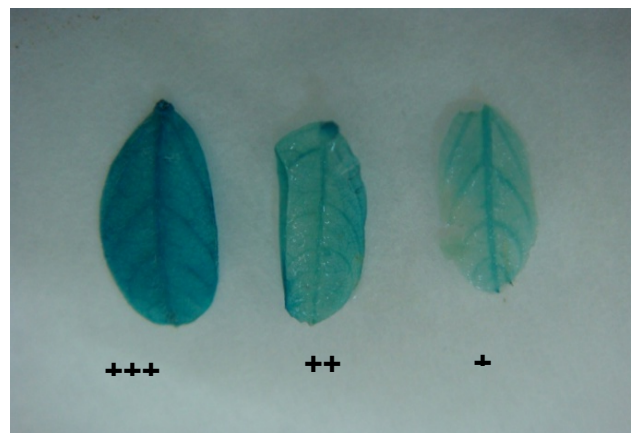
Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, no esquema fatorial, com quatro repetições e unidade experimental de 12 eixos. Aos 70 dias do início do cultivo foram avaliados o número de plântulas desenvolvidas.

#### 4.2.7 Análise Histoquímica da Expressão Estável de GUS

Tecidos de folhas de plantas transformadas, na fase de aclimatização e/ou crescimento na casa-de-vegetação, foram submetidos aos ensaios de GUS, avaliando-se a eficiência da expressão estável do gene GUS, conferida pelo gene *uidA*, como descrito por Jefferson, Kavanagh e Bevan (1987). Folhas pequenas e/ou segmentos de folhas de plantas adultas foram incubadas em solução tampão contendo 1 mM X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronídeo),

100 mM de fosfato de sódio pH 7,0; 10 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 0,5 mM de ferrocianeto de potássio e 0,1% (v/v) Triton X-100, e mantidas a 37°C por 24 horas. Em seguida foram transferidas para álcool 75% e 95%, por 24 horas ou até a remoção total de clorofila dos tecidos. Após a incubação dos tecidos de folhas das plantas possivelmente transformadas, a reação da enzima  $\beta$ -glucuronidase presente nas células transformadas em contato com a solução de X-Gluc, resultou num precipitado de coloração azul insolúvel, a qual foi considerada resposta positiva. A eficiência de plantas com expressão estável para o gene GUS foi calculada dividindo-se o número de plantas GUS positiva pelo número de eixos infectados (48 por tratamento). As plantas expressando o gene GUS foram classificadas de acordo com o nível de expressão visualizados pelas diferentes intensidades de coloração, conforme observada na Figura 4.3.

**Figura 4.3** – Expressão estável do gene GUS, de acordo com a intensidade de coloração azul: alta (+++), média (++) e baixa (+).



#### 4.2.8 Análise Estatística

Os dados referentes aos dois experimentos foram submetidos à análise de variância. As médias para plântulas regeneradas e eficiência de expressão do gene GUS foram transformadas para raiz quadrada de  $(X + 0,5)$  para satisfazer as exigências de normalidade e homogeneidade de variâncias, e foram comparadas pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Efeito do Tempo de Indução de Regeneração e do Tempo de Sonicação na Regeneração de Plantas sob Transformação via *Agrobacterium* - Experimento 1

As médias para número de plântulas regeneradas (Tabela 4.2) mostraram efeito significativo para tempo de manutenção no meio de indução de regeneração com  $p = 0,0000$ , para tempo de sonicação com  $p = 0,0002$  e para a interação tempo no meio de indução e tempo de sonicação, com  $p = 0,0000$ .

Entre as médias observadas no tempo de indução de regeneração por um dia, apenas a média observada no controle (sem sonicação) diferiu estatisticamente dos demais tempos de sonicação (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2** – Número de plântulas alongadas sob transformação por *Agrobacterium* com cinco tempos de sonicação (segundos) e três tempos no meio de indução (dias), a partir de 70 dias de cultivo.

Sonicação (segundos)	Meio de Indução de regeneração (dias)			Médias
	1	2	3	
0,0	5,68 a*A	2,00 bA	4,13 bA	3,94
2,5	0,55 bB	13,42 aA	11,42 aA	8,47
7,5	1,05 bB	8,32 aA	5,27 bA	4,88
15,0	0,52 bB	9,65 aA	11,10 aA	7,09
30,0	0,50 bB	9,00 aA	1,57 bB	3,69
Médias	1,66	8,49	6,70	CV (%) = 30,09

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

Na indução de dois dias, as médias observadas nos tempos de sonicação de 2,5; 7,5; 15,0 e 30,0 segundos diferiram estatisticamente do controle, que apresentou a menor média (Tabela 4.2). Para o tempo de indução de três dias, as médias observadas para a sonicação de 2,5 e 15,0 segundos diferiram estatisticamente dos demais tratamentos de sonicação (Tabela 4.2).

No tempo de indução de dois dias, as médias não apresentaram diferenças em função dos efeitos causados pelos diferentes tempos de sonicação aplicados, exceto para o controle, enquanto na indução de três dias, a sonicação por 0,0; 7,5 e 30,0 segundos afetaram a alongação das brotações (Tabela 4.2). Na

indução por um dia a ausência de sonicação foi benéfica em detrimento aos tratamentos de sonicação aplicados. Em trabalhos preliminares, com indução de regeneração por um dia e incubação na suspensão bacteriana por 20 horas, foi observada dificuldade de alongação das plântulas, mesmo em ausência de sonicação.

Para os tempos de sonicação de 2,5; 7,5 e 15,0 segundos, as médias observadas no tempo de indução de dois e três dias diferiram estatisticamente de um dia, enquanto para 30,0 segundos, a média observada na indução de dois dias diferiu estatisticamente das demais. Em ausência de sonicação, as médias observadas nos tempos de indução de um, dois e três dias, não diferiram estatisticamente (Tabela 4.2).

O estágio fisiológico dos explantes induzidos durante um, dois e três dias, influenciaram na resposta organogênica quanto ao desenvolvimento de plântulas. Olhoft et al. (2003) obtiveram maior resposta organogênica para explantes cultivados por um dia no meio de indução, porém, em ausência de sonicação. Os tempos de sonicação de 2,5; 7,5, 15,0 e 30,0 segundos com dois dias de indução e 2,5 e 15,0 segundos com três dias de indução foram os mais adequados para a alongação das plântulas transformadas com *Agrobacterium* na OD<sub>600</sub> de 0,5.

Os tratamentos de sonicação em eixos induzidos por um dia afetaram o desenvolvimento das plântulas. Para eixos induzidos por dois dias, os tratamentos de sonicação foram benéficos, superando o controle e para eixos induzidos durante três dias, a sonicação de 2,5; e 15,0 segundos foram benéficas (Tabela 4.2).

Para eficiência de expressão do gene GUS, houve efeito significativo para tempo de manutenção no meio de indução de regeneração com  $p = 0,0001$ , para tempo de sonicação com  $p = 0,0025$  e para a interação tempo no meio de indução e tempo de sonicação, não houve efeito significativo.

As médias observadas nos tempos de indução de dois e três dias diferiram estatisticamente da média observada para um dia de indução. As médias, para eficiências de expressão do gene GUS observadas em 2,5 e 15,0 segundos de sonicação foram estatisticamente semelhantes e diferiram dos demais tratamentos (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3 –** Eficiência da expressão do gene GUS em plantas sobreviventes após transformação por *Agrobacterium*, sob três tempos no meio de indução (dias) e cinco tempos de sonicação (segundos), a partir de 70 dias de cultivo.

Sonicação (segundos)	Tempo no meio de Indução (dias)			Médias
	1	2	3	
0,0	8,33*		18,75	13,54 b**
2,5		43,75	31,25	37,50 a
7,5	2,08	18,75	18,75	13,19 b
15,0	2,08	37,50	47,92	29,17 a
30,0		22,92	4,16	13,54 b
Médias	4,16 B	30,73 A	24,17 A	CV(%) = 40,61

\*Eficiência = N° Plantas expressando GUS/N° eixos infectados (48), \*\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Das plantas sobreviventes após seleção com glufosinato, em 75% houve expressão estável do gene GUS (Tabela 4.4). As plantas apresentando expressão estável foram classificadas dentro de três níveis de acordo com a intensidade de coloração, onde 20% apresentou forte expressão de GUS, 35% apresentou média expressão e 43% baixa expressão para o gene GUS, independente do tratamento aplicado.

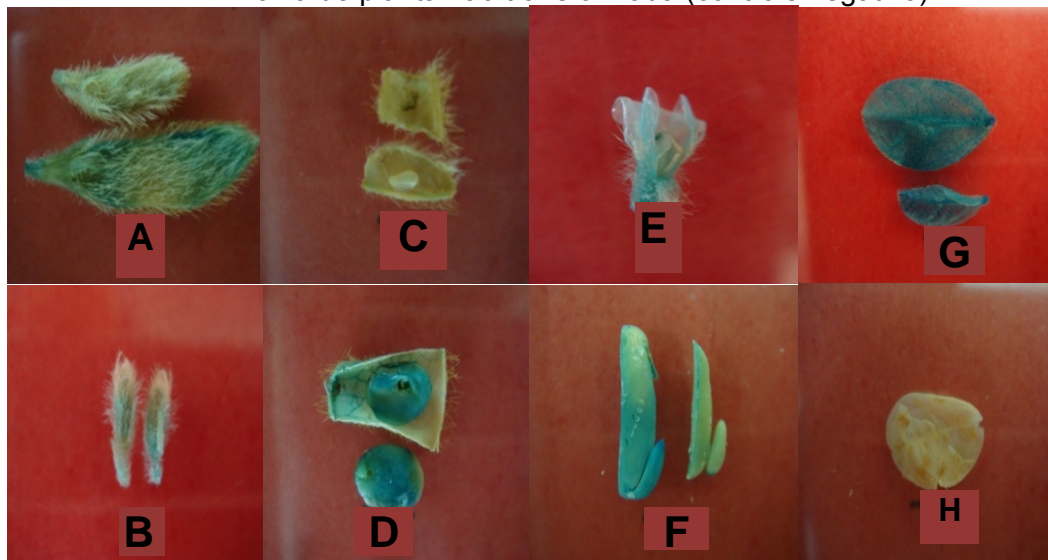
**Tabela 4.4 –** Expressão do gene GUS em plantas sobreviventes após transformação por *Agrobacterium*, sob três tempos no meio de indução (dias) e cinco tempos de sonicação (segundos), a partir de 70 dias de cultivo.

Meio de Indução (dias)	Sonicação (segundos)	N° Plantas sobrevi- ventes	N° Plantas expressando GUS*	Expressão GUS**		
				+++	++	+
1	0,0	10	4	2	2	
1	2,5	0	0			
1	7,5	0	0			
1	15,0	1	1	1		
1	30,0	1	1	1		
2	0,0	0	0			
2	2,5	26	21	6	4	11
2	7,5	13	9		2	7
2	15,0	25	18	3	6	9
2	30,0	17	11	2	5	4
3	0,0	11	9	4	2	3
3	2,5	17	15	2	7	6
3	7,5	12	9		4	5
3	15,0	25	23	4	11	8
3	30,0	2	0			
		160	121	25 (20,66%)	43 (35,54%)	53 (43,80%)

\*Expressão estável de GUS, \*\*Níveis de expressão de GUS: alta (+++), média (++), baixa (+).

Diferentes tecidos coletados de diferentes plantas no laboratório e em casa-de-vegetação, resistentes ao agente seletivo, ficaram coradas de azul, indicando haver expressão do gene GUS (Figura 4.4.), corroborando com os resultados observados por Vasconcelos et al. (2008), onde folhas de milho coletadas em plantas de casa-de-vegetação com resistência ao agente seletivo, ficaram totalmente coradas de azul, indicando haver expressão do gene GUS.

**Figura 4.4** – Expressão estável de GUS. A e B - Expressão estável de GUS em vagens imaturas. C - Segmentos de vagens e sementes de plantas não transformadas. D - Expressão do gene GUS em segmento de vagem e sementes coletadas de plantas transformadas em casa de vegetação. E - Expressão do gene GUS em tecidos florais. F - Expressão estável em segmento de cotilédone com embrião (esquerda) e controle negativo (direita). G - Expressão estável de GUS em folhas de plantas transformadas e H - Folha de planta não transformada (controle negativo).



#### 4.3.2 Avaliação de Doses de Acetosiringona e Tempo de Sonicação em Plantas Regeneradas de Eixos Embrionários sob Transformação via *Agrobacterium* - Experimento 2

As médias para número de plântulas regeneradas mostraram efeito significativo para as doses de acetosiringona com  $p = 0,001$ , tempo de sonicação  $p = 0,001$  e na interação de acetosiringona com tempo de sonicação, com  $p = 0,0038$ .

O número de plântulas alongadas com indução de 1 dia em  $100 \mu\text{M}$  de acetosiringona observado nos tratamentos com 7,5 e 30,0 segundos de sonicação diferiram estatisticamente dos demais tratamentos. Na concentração de

200  $\mu\text{M}$  de acetosiringona, maior número de plântulas alongadas foram observados na sonicação de 7,5 segundos e 0,0, e diferiram estatisticamente dos demais tempos de sonicação (Tabela 4.5).

No tempo de sonicação de 0,0; 7,5 e 15,0 segundos, as médias observadas para número de plântulas alongadas foram estatisticamente semelhantes entre 100 e 200  $\mu\text{M}$  de acetosiringona, enquanto as médias observadas nos tempos de sonicação de 2,5 e 30,0 segundos, diferiram estatisticamente entre as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$  de acetosiringona (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5** – Número de plântulas alongadas sob transformação por *Agrobacterium*, com cinco tempos de sonicação (segundos) e duas concentrações de acetosiringona ( $\mu\text{M}$ ), a partir de 70 dias de cultivo.

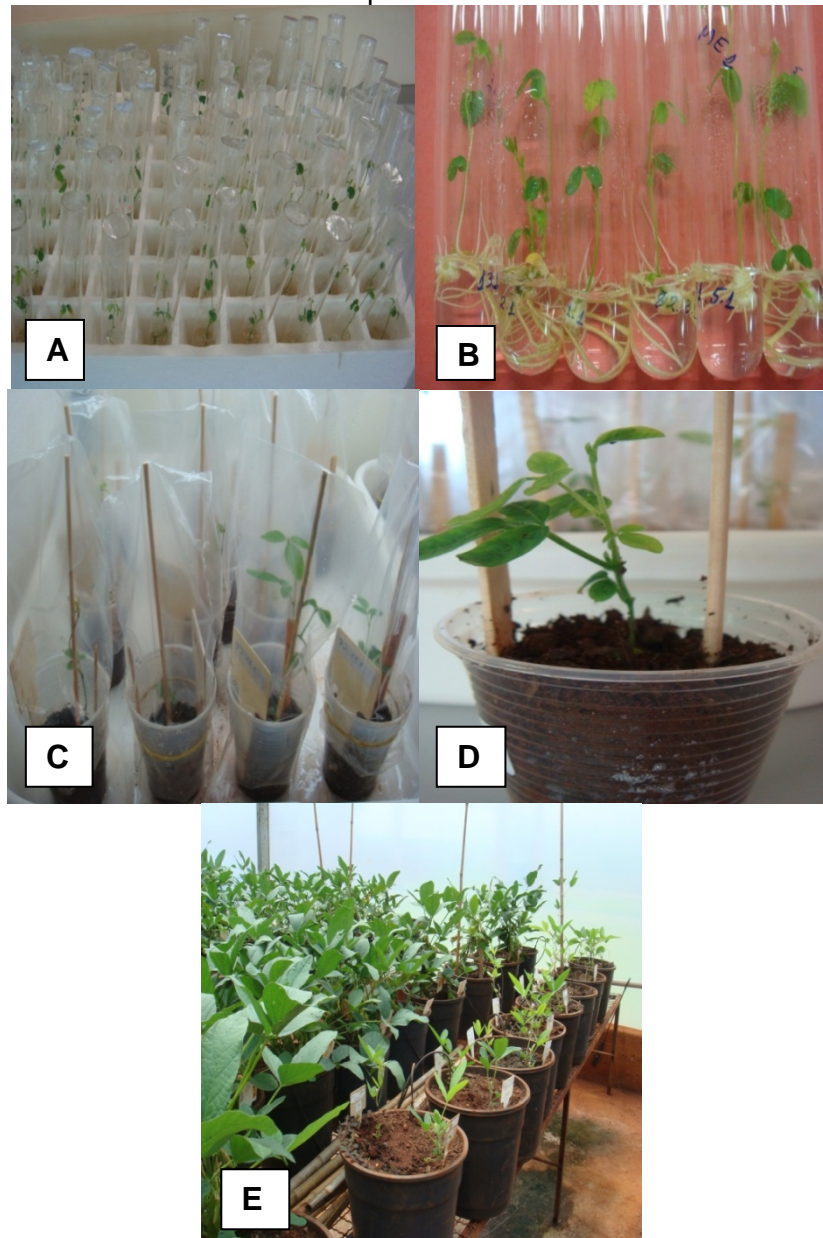
Sonicação (segundos)	Acetosiringona ( $\mu\text{M}$ )		Médias
	100	200	
0,0	9,79 b*A	9,15 aA	9,47
2,5	10,56 bA	4,30 bB	7,43
7,5	18,71 aA	12,42 aB	15,57
15,0	4,75 bA	2,75 bA	3,75
30,0	16,86 aA	1,50 bB	9,18
Médias	12,13	6,02	CV(%) = 24,79

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

A regeneração de plântulas observada em eixos induzidos por 1 dia e submetidos à técnica de SAAT com  $\text{OD}_{600}$  de 0,2 em 100  $\mu\text{M}$  de acetosiringona (Tabela 4.5), superou a regeneração observada no experimento anterior para eixos induzidos por 1 dia, porém, com  $\text{OD}_{600}$  0,5 e 200  $\mu\text{M}$  de acetosiringona (Tabela 4.2).

As plântulas alongadas com altura maior ou igual a 3,0 cm, foram transferidas para o meio enraizamento (ME, Tabela 4.1) (Figura 4.5-A), suplementado com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de IBA e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$   $\text{GA}_3$ , e após 25 dias, aquelas apresentando o sistema radicular bem desenvolvido (Figura 4.5-B), foram transferidas para o substrato para a aclimatização (Figura 4.5-C), nas condições de temperatura e fotoperíodo controlados, sendo após 15 a 20 dias conduzidas para a casa-de-vegetação (Figura 4.5.D), e em seguida transferidas para o vaso (Figura 4.5-E).

**Figura 4.5** – Desenvolvimento de plantas. A. plantas alongadas em fase de enraizamento. B. plantas com sistema radicular bem desenvolvido, aos 30 dias de cultivo. C. plantas aclimatizando em condições de câmara úmida. D. planta no substrato. E. plantas no vaso.



Foram observados dentro de um mesmo tratamento, diferentes níveis de expressão do gene GUS, em tecidos de folhas, com transformação pelo método de SAAT, nos dois experimentos (Tabelas 4.4 e 4.6). Além de folhas, a expressão estável também foi observada em outros tecidos (Figura 4.4). Segundo Liu, Wang e Wei (2004) as diferenças observadas com relação a expressão gênica

em diferentes tecidos, provavelmente estão relacionadas ao tempo de incubação no meio de agroinfecção.

Para eficiência de expressão do gene GUS, houve efeito significativo para concentrações de acetosiringona com  $p > 0,0001$  e para tempo de sonicação com  $p = 0,0005$ , enquanto para a interação concentrações de acetosiringona e tempo de sonicação, não houve efeito significativo.

Para concentrações de acetosiringona, a média observada em 100  $\mu\text{M}$  de acetosiringona foi superior e diferiu estatisticamente de 200  $\mu\text{M}$ . Para tempo de sonicação as médias observadas em 7,5 e 30,0 segundos apresentaram maior expressão do gene GUS e diferiram estatisticamente das demais médias.

**Tabela 4.6** – Eficiência da expressão do gene GUS em plantas sobreviventes após transformação por *Agrobacterium*, sob duas concentrações de acetosiringona ( $\mu\text{M}$ ) e cinco tempos de sonicação (segundos), a partir de 70 dias de cultivo.

Sonicação (segundos)	Acetosiringona ( $\mu\text{M}$ )		Médias
	100	200	
0,0	41,67	12,50	25,00 b*
2,5	27,08	16,67	22,62 b
7,5	56,25	25,00	42,86 a
15,0	16,67	8,33	14,58 b
30,0	54,17	16,67	41,67 a
Médias	40,28 A	16,67 B	CV(%) = 15,32

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Os tratamentos que apresentaram maior eficiência para expressão de GUS foram os que apresentaram maior número de plantas regeneradas, como observado no experimento anterior, indicando que a eficiência de expressão do gene GUS é dependente de um bom protocolo de regeneração e alongação de plantas (CHOI et al., 2007).

Diferentes graus de expressão do gene GUS foram observados dentro dos tratamentos, quanto a intensidade de coloração. Do total de plantas sobreviventes após seleção com glufosinato independente do tratamento, 75% apresentaram expressão estável, sendo que, 27% apresentaram forte expressão, 39% média expressão e 35% apresentaram baixa expressão do gene GUS (Tabela 4.7).

**Tabela 4.7 –** Eficiência da expressão do gene GUS em plantas sobreviventes após transformação via *Agrobacterium*, sob duas concentrações de acetosiringona ( $\mu\text{M}$ ) e cinco tempos de sonicação (segundos), a partir de 70 dias de cultivo.

Acetosiringona ( $\mu\text{M}$ )	Sonicação (segundos)	Número de plantas sobreviventes	Nível de expressão GUS**			
			GUS*	+++	++	+
100	0	15	15		7	8
100	2,5	28	13	1	7	5
100	7,5	34	27	11	11	5
100	15,0	8	4	1	1	4
100	30,0	31	26	10	8	8
200	0	8	6	2	2	2
200	2,5	7	6	2	2	2
200	7,5	14	9	1	3	5
200	15,0	1	1		1	
200	30,0	5	3	2	1	
Total		141	110	30(27,27)	43 (39,10)	39 (35,45)

\*Expressão estável de GUS, \*\*Nível de expressão de GUS: alta (+++), média (++) e baixa (+).

Entre as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$  de acetosiringona, as maiores eficiências para expressão de GUS foram observadas em 100  $\mu\text{M}$  de acetosiringona, nos tempos de 7,5 e 30 segundos de sonicação, com médias acima de 50%, diferindo estatisticamente das demais eficiências observadas para 100 e 200  $\mu\text{M}$  de acetosiringona.

O emprego de *acetosiringona* nos trabalhos de transformação via *Agrobacterium* tem melhorado a eficiência de transformação em plantas de soja que apresentam baixa susceptibilidade a infecção (TRICK; FINER, 1997), assim como em outras culturas.

O uso de ultra-som tem sido relatado em transformação de soja via *Agrobacterium* mediada por sonicação (SAAT), em tecidos de nó-cotiledonar (MEURER, DINKINS; COLLINS, 1998) e cotilédones imaturos (SANTARÉM et al., 1998; FINER; FINER, 2000) e em milho (VASCONCELOS et al., 2010).

Neste trabalho o emprego de 100  $\mu\text{M}$  de acetosiringona juntamente com a sonicação foram eficientes em elevar a expressão do gene GUS em eixos induzidos por um dia.

A alongação das plântulas produzidas em relação aos eixos infectados tem sido limitada, como pode ser observada nos dois experimentos (Tabelas 4.3 e 4.5), corroborando com os resultados observados por Chen (2004), que também encontrou dificuldades quanto à alongação de plântulas, mesmo sendo

susceptíveis a *Agrobacterium*, e como observado por Donaldson e Simmonds (2000).

Os eixos que produziram mais de uma planta, onde normalmente são considerados clones, foram computados como eventos independentes, pelo fato dos eventos ocorrerem a nível celular, podendo estar com inserções do transgene em locais diferentes do genoma, ter número de cópias diferentes ou mesmo ocorrido quimeras, discordando, portanto, de Zhang et al. (1999), onde postularam que plantas produzidas do mesmo explante (nó-cotiledonar) devem ser consideradas clones, não sendo, enfim, incluídas na frequência de transformação.

Apesar disso, a eficiência da expressão estável de GUS nas plantas sobreviventes foi considerada satisfatória, quando comparada aos resultados de Liu, Wei e Huang (2008), onde no melhor esquema de seleção a maior eficiência foi de 8,3%. Com seleção para glufosinato, Zhang et al. (1999) reportaram eficiência de 0 a 3%, enquanto Zeng et al. (2004) observaram no estágio inicial de desenvolvimento dos brotos de nó-cotiledonar eficiência de 5,9% para o gene GUS. Eficiências de 38% para tempo de infecção e 40% para tempo de co-cultivo foram observadas por Zia et al. (2010), em seleção com kanamicina, enquanto os resultados deste trabalho mostraram eficiências mais elevadas para expressão de GUS nas plantas desenvolvidas de eixo embrionário, porém, em seleção com glufosinato de amônia.

Quanto à expressão estável do gene GUS, os eixos mantidos no meio de indução durante dois e três dias (experimento 1), e transformados por *Agrobacterium* EHA105 na OD<sub>600</sub> de 0,5, com 200 µM de acetosiringona, nos tempos de sonicação avaliados, apresentaram eficiências de expressão estável do gene GUS variando de 18,75% a 47,92% (Tabela 4.3), enquanto os eixos cultivados por um dia no meio de indução (experimento 2), e transformados por *Agrobacterium* EHA105 na OD<sub>600</sub> de 0,2 com 100 µM de AS, apresentaram eficiências de 56,25%, 54,17% para expressão estável do gene GUS, com sonicação de 7,5 e 30 segundos, respectivamente (Tabela 4.5).

Para cultivares chinesas, Liu; Yang; e Wei (2004) obtiveram para eixos cultivados por um dia no meio de indução e agroinfecção com a cepa EHA105 durante 20 horas, em 100 uM de acetosiringona, eficiência de expressão transiente do gene GUS de 78,2% e eficiência de transformação de 7,14% a 14,68%, para as mesmas cultivares, enquanto, Dang e Wei (2007), alterando a concentração de acetosiringona para 200 µM, obtiveram eficiência de expressão transiente para o

gene GUS variando de 49% a 75%, e eficiência de transformação de 12,31 a 15,38%. No entanto, as eficiências de expressão estável para o gene GUS observadas neste trabalho com sonicação mediando a agroinfecção ficaram próximas às observadas por Liu; Yang; e Wei, (2004) and Dang e Wei, (2007).

Considerando-se o tempo de indução de um dia, as plantas produzidas com OD<sub>600</sub> 0,2 (Experimento 2) apresentaram melhor desempenho para frequência da expressão estável de GUS, em relação às frequências observadas para plantas produzidas com OD<sub>600</sub> 0,5 (Experimento 1).

#### 4.4 CONCLUSÕES

Experimento 1. O maior número de plântulas alongadas e maior expressão do gene GUS ocorrem em eixos embrionários mantidos por dois e três dias no meio de indução e com 2,5 e 15,0 segundos de sonicação na suspensão de *Agrobacterium* OD<sub>600</sub> 0,5, na cultivar Conquista.

Experimento 2. O maior número de plântulas alongadas e maior expressão do gene GUS ocorrem em 100 µM de acetosiringona, com 7,5 e 30,0 segundos de sonicação na suspensão de *Agrobacterium* OD<sub>600</sub> 0,2, na cultivar Conquista.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.14, n.1, P.1-10, 2002.

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cell utilizing a herbicidal molecule results in recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merril] plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.101, n.1-2, p.1-6, 2000.

BIRCH, R.G. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.297-326, 1997.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF: Embrapa 1999. p.679-735..

CHEN, S.-Y. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated Transformation of Soybean. **Acta Botanica Sinica**, Beijing, v.46, n.5, p.610-617, 2004.

CHOI, H. J.; CHANDRASEKHAR, T.; LEE, H. Y.; KIM, K. M. Production of herbicide-resistant transgenic sweet potato plants through *Agrobacterium tumefaciens* method. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v.91, n.3, p.235-242, 2007.

CONAB. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 13 mar. 2011.

DANG, W.; WEI, Z. M. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. **Plant Science**, Davis, v.173, n.4, p.381-389. 2007.

DANILOVA, S.A. Technologies for genetic transformation of cereals. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v.54, n.5, p.569-581, 2007.

DONALDSON, P. A.; SIMMONDS, D. H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.19, n.5, p.478-484, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15,1990.

DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L). Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. **Euphytica**, Wageningen, v.127, n.3, p.367-376, 2002.

FINER, K.R.; FINER, J.J. Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons. **Letters in Applied Microbiology**, Cardiff, v.30, n.5, p.406-410, 2000.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 745-750, 1996.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusion:  $\beta$ glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v.6, p.3901-3907, 1987.

LIU, H. K.; YANG, C.; WEI, Z. M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. **Planta**, Bonn, v.219, n.6, p.1042-1049, 2004.

LIU, S. J.; WEI, Z. M.; HUANG, J. Q. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.27, n.3, p.489-498, 2008.

- LIU, Z.; PARK, B.J.; KANNO, A.; KAMEYA, T. The novel use of a combination and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. with *lea* gene. **Molecular Breeding**, Lleida, v.16, n.3, p.189-197, 2005.
- MEURER, C. A., DINKINS, R. D.; COLLINS, G. B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.18, n.3-4, p.180-186, 1998.
- OLHOFT, P. M.; FLAGEL, L. E.; DONOVAN, C. M. SOMERS, D. A. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. **Planta**, Bonn, v.216, n.5, p.723-735, 2003.
- OLHOFT, P. M.; LIN, K.; GALBRAITH, J.; NIELSEN, N. C., SOMERS, D. A. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium* mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.20, n.8, p.731-737, 2001.
- OLHOFT, P. M.; SOMERS, D. A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.20, n.8, p.706-711, 2001.
- PAZ, M. M.; MARTINEZ, J. C.; KALVIG, A. B.; FONGER, T. M.; WANG, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.25, n.3, p. 206-213, 2006.
- PAZ, M. M.; SHOU, H.; GUO, Z.; ZHANG, Z.; BAPNERJEE, A. K.; WANG, K. Assesment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explants. **Euphytica**, Wageningen, v.136, n.3, p.167-179, 2004.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- STACHEL, S. E.; MESSENS, E.; MONTAGU, M. van; ZAMBRYNSKI, P. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells with activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 318, p. 624-629, 1985.
- TRICK, H. N.; FINER, J. J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merril] embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.17, n.6-7, p.482-488, 1998.
- TRICK. H. N.; FINER, J. J. SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*- mediated transformation. **Transgenic Research**, London, v.6, p.329–337, 1997.
- TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, n.2, p.147-154, 2006.

VASCONCELOS, M. J. V.; FONTES, M. A.; PAIVA, E.; CARVALHO, C. H. S.; BARBOSA, S. M. SAAT: Transformação genética mediada por *Agrobacterium* após sonicação de embriões imaturos de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.7, n.2, p.105-112, 2008.

WANG, G.; XU, Y. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.27, n.7, p.1177-1184, 2008.

XUE, R. G.; XIE, H. F.; ZHANG, B. A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells. **Biotechnology Letters**, Hull, v.28, n.19, p.1551-1557, 2006.

ZENG, P. P.; VADNAIS, D. A.; ZHANG, Z.; POLACCO, J. C. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.22, n.7, p.478-482, 2004.

ZHANG, Z.; XINGA, S. T.; ASWICK, P.; CLEMENTE, T. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v.56, n.1, p.37-46, 1999.

ZIA, M.; MIRZA, B.; MALIK, S. A.; CHAUDHARY, M. F. Expression of *rol* genes in transgenic soybean (*Glycine max* L.) leads to changes in plant phenotype, leaf morphology, and flowering time. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v.103, n.2, p.227-236, 2010.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

As cultivares apresentam potencial para regeneração organogênica. Maior potencial para número de brotos é observado nas cultivares Valiosa RR e Conquista e para frequência de multibrotação na cultivar Valiosa RR.

O cultivo de eixos embrionários, da cultivar Conquista, por dois dias no meio de indução e 20 dias no meio de recuperação estimulam maior regeneração de plântulas e maior expressão do gene GUS.

O maior número de plântulas alongadas e maior expressão do gene GUS ocorrem em eixos embrionários, da cultivar Conquista, mantidos por dois e três dias no meio de indução e com 2,5 e 15,0 segundos de sonicação na suspensão de *Agrobacterium* OD<sub>600</sub> 0,5.

O maior número de plântulas alongadas e maior expressão do gene GUS ocorrem em 100 µM de acetosiringona, com 7,5 e 30,0 segundos de sonicação de eixos embrionários, da cultivar Conquista, na suspensão de *Agrobacterium* OD<sub>600</sub> 0,2.

As cultivares Valiosa RR e Conquista apresentam maior potencial organogênico. Eixos embrionários da cultivar Conquista mantidos por um dia no meio de indução, com 7,5 e 30 segundos de sonicação na suspensão de *Agrobacterium* OD<sub>600</sub> 0,2 com acetosiringona a 100 µM, e mantidos por 20 dias no meio de recuperação promovem maior desenvolvimento de plântulas e maior eficiência de expressão estável do gene GUS.

## REFERÊNCIAS

ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.14, n.1, p.1-10, 2002.

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cell utilizing a herbicidal molecule results in recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.101, n.1-2, p.1-6, 2000.

BARWALE, U. B.; KEANS, H. R.; WIDHOLM, J. M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. **Planta**, Bonn, v.167, n.4, p.473-481, 1986.

BECHTOLD, N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. **Comptes rendus de l'Academie des Sciences. Sciences de la vie**, Montrouge, v.316, p.1194-1199, 1993.

BRASILEIRO, A. C. M.; CANÇADO, G. M. de A. Plantas transgênicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.204, p.28-35, 2000.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, Antonio Carlos; CALDAS, Linda Styer; BUSO, José Amauri (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v.2, p.679-735.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v.1, p.87-132.

CHAN, M. T., LEE T. M.; CHANG, H. H. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant and Cell Physiology**. Oxford, v.33, n.5, p.577-593, 1992.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A.; CARLSON, P. S. A morphogenetically competent soybean suspension culture. **Science**, v.222, p.632-634, 1983.

CHRISTOU, P. Rice transformation: bombardment. **Plant Molecular Biology**. Zurich, v.35, n.1-2, p.197-203, 1997.

CHRISTOU, P.; McCABE, D. E. Prediction of germ-line transformation events in chimeric R<sub>0</sub> transgenic soybean plantlets using tissue-specific expression patterns. **Plant Journal**, v.2, p.283-290, 1992.

CLEMENTE, T. E.; LAVALLEE, B. J.; HOWE, A. R.; CONNER-WARD, D.; ROZMAN, R. J.; HUNTER, P. E.; BROYLES, D. L.; KASTEN, D. S.; HINCHEE, M. A. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. **Crop Science**, Madison, v.40, n.3, p.797-803, 2000.

CONAB. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em 13.mar. 2011.

DAN, Y.; REIGHCERI, N. A. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants. **In vitro Cell Biology Plant**. Brisbane, v.34, n.1, p.14-21, 1998.

DANG, W.; WEI, Z. M. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. **Plant Science**, Davis, v.173, n.4, p.381-389, 2007.

DANILOVA, S.A. Technologies for genetic transformation of cereals. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v.54, n.5, p.569-581, 2007.

DeBLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCK, J.; THOEN, C.; GOSSELÉ, V.; RAO, N.; MOVVA, C.; THOMPSON, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v.6, p.2513-2518, 1987.

DONALDSON, P. A.; SIMMONDS, D. H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.19, n.5, p.478-484, 2000.

DROSTE, A.; LEITE, P. C. P.; PASQUALI, G.; MUNDSTOCK, E. C.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58 n.4, 2001.

DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. **Euphytica**, Wageningen, v.127, n.3, p.367-376, 2002.

EFFENDI, K. H.; KANNO, A.; KAMEYA, T. Transformation of soybean by infecting embryonic calli with *Agrobacterium tumefaciens* and that of soybean and kidney bean by injecting the bacteria into germinating seeds. **Plant Biotechnology**, v.17, p.187-194, 2000.

FINER, J. J. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.7, p.238-241, 1988.

FISK, H. J.; DANDEKAR, A. M. The Introduction and Expression of Transgenes in Plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdã, v.55, p.5-36, 1993.

FONTES, E. M. G.; MELO, P. E. Avaliação de riscos na introdução no ambiente de plantas transgênicas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, v.2, p.815-843, 1999.

- GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the gene-jockeying tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p.16-37, 2003.
- GESTEIRA, A. S. **Avaliação do potencial embriogênico de cultivares de soja e transformação com o gene da citrato sintase**. 2002. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Departamento de Genética, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- HADI, M. Z.; McMULLEN, M. D.; FINER, J. J. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.15, p.500-505, 1996.
- HENSEL, G.; KASTNER, C.; OLESZCZUK, S.; RIECHEN, J.; KUMLEHN, J. *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize. **International Journal of Plant Genomics**, doi:10.1155/2009/835608, 2009.
- HINCHEE, M.A.W.; CONNOR-WARD, D.W.; NEWELL, C.A.; MCDONNELL, R.E., SATO, S.J.; GASSER, C.S.; FISCHHOFF, D.A.; RE, D.B.; FRALEY, R.T.; HORSCH, R.B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Bio/Technology**, v.6, p.915-922, 1988.
- ISAAA. 2010. Disponível em: <www.isaaa.org>. Acesso em: 13 mar. 2011.
- JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**. The First Fourteen Years, 1996 to 2009. In: International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. Ithaca, New York, 2010
- JOY, I. V.; THORPE, T. A. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. In: SOH, W. Y.; BROJWANI, S. S. (Ed.). **Morphogenesis in plant tissue cultures**. London: Kluwer Academic Publishers, 1999. p.171-214.
- KE, J.; KHAN, R.; JOHNSON T. High-efficiency gene transfer to recalcitrant plants by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.20, n.2, p.150-156, 2001.
- KIM, J. H.; LAMOTTE, C. E.; HACK, E. Plant regeneration *in vitro* from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings. **Journal Plant Physiology**, v.136, p. 664-669, 1990.
- KIM, Y. J.; PARK, T. L.; KIM, H. S.; PARK, H. K.; CHON, S. U.; YUN, S. J. Factors affecting organogenesis from mature cotyledon explants and regeneration in soybean. **Journal of Plant Biotechnology**, v.6, n.1, p.39-43, 2004.
- KO, T. S.; KORBAN, S. S. Enhanced the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledone of soybean (*Glycine max* (L) Merril.). **In vitro Cell Development Biology Plant**, v.40, p.552-558, 2004.

KO, T. S.; LEE, S.; KRASNYANSKI, S.; KORBAN, S. S. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonar explant. **Theoretical and Applied Genetics**, v.107,n.3, p.447, 2003.

KO, T. S.; NELSON, R. L.; KORBAN, S. S. Screening multiple soybean cultivars (MG 00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledones. **Crop Science**, Madison, v.44, n.5, p.1825-1831, 2004.

KOMATSUDA, T.; LEE, W.; OKA, S. Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v.28, n.1, p.103-113, 1992.

KORBES, A. P.; DROSTE, A. Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.40, n.3, p.211-216, 2005.

KRAMER, M. G.; REDENBAUGH, K. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story. **Euphytica**, Wageningen, v.79, n.3, p.293-297, 1994.

LEE, H. S.; KIM, S. W.; LEE, K. W.; ERIKSSON, T.; LIU, J. R. *Agrobacterium*-mediated transformation of ginseng (*Panax ginseng*) and mitotic stability of the inserted beta-glucuronidase gene in regenerants from isolated protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.14, p.545-549, 1995.

LIU, H. K.; YANG, C.; WEI, Z. M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. **Planta**, Bonn, v.219, n.6, p.1042-1049, 2004.

LIU, S. J.; WEI, Z. M.; HUANG, J. Q. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.27, n.3, p.489-498, 2008.

LIU, Z.; PARK, B. J.; KANNO, A.; KAMEYA, T. The novel use of a combination and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *lea* gene. **Molecular Breeding**, Lleida, v.16, n.3, p.189-197, 2005.

MA, X. H.; WU, T. L. Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Posnan, v.30, n.2, p.209-216, 2008.

MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; ANBAZHAGAN, V. R.; SUDHAKAR, B.; SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A.; KASTHURIRENGAN, S. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Sacharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports**, v.23, p.134-144, 2004.

McCABE, D. E.; SWAIN, W. F.; MARTINELL, B. J.; CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Nature Biotechnology**, v.6, n.8, p.923-926, 1988.

MEURER, C. A., DINKINS, R. D.; COLLINS, G. B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.18, n.3-4, p.180-186, 1998.

MURAKAMI, T.; ANZAI, H.; IMAI, S.; SAOH, A.; NAGAOKA, K.; THOMPSON, C. J. The bialophos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of gene cluster. **Molecular General Genetics**, v.205, p.42-50, 1986.

NAM, J.; MATTHYSSE, A. G.; GELVIN, S. B. Differences in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. **Plant Cell**, Colney, v.9, p. 317-333, 1997.

NEDEV, T.; TODOROVA, R.; KOSTURKOVA, G.; AKITHA DEVI, M. K.; SAKTHIVELU, G.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISHANKAR, G. A. Variation in *in vitro* Morphogenic Response to Growth Regulators in Soybean Genotypes from India and Bulgaria. **International Electronic Journal of Bioautomation**, Sofia, v.8, Supplement 1, p.193-200, 2007.

OLHOFT, P. M.; FLAGE, L. E.; DONOVAN, C. M.; SOMERS, D. A. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. **Planta**, Bonn, v.216, n.5, p.723-735, 2003.

OLHOFT, P. M.; FLAGEL, L. E.; DONOVAN, C. M.; SOMERS, D. A. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. **Planta**, Bonn, v.216, n.5, p.723-735, 2002.

OLHOFT, P. M.; LIN, K.; GALBRAITH, J.; NIELSEN, N. C.; SOMERS, D. A. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.20, p.731-737, 2001.

OLHOFT, P. M.; SOMERS, D. A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.20, p.706-711, 2001.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; KIIHL, R. A. de S.; ALMEIDA, L. A. Desenvolvimento de cultivares de soja na Região Norte e Nordeste do Brasil. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I. de M. de (Ed.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p.255-266.

PARROTT, W. A.; HOFFMAN, L. M.; HILDEBRAND, D. F.; WILLIAMS, E. G.; COLLINS, G. B. Recovery of primary transformants of soybean. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.7, n.8, p.615-617, 1989.

PATHAK, M. R.; YOUSIF, H. R. An effective method of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpeas. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v.93, n.1, p.65-71, 2008.

PAZ, M. M.; MARTINEZ, J. C.; KALVIG, A. B.; FONGER, T. M.; WANG, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.25, n.3, p. 206-213, 2006.

PAZ, M. M.; SHOU, H.; GUO, Z.; ZHANG, Z.; BANERJEE, A. K.; WANG, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. **Euphytica**, Wageningen, v.136, n.2, p.167-179, 2004.

PROBST, A. H.; JUDD, R. W. Origin, U.S. history and development, and world distribution. In: CALDWELL, B.E. (Ed.). Soybeans, improvement, production, and uses. Madison, American Society of Agronomy, 1973. p.1-15. (Agronomy, 16)

REDDY, M. S. S., DINKINS, R. D.; COLLINS, G. B. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, Marseille, v. 21, n.7, p.676-683, 2003.

REICHERT, N. A.; YOUN, M. M.; WOODS, A. L. Adventitious organogenic regeneration from soybean genotypes representing nine maturity groups. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v.75, n.3, p.273-277, 2003.

SAMOYLOV, V. M.; TUCKER, D. M.; PARROT, W. A. Soybean *Glycine max* (L.) Merrill embryonic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. **In vitro Cell and Development Biology Plant**, v.34, p.8-13, 1998.

SANTARÉM, E. R. SAAT: Transformação de plantas mediada por ultra-som e *Agrobacterium*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.4, p.725-730, 2000.

SANTARÉM, E. R.; FERREIRA, A. G. Transformação de soja via bombardeamento de partículas. **ABCTP Notícias**, Lavras, 29:2-9, 1997.

SANTARÉM, E. R.; FINER, J. J. Transformation of soybean *Glycine max* (L.) Merrill using proliferative embryogenic tissue maintained on semisolid medium. **In vitro Cell Development Biology Plant**, v.35, p.451-455, 1999.

SANTARÉM, E. R.; TRICK H. N.; ESSIG J. S.; FINER J. J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.17, p.752-759, 1998.

SANTOS, O. S. **A cultura da soja-1 Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná**. Editora Globo, 1988. 299 p.

SAWAHEL, W. A. **Transgenic plants** – performance, release ADN containment. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.10, n.2, p.139-144, 1994.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C. BARROS, H.B. Origem, Evolução e Importância Econômica. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenas, 2009. 314 p.

SHETTY, K.; ASANO, Y.; OOSAWA, K. Stimulation of *in vitro* shoot organogenesis in *Glycine max* (Merrill.) by allantoin and amides. **Plant Science**, Davis, v.81, n.2, p.245-251, 1992.

SHRESTHA, B. R.; CHIN, D. P.; TOKUHARA, K.; MII, M. Efficient of production of transgenic plants of *Vanda* through Sonicated Assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v.24, p.429-434, 2007.

SIMMONDS, D. H.; DONALDSON, P. A. Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.19, p.485-490, 2000.

SOMERS, D. A.; SAMAC, D. A.; OLHOFT, P. M. Recent advances in legume transformation. **Plant Physiology**. Urbana, v.131, p.892-899, 2003.

SRIVASTAVA, T.; DAS, S.; SOPORY, S.K.; SRIVASTAVA, S. A reliable protocol for transformation of *Catharanthus roseus* through *Agrobacterium tumefaciens*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.15, p.93-8, 2009.

STACHEL, S. E. Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. **Nature**, London, v.322, n.6081, p.706-712, 1986.

STACHEL, S. E.; MESSENS, E.; MONTAGU, M. van; ZAMBRYNSKI, P. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells with activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 318, p. 624-629, 1985.

STEWART, C. N.; ADANG, M. J.; ALL, J. N.; BOERMA, H. R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PARROT, W. A. Genetic transformation, discovery and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. **Plant Physiology**, v.112, p.121-129, 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Califórnia: The Benjamin/Cummings Publishings Company, 1991. 565p.

TEIXEIRA, L. R., BRACCINIL, A. de L.; CHURATA, B. G. M.; VIEIRA, E. S. N.; MARTINS, P. K.; SCHUSTER, I. Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.33, n.1, p. 67-74, 2011.

THOMPSON, C. J.; MOVAL, N. R.; TIZARD, R.; CRAMERI, R.; DAVIES, J. E.; LAUWEREYS, M.; BOTTERMAN, J. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygrosopicus*. **The EMBO Journal**, Heidelberg, vol.6, n.9, p.2519-2523, 1987.

THORPE, T. A. Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. **Korean, Journal Plant Tissue Culture**, v.27, p.245-258, 2000.

TINLAND, B. The integration of TDNA into plant genomes. **Trends Plant Science**, v.1, p.178-184, 1996.

TISSERAT, B., ESAN, E.B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticulture. Review**. v.1, p.1.78, 1979.

TOMLIN, E. S.; BRANCWT, S. B.; CHAMBERLAIN, D., HOWARD-GABE, H.; WRIGH, M. S.; STEWART JR., C.N. Screening of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill, lines for somatic embryo induction and maturation capability from immature cotyledons. **In vitro. Cell. Development Biology Plant**, v.38, p.543-548, 2002.

TORINSKY, R. S.; KOVACS, L.; AVDIUSHKO, S.; NEWMAN, J. D.; HUNT, A. G.; COLLINS, G. B. Development of a binary vector system for plant transformation based on the supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.17, n.2, p.102-108, 1997.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgenic Research**, London, v.6, p.329-337, 1997.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean *Glycine max* (L.) Merril embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, Marseille, v.17, n.6-7, p.482-488, 1998.

TROJANOWSKA, M. R. Alternative methods of plant transformation a short review. **Celular & Molecular Biology Letters**. v.7, p.849-858, 2002.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, n.2, p.147-154, 2006.

VAN SLUYS, M. A. *Agrobacterium*: Um vetor natural para transformação em plantas. In: In: TORRES, Antonio Carlos; CALDAS, Linda Styer; BUSO, José Amauri (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1999. p.679-735.

WALDEN, R., WINGENDER, R. Gene-transfer and plant regeneration techniques. **Tibtech**, Cambridge, v.13, p.324-331, 1995.

WANG, K.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKY, P. Right 25-bp terminus of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. **Cell**, v.38, p.455-462, 1984.

WEISING, K.; KAHL, G. Natural genetic engineering of plants cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, p.327-351, 1996.

XUE, R. G.; XIE, H. F.; ZHANG, B. A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells. **Biotechnology Letters**, Hull, v.28, n.19, p.1551-1557, 2006.

YAN, B.; REDDY, M. S. S.; COLLIN, G. B.; DINKINS, R. D. *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using immature zygotic cotyledon explants. **Plant Cell Reports**, v.19, p.1090-1097, 2000.

ZAMBRINSKI, P.; TEMPÉ, J.; SCHELL, J. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. **Cell**, v.56, n.193-201, 1989.

ZANCOPE, G. J.; NASSER, J. M. **O Brasil que deu certo**: a saga da soja Brasileira. Curitiba: Triade. 2005.

ZHANG, Z. Y.; XIANG, A. Q.; STASWICK, P.; CLEMENTE, T. E. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v.56, n.1, p.37-46, 1999.

ZHANG, Z.; GUO, Z.; SHOU, H.; PEGG, S. E.; CLEMENTE, T. E.; STASWICK, P. E.; WANG, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation and routine recovery of transgenic soybean. **Plant Genetic Engineering**, p.88-94, Dec., 2000.